



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 8 avril 2008

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
sur le dossier de demande d'autorisation d'une biomasse bactérienne tuée  
et séchée, co-produit de la production de L-lysine par fermentation  
d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée en tant que produit azoté  
pour l'alimentation animale au titre du règlement (CE) 1829/2003**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

### Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 18 janvier 2008 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes d'une demande d'avis sur le dossier de demande d'autorisation d'une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-lysine par fermentation d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée, en tant que produit azoté pour l'alimentation animale au titre du règlement (CE) 1829/2003 (dossier n°EFSA-FR-2007-40).

Conformément au Règlement (CE) n°1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, génétiquement modifiés et de rendre un avis à la Commission européenne. L'AESA a cependant décidé de permettre aux Etats-membres de faire connaître leurs observations sur le dossier initial et dans ce cadre, la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Afssa.

Ce dossier a été expertisé selon le règlement (CE) n°1829/2003 ainsi que dans le cadre de la Directive 82/471/CEE modifiée concernant certains produits utilisés dans l'alimentation des animaux. Il est établi selon les lignes directrices pour l'évaluation des risques des microorganismes génétiquement modifiés et leurs produits dérivés pour une utilisation en alimentation humaine et animale<sup>1</sup> et répond aux demandes des lignes directrices fixées par l'annexe II de l'arrêté du 27 août 1987 modifié<sup>2</sup>.

Après consultation des Comités d'experts spécialisés « Alimentation animale », réuni le 18 mars 2008, et « Biotechnologie », réuni le 20 mars 2008, l'Afssa rend l'avis suivant :

### Argumentaire

#### **A. Information générale**

Le produit, objet de la demande, est une matière première, co-produit de la production de L-lysine par fermentation d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée, dénommé PL73 *E. coli* (LYS). Le pétitionnaire préconise son utilisation en tant que produit azoté chez le porc à un taux maximum d'incorporation de 6 %, chez les ruminants à un taux maximum d'incorporation de 8 % et chez les salmonidés à un taux maximum d'incorporation de 13 %. Aucune utilisation en alimentation humaine n'est revendiquée.

Le pétitionnaire demande l'inscription de ce produit dans la catégorie 1.1.2 « Produits protéiques obtenus à partir des microorganismes – Bactéries - Bactéries produites sur substrats agricoles » selon l'arrêté du 27 août 1987 modifié et dans le groupe 2 : « produits complexes issus de MGM ne contenant ni MGM viable ni séquence d'ADN correspondant à un cadre de lecture ouverte d'un transgène » selon les lignes directrices pour l'évaluation des risques des microorganismes génétiquement modifiés.

La bactérie *Escherichia coli* dérivée de la souche *E. coli* K12 a été modifiée génétiquement pour obtenir une souche hautement productrice de lysine (souche recombinante N°10S ). N°10S a

27-31, avenue  
du Général Leclerc  
94701

Maisons-Alfort cedex  
Tel 01 49 77 13 50  
Fax 01 49 77 26 13  
www.afssa.fr

REPUBLIQUE  
FRANÇAISE

<sup>1</sup> The EFSA Journal (2006) 374, 1-115

<sup>2</sup> Arrêté du 27 août 1987 concernant certains produits azotés utilisés dans l'alimentation des animaux.

été construite à partir de la souche parentale dans laquelle ont été introduits par transformation deux plasmides. Les plasmides comportent 10 gènes fonctionnels provenant pour 9 d'entre eux d'*E. coli* K12, et pour un gène d'un autre microorganisme non pathogène.

La L-lysine produite par fermentation de la souche d'*Escherichia coli* modifiée est utilisée comme additif nutritionnel en alimentation animale.

## B. Informations relatives au microorganisme génétiquement modifié

### 1. Caractéristiques du microorganisme hôte

La souche réceptrice, qui a été génétiquement modifiée dérive de la souche originale de Lederberg *Escherichia coli* K12, largement utilisée par les laboratoires de génétique bactérienne. L'identification moléculaire de la souche parentale, de la souche intermédiaire et de la souche productrice de lysine a été vérifiée par ribotypage et sérotypage moléculaire à l'Institut Pasteur de Paris.

La souche K12 d'origine a été listée comme microorganisme non pathogène dont le caractère non toxigène est documenté et dont la mise en cause dans la genèse de réactions allergiques n'a jamais été rapportée.

Une série d'analyses a été réalisée afin de confirmer l'absence de pathogénicité (infectivité, toxigenicité et virulence) sur la souche réceptrice, sur une souche intermédiaire et sur la souche *E. coli*, à l'origine de certains gènes donneurs. Les résultats montrent que les bactéries :

- ne possèdent pas de gènes de facteurs de virulence,
- ne présentent pas de facteurs de pathogénicité,
- ne produisent pas d'entérotoxines ou de vérotoxine.

En conséquence, ces souches peuvent être classées dans le groupe 1 selon l'annexe III de la directive 200/54/EC (agent biologique dont le risque d'être responsable d'une maladie humaine est peu probable) et sont considérées comme non pathogènes.

La souche parentale ne possède pas de gène de résistance aux antibiotiques fonctionnels. Cependant, un gène de résistance à la tétracycline muté et un fragment du gène de résistance *npfII* sont présents dans son génome, sous une forme non fonctionnelle.

La souche parentale ne possède ni plasmide, ni élément de conjugaison, ni prophage (Lambda et P1). Comme dans *E. Coli* K12, plusieurs éléments mobiles d'insertion (Seq. IS) sont présents dans son génome.

### 2. Caractéristiques du microorganisme donneur des gènes d'intérêt

Les séquences introduites ou modifiées dans la souche finale N°10S ont toutes comme origine le génome ou des vecteurs/transposons d'*E. coli* K12 à l'exception :

- d'un élément dont l'organisme donneur est une autre souche *E. coli* non pathogène. Les études de pathogénicité réalisées sur cette souche confirment comme pour les souches intermédiaire et réceptrice qu'elle ne présente pas de caractère de pathogénicité,
- d'un gène provenant d'un autre microorganisme non pathogène largement utilisé en microbiologie industrielle.

### 3. Description de la transformation génétique

La souche parentale a été transformée par les plasmides pS183dT et pAKId14 pour donner la souche finale N°10S. Les plasmides ont été complètement séquencés et ne possèdent pas de cadre de lecture ouverte (ORF) inconnu.

**Le plasmide pS183dT** est composé de gènes et de séquences non-codantes provenant de différents plasmides. Il contient 5 gènes fonctionnels dont 4 sont des gènes du métabolisme d'*E. coli* dans le but d'améliorer le flux de synthèse de la lysine. Le 5<sup>ème</sup> gène code un marqueur de sélection basé sur un autre mécanisme que la résistance à un antibiotique. Le plasmide pS183dT, présent en faible nombre de copies, n'est pas conjugatif.

**Le plasmide pAKId14** est un dérivé d'un plasmide non conjugatif. Il possède 5 gènes fonctionnels : 4 gènes du métabolisme d'*E. coli* et le gène *npfI* (amino 3' phosphotransférase) qui confère la résistance à la kanamycine. Le plasmide pAKId14, présent en faible nombre de copies n'est pas conjugatif.

## 5. Informations relatives au Microorganisme Génétiquement Modifié.

La souche N°10S a été classée par la Commission du Génie Génétique (CGG) dans le Groupe I, classe I, confinement L1 en 2000. Cette souche est déposée dans une collection de souches japonaise selon les procédures du traité de Budapest.

La souche N°10S se distingue de la souche *E. coli* K12 et de la souche réceptrice par :

- la présence d'un élément provenant d'une autre souche *E. coli* non pathogène,
- l'apport de séquences et de gènes permettant la dérégulation des gènes de la voie de biosynthèse de la lysine provenant de *E. coli* K12,
- la présence des gènes augmentant l'efficacité de production de la lysine provenant de *E. coli* K12,
- la présence d'un gène permettant la sélection (autre que la résistance à un antibiotique),
- la présence du gène *nptI* conférant la résistance à la kanamycine,
- la présence d'un gène de résistance à la tétracycline et un fragment du gène de résistance *nptII* sous une forme non fonctionnelle.

Etant donné les multiples modifications génétiques réalisées pour aboutir à la souche de production N°10S, il est demandé au pétitionnaire de fournir un profil de résistance aux principaux antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire, incluant la tétracycline, de la souche finale N°10S.

La stabilité de la souche est un élément déterminant puisqu'une instabilité pourrait se traduire par un effet sur le processus de production de la L-lysine. La stabilité est contrôlée selon 3 méthodes, (i) dosage de la production de lysine après culture pendant 15 générations sans pression de sélection, (ii) contrôle du nombre de colonies possédant encore les deux plasmides après la fermentation (proche de 100 %), (iii) analyse du profil de restriction des plasmides isolés en fin de fermentation. Les résultats de ces contrôles n'ont jamais mis en évidence de délétions ou de recombinaisons inter ou intra-plasmidiques et montrent que la souche est stable. De plus, les gènes codant pour des marqueurs de sélection permettent de s'assurer de la présence des deux plasmides.

## C. Informations liées au produit Génétiquement Modifié

### 1. Informations liées au procédé de production

Le produit, objet de la demande, est une biomasse bactérienne tuée et inactivée, co-produit de la fermentation aérobie en « fed batch » d'*Escherichia coli* N°10S.

Les matières premières entrant dans la composition du milieu de culture sont de qualité alimentaire. Les sources de carbone sont des substrats d'origine agricole. Un agent anti-mousse est utilisé au cours du procédé. Il est autorisé en France comme auxiliaire technologique dans l'industrie sucrière<sup>3</sup> pour l'alimentation humaine.

Les conditions de fermentation sont décrites. La pureté et la constance de la souche de production sont vérifiées.

### 2. Informations liées au procédé de purification

Après fermentation, les bactéries sont inactivées par traitement acide et thermique qui selon la littérature conduit à la perte de viabilité des formes végétatives et à une dénaturation partielle de l'ADN. Ce procédé a fait l'objet d'une démarche HACCP. Dans ce cadre, il est souhaitable d'avoir accès aux données d'enregistrement des auto-contrôles.

L'efficacité du traitement d'inactivation thermique de la biomasse a été vérifiée par étalement du produit (3 g) sur milieu contenant de la kanamycine. Aucune bactérie n'a été détectée après l'étalement.

Dans le cadre de la demande d'autorisation d'un produit similaire (PT73 *E. coli* (THR) biomasse bactérienne, co-produit de la production de L-thréonine par fermentation d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée, en tant que produit azoté pour l'alimentation animale), des

<sup>3</sup> Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

expériences complémentaires ont montré l'absence de cellules viables et viables non cultivables dans le produit.

### 3. Description du produit

Le produit, objet de la demande, est un produit organique, biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production d'un acide aminé par fermentation sur substrats agricoles d'une souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée. Selon l'arrêté du 27 août 1987 modifié, l'étiquetage proposé par le pétitionnaire doit être complété par l'indication de la fermentation sur substrats agricoles avec citation de ceux-ci.

La composition chimique du produit a été déterminée sur trois lots dont un obtenu en conditions industrielles. Seul, ce lot peut être considéré comme représentatif du produit, objet de la demande. La variabilité des caractéristiques du produit doit être étudiée avec des analyses complémentaires réalisées à partir d'échantillons obtenus dans des conditions industrielles.

Les méthodes d'analyse utilisées et les résultats obtenus pour l'échantillon produit en conditions industrielles sont fournis. Les analyses microbiologiques du produit, objet de la demande, ne révèlent pas de contamination.

Les propriétés physiques du produit ont été établies sur l'échantillon obtenu en conditions industrielles.

Le comportement et la stabilité du produit en l'état et mélangé à des aliments destinés aux porcs ont été déterminés par des analyses microbiologiques et physicochimiques. Les résultats montrent une stabilité de la qualité microbiologique et physicochimique du produit en l'état pendant 12 mois de conservation et des aliments destinés au porc ainsi que des aliments destinés aux ruminants laitiers contenant jusqu'à 20 % du produit pendant 6 mois de conservation.

### 4. Evaluation de la présence d'ADN recombinant et du risque potentiel de transfert de gène

Le risque pris en compte dans cette évaluation concerne le transfert du gène de résistance à la kanamycine *nptI* apporté par l'un des deux plasmides introduits. Les autres gènes introduits sont des gènes du métabolisme d'*E. coli*. Cependant, un fragment de *nptII* (gène de résistance à la kanamycine) et un gène muté de résistance à la tétracycline sont aussi présents dans le génome de la bactérie, tous deux sous une forme non fonctionnelle.

Les plasmides pS183dT et pAKId14 ne sont pas conjugatifs et le risque principal serait le transfert génétique par transformation.

Plusieurs analyses ont été réalisées sur le produit fini pour définir l'état des cellules (voir § C2) et de l'ADN après le processus d'inactivation.

Concernant l'ADN purifié à partir de la biomasse, les expériences suivantes ont été réalisées :

- migration de l'ADN sur gel d'agarose,
- amplification PCR de fragment du gène *nptI*,
- transformation d'une souche bactérienne ayant une forte capacité de transformation.

Ces expériences montrent que la majorité des fragments ont une taille inférieure à 1 kb et que l'état de l'ADN n'a permis ni l'amplification, ni le transfert (par transformation) du gène entier *nptI*.

Considérant les caractéristiques de la résistance à la kanamycine apportées par le gène *nptI* :

- la kanamycine est peu utilisée comme antibiotique en thérapeutique humaine,
- la résistance à la kanamycine due au gène *nptI*, comme *nptII*, n'apporte pas la résistance à l'amikacine (dérivé de la kanamycine), antibiotique de « réserve » contre certaines infections nosocomiales,
- le gène *nptI*, comme *nptII*, est largement répandu dans la nature (sols et bactéries intestinales),

- Le gène *npfII* est classé dans le groupe I de la classification de l'AESA<sup>4</sup>.

En conclusion, sur la base de ces données, la possibilité de transfert de gène à partir de l'ADN présent dans la biomasse est très improbable. Concernant les gènes de résistance à la kanamycine *npfI* et *npfII*, si un transfert avait lieu, cela ne semble pas présenter de risque pour la santé humaine et animale. En revanche, bien que le gène muté de résistance à la tétracycline soit présenté comme non fonctionnel, il apparaît indispensable de fournir des données caractérisant ce gène et montrant l'absence d'ADN lui correspondant, compte tenu de son classement dans le groupe III de la classification AESA<sup>4</sup>.

## 6. Considérations du produit GM vis-à-vis de la santé humaine et animale

En l'absence de biomasse issue d'*Escherichia coli* non transformée autorisée comme aliment destiné à l'alimentation animale en Europe, une évaluation comparée de risques de type « équivalence en substances » est impossible. La biomasse bactérienne, objet de la demande, correspond à une nouvelle matière première sans historique de consommation par un animal en Europe, raison pour laquelle une évaluation complète des risques a été conduite.

### 6.1. Toxicologie

#### 6.1.1. Toxicité aiguë et sensibilisation

Un essai de toxicité aiguë par voie orale chez la ratte permet de fixer la DL50 du produit comme supérieure à 2 000 mg/kg de poids corporel. Deux essais d'irritation primaire cutanée et oculaire chez le lapin permettent de conclure à l'absence de potentiel irritant et corrosif aigu du produit sur la peau et à l'absence de caractère irritant du produit sur les yeux.

Un essai de toxicité aiguë par inhalation chez le rat montre un caractère irritant du produit pour le système respiratoire. En raison de la nature protéique du produit, le pétitionnaire considère qu'il possède un potentiel sensibilisant cutané. Ces résultats conduisent à établir des recommandations pour les travailleurs et donc à faire figurer les phrases de risque sur la fiche de sécurité du produit. La fiche de sécurité présentée dans le dossier correspond à cette attente.

#### 6.1.2. Toxicité subchronique et reprotoxicité

Un essai de toxicité subchronique par administration orale répétée pendant 3 mois chez le rat permet de fixer une dose sans effet de 3 % du produit dans l'aliment complet.

L'étude de la fonction de reproduction et du développement chez la ratte (traitement des jours 1 à 21 de la gestation) conclut à une dose sans effet de 8 % du produit dans la ration pour la maternotoxicité et de 15 % pour la foetotoxicité.

Conformément aux lignes directrices communautaires, ces études de toxicité devraient être complétées par un essai de reprotoxicité sur au moins deux générations en ligne directe, par un essai de tératogenèse chez le lapin et par un essai de toxicité chronique chez deux espèces animales dont l'une appartient à l'ordre des rongeurs (étude d'une durée supérieure ou égale à deux ans chez le rat ou étude d'une durée supérieure ou égale à 80 semaines chez la souris) et l'autre à une espèce non-rongeur.

#### 6.1.3. Génotoxicité

Un essai de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella typhimurium* et une souche d'*Escherichia coli*) et un essai de mutation génique sur des cellules de lymphome de souris ne montrent pas d'induction de mutations géniques. Un essai de mutation chromosomique sur des cellules ovariennes de hamster chinois en culture permet de conclure

<sup>4</sup> Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants, EFSA Journal, 2004, 48, p.1-18.

**Group I** It is therefore extremely unlikely (if at all) that the presence of these antibiotic resistance genes in the genome of transgenic plants will change the already existing bulk spread of these antibiotic resistance genes in the environment or will impact significantly on human and animal health.

**Group III** antibiotic resistance genes which confer resistance to antibiotics highly relevant for human therapy and, irrespective of considerations about the realistic value of the threat, should be avoided in the genome of transgenic plants to ensure the highest standard of preventive health care.

que le produit n'induit pas d'aberrations chromosomiques. Ces trois études permettent de conclure à l'absence de potentiel génotoxique du produit.

#### 6.1.4. Etudes sur espèces cibles

Le pétitionnaire revendique l'utilisation du produit chez le porc, les ruminants et les salmonidés.

Chez le porc en croissance-finition, les résultats de l'essai de tolérance ne montrent aucun effet néfaste jusqu'à 5 % de produit incorporé dans l'aliment. Au-delà de 5 %, les performances de croissance des porcs sont dégradées et le taux de bilirubine plasmatique augmenté.

L'essai de tolérance mené chez la vache laitière ne permet pas de conclure sur la tolérance du produit en raison d'une durée trop courte (4 semaines) et de l'absence de mesures de paramètres sanguins.

Un essai de tolérance doit être conduit chez les salmonidés.

En raison des éléments manquants dans le dossier toxicologique, il n'est pas possible de statuer sur l'innocuité des denrées d'origine animale pour le consommateur humain.

Le pétitionnaire indique que l'agent anti-mousse utilisé dans le procédé de production du produit est susceptible d'être retrouvé dans les tissus comestibles. Il convient que des données quantitatives sur la présence de cet agent anti-mousse dans le produit lui-même et dans les produits animaux consommés par l'Homme soient fournies à partir de lots de produit obtenus avec le taux maximum d'utilisation de l'agent anti-mousse.

#### 6.9. Evaluation nutritionnelle du produit

Des mesures *in vitro* de digestibilité et de dégradabilité du produit montrent une faible dégradabilité ruminale. La valeur azotée et la valeur énergétique ont été évaluées chez le ruminant.

Des essais de digestibilité ont été menés chez le porc, le mouton et la truite arc-en-ciel.

Chez le porc, les digestibilités iléale apparente et fécale du produit, objet de la demande, sont élevées.

Le produit n'ayant pas été substitué aux différents aliments de la ration dans les mêmes proportions, l'essai de digestibilité sur mouton n'est pas recevable.

Pour la truite arc-en-ciel, les digestibilités observées du produit sont inférieures à celles de la farine de poisson, matière première de référence.

Des essais de performances ont été conduits chez la vache laitière, le porc et la truite arc-en-ciel.

Chez la vache laitière, un taux d'incorporation du produit jusqu'à 7,3 % de la ration ne modifie ni la consommation alimentaire, ni la production et la composition du lait.

Chez le porc, la vitesse de croissance et l'efficacité alimentaire diminuent linéairement avec l'augmentation du taux d'incorporation du produit dans la ration et de façon significative à partir de 9 %. Toutefois, en raison des tests de tolérance, l'incorporation du produit ne doit pas être supérieure à 5 % de la ration pour les porcs en croissance-finition.

Les performances de croissance mesurées chez des truites arc-en-ciel ont été réalisées par remplacement de la farine de poisson par le produit, objet de la demande, jusqu'à 60 % de substitution. A partir de 40 % du produit incorporé dans l'aliment, l'efficacité alimentaire et la croissance des poissons se sont révélées plus faibles que celles des poissons recevant une alimentation témoin. Les paramètres zootechniques et morphométriques sont identiques jusqu'à 20 % de substitution de la farine de poisson.

Les qualités organoleptiques du lait ont été évaluées par comparaison de laits de vaches recevant de 0 à 20 % de produit dans leur ration. Aucune modification n'a été enregistrée selon les normes de l'International Dairy Federation.

Les caractéristiques de la viande de porc sont similaires entre des porcs nourris avec ou sans le produit, objet de la demande.

### Conclusions

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que les éléments scientifiques fournis sont insuffisants pour statuer sur une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-lysine par fermentation d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée, en tant que produit azoté pour l'alimentation animale en l'absence :

- d'un antibiogramme de la souche de production N°10S, par rapport à la souche d'origine K12 pour les principaux antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire, incluant la tétracycline,
- des données d'enregistrement des autocontrôles du plan HACCP liés au processus d'inactivation de la biomasse bactérienne,
- des données complémentaires caractérisant le gène muté de résistance à la tétracycline et montrant l'absence de fragment pleine longueur correspondant à ce gène dans la biomasse inactivée,
- de l'étude de la variabilité des caractéristiques du produit par comparaison avec d'autres échantillons issus de production en conditions industrielles,
- de données quantitatives de la présence d'anti-mousse dans le produit, objet de la demande, et dans les denrées alimentaires issues des animaux nourris avec le produit,
- d'études complémentaires en toxicologie conformément aux lignes directrices en vigueur,
- d'un essai de tolérance chez les ruminants et les salmonidés.

**Mots clé :** MGM, produit azoté, biomasse bactérienne, *Escherichia coli*, co-produit, alimentation animale, porc, ruminants, salmonidés.

**La Directrice Générale**

**Pascale BRIAND**