

Maisons-Alfort, le 14 juin 2006

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une alpha-amylase  
produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* porteuse d'un gène  
hybride de *Thermococcus* codant l'alpha-amylase en amidonnerie  
et dans l'industrie de l'alcool**

LA DIRECTRICE GENERALE

Par courrier reçu le 15 février 2006, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 13 février 2006 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une alpha-amylase produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* porteuse d'un gène hybride de *Thermococcus* codant l'alpha-amylase en amidonnerie et dans l'industrie de l'alcool, adressée par le bureau C2.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé «Biotechnologie », réuni le 20 avril 2006, l'Afssa rend l'avis suivant :

### **Applications technologiques envisagées – mécanisme d'action**

#### Activité enzymatique principale

Considérant que l'enzyme est une  $\alpha$  (1,4) D-glucane glucanohydrolase (ou  $\alpha$ -amylase, EC 3.2.1.1.) ;

Considérant que l'enzyme hydrolyse les liaisons endo- $\alpha$ -(1,4)-D-glucosidiques des polysaccharides de l'amidon en dextrines solubles et oligosaccharides ;

#### Activités enzymatiques secondaires

Considérant qu'aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'est indiquée mais que les méthodes d'analyse ne sont pas présentées ;

#### Applications technologiques

Considérant que la préparation enzymatique est un auxiliaire technologique destiné à la liquéfaction de l'amidon en amidonnerie et dans l'industrie de l'alcool ;

### **Souche de production**

#### Sécurité du micro-organisme producteur

Considérant que la souche initiale est la souche non-pathogène et non-toxinogène *Pseudomonas fluorescens* Biovar I MB 101 ;

#### Obtention de la souche de production

Considérant que la souche de production de la préparation enzymatique est la souche *Pseudomonas fluorescens* DC88 génétiquement modifiée ;

Considérant que la souche de production a été classée dans le Groupe I, classe 1, confinement L1 par la CGG<sup>1</sup> pour la production d'alpha-amylase envisagée ;

Considérant que la séquence codante du gène d'intérêt a été construite à partir de trois gènes de différentes souches de *Thermococcus* ;

Considérant que la transformation de la souche initiale a été faite avec deux plasmides dont les séquences ne sont pas fournies ;

Considérant que la stabilité des plasmides dans la souche de production est démontrée ;

Considérant que la méthode d'étude de la mobilisation potentielle des plasmides n'est pas présentée ;

### **Procédé de fabrication de la préparation enzymatique**

Considérant que le procédé de production de la préparation enzymatique n'est pas décrit précisément (composition détaillée du milieu de culture, mode de fermentation ...) ;

Considérant que les étapes de la purification et de la formulation de la préparation enzymatique sont insuffisamment décrites (méthode de pasteurisation du moût, méthode de lyse des bactéries, porosité des membranes de microfiltration, hydrolyse de l'ADN, identité des conservateurs ...) ;

### **Préparation enzymatique**

#### Critères de pureté

Considérant que les critères de pureté chimique et biologique répondent aux exigences de l'arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi de préparations enzymatiques dans la fabrication de certaines denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine, en dehors de la non-recherche des souches de *Staphylococcus aureus* et des anaérobies sulfite-réducteurs ;

Considérant que le pétitionnaire indique la présence d'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D Thiogalactopyranoside) dans la préparation enzymatique ;

Considérant que la concentration d'IPTG indiquée dans le produit fini ne correspond pas à la concentration calculée dans le cadre d'une utilisation à la dose de préparation enzymatique recommandée par le pétitionnaire ;

Considérant que la présence d'une endonucléase ou d'un acide minéral destinés à l'hydrolyse de l'ADN dans la préparation enzymatique n'est pas renseignée ;

Considérant que l'identité des conservateurs ajoutés à la préparation enzymatique n'est pas indiquée ;

#### Données de sécurité

Considérant que toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE<sup>2</sup> et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire ;

Considérant que les résultats des études de toxicité ne sont pas présents dans le dossier ;

Considérant que l'étude de toxicité par administration orale pendant 5 jours chez le rat révèle des altérations intestinales ;

<sup>1</sup> Commission de Génie Génétique

<sup>2</sup> Organisation de Coopération et de Développement Economiques

Considérant que le test de toxicité orale sub-chronique à 90 jours chez le rat met en évidence des effets délétères (inflammation chronique de la muqueuse nasale, hyperplasie de cellules myéloïdes) ;

Considérant, par conséquent, que la valeur NOAEL<sup>3</sup> indiquée ne peut être retenue ;

Considérant que l'étude de toxicité par voie alimentaire pendant 14 jours chez le rat n'a révélé aucun effet délétère clinique, biologique ou histologique ;

Considérant que l'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur des souches de *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* auxotrophes) n'a révélé aucune augmentation du nombre de révertants en présence de la préparation enzymatique et donc aucun effet mutagène ;

Considérant que le test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes de rats en culture n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de la préparation enzymatique ;

Considérant que le test de mutation avancé sur lymphome de souris et le test du micronucleus de moelle osseuse de souris ne montrent aucun effet néfaste ;

Considérant que le facteur de sécurité ne peut être calculé en l'absence d'une NOAEL ;

#### **Devenir de la préparation enzymatique dans le produit final**

Considérant que l'inactivation de l'enzyme dans le produit fini n'est pas démontrée ;

Considérant qu'une comparaison de la séquence protéique de l'enzyme avec des séquences de protéines connues comme allergènes ne détecte aucune homologie sur 8 acides aminés consécutifs,

#### **Conclusion :**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que, au vu des éléments manquants et imprécisions du dossier, et notamment en l'absence de :

- présentation des méthodes d'analyse des activités enzymatiques secondaires,
- fourniture des séquences complètes des deux plasmides,
- démonstration de la non-mobilisation des plasmides,
- présentation exhaustive des procédés de production et de purification de la préparation enzymatique,
- recherche des souches de *Staphylococcus aureus* et des anaérobies sulfite-réducteurs,
- indication de la concentration en IPTG dans la préparation enzymatique,
- concentration et conditions d'inactivation de l'endonucléase dans la préparation enzymatique,
- concentration de l'acide minéral ajouté dans la préparation enzymatique,
- identité et concentration des conservateurs alimentaires ajoutés dans la préparation enzymatique,
- données complètes des études de toxicité conduites sur la préparation enzymatique,
- démonstration de l'innocuité de la préparation enzymatique par un test de toxicité orale sub-chronique à 90 jours chez le rat,
- indication d'une NOAEL,
- calcul d'un facteur de sécurité,
- démonstration de l'inactivation de l'enzyme dans le produit fini,

<sup>3</sup> No Observed Adverse Effect Level

l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi d'une alpha-amylase produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* porteuse d'un gène hybride de *Thermococcus* codant l'alpha-amylase (DC88) en amidonnerie et dans l'industrie de l'alcool, ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire. L'Afssa rend donc un avis défavorable à cette demande.

**Pascale BRIAND**