



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 27 octobre 2008

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
sur le dossier de renouvellement d'autorisation d'une biomasse bactérienne
tuée et séchée, co-produit de la production de L-lysine par fermentation d'une
souche de *Corynebacterium glutamicum* 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 1^{er} août 2008 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis sur le dossier de renouvellement d'autorisation d'une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-lysine par fermentation d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* génétiquement modifiée, en tant que produit azoté pour l'alimentation animale, au titre du règlement (CE) 1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-RX-PL73).

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. Le dossier a été établi selon les lignes directrices relatives à l'évaluation des risques des microorganismes génétiquement modifiés et de leurs produits dérivés pour une utilisation en alimentation humaine et animale¹ et répond aux demandes des lignes directrices fixées par l'annexe II de l'arrêté du 27 août 1987 modifié².

Après consultation des Comités d'experts spécialisés « Biotechnologie », réuni le 10 octobre 2008 et « Alimentation animale », réuni le 21 octobre 2008, l'Afssa rend l'avis suivant :

Argumentaire

A. Information générale

Le produit, objet de la demande, est une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-lysine par fermentation de la souche bactérienne *Corynebacterium glutamicum*. La souche était nommée initialement *Brevibacterium lactofermentum* puis a été classée comme *Corynebacterium glutamicum*, après des études de taxonomie.

Ce co-produit est sur le marché depuis 1976. En 1998, cette souche a été remplacée par une souche génétiquement modifiée. Aucun effet néfaste n'a été déclaré sur ces années d'exploitation. Aucune donnée d'utilisation sur le marché n'est fournie par le pétitionnaire.

Selon les termes de la saisine, ce dossier est une demande de renouvellement après plus de 10 ans d'autorisation, selon le règlement n°1829/2003 relatif aux denrées et aliments pour animaux dérivés d'OGM.

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

¹ The EFSA Journal (2006) 374, 1-115

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

Avant la mise en place du règlement (CE) n°1829/2003, aucune procédure spécifique n'était prévue pour les dérivés d'OGM destinés à l'alimentation animale. Le co-produit, objet de la demande n'a jamais été évalué par l'Afssa.

Le pétitionnaire préconise l'utilisation de ce produit en tant que produit azoté à un taux maximum d'incorporation chez les ruminants de 11 à 12 %, chez le porc et les salmonidés de 10 %, la destination principale étant l'alimentation des ruminants avec un taux d'incorporation moyen de 5 à 8 %.

La production annuelle de produit, objet de la demande, est de 8 000 à 14 000 tonnes par an. Aucune utilisation en alimentation humaine n'est revendiquée.

Le pétitionnaire demande le renouvellement de 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.

B. Informations relatives au microorganisme génétiquement modifié

1. Caractéristiques du microorganisme hôte

La bactérie réceptrice est SO317. La souche SO317 dérive de la souche originale 2256. Après plusieurs étapes de mutagenèse, principalement dans des séquences de régulation, la souche SO317 a été sélectionnée pour son efficacité de production de L-lysine. La souche originale 2256 a été classée en 1991 comme *Corynebacterium glutamicum* après les études taxonomiques de Liebl *et al.*³. Cette taxonomie a été confirmée par ribotypage et sérotypage.

Corynebacterium glutamicum est non pathogène et est connue pour la production d'acides aminés et son innocuité depuis près de 50 ans. Son innocuité est confirmée par une étude bibliographique effectuée en 2004 à l'Institut Pasteur de Paris⁴.

Son temps de doublement inférieur à 1h passe à plusieurs heures dans le cas de la production de L-lysine.

La souche *C. glutamicum* 2256 et la souche réceptrice SO317 ne possèdent pas de gènes de résistance à des antibiotiques transférables mais aucun antibiogramme des souches n'a été fourni.

La souche parentale *C. glutamicum* 2256 possède un plasmide cryptique qui a été éliminé. En conséquence, la souche réceptrice SO317 est exempte de plasmide. La recherche de prophages, d'éléments mobiles ou de séquences d'insertion (IS) n'a pas été mentionnée.

2. Caractéristiques du microorganisme donneur des gènes d'intérêt

Les gènes d'intérêt sont portés par le plasmide pCABL

Les séquences introduites ont pour origine :

- le génome de *Corynebacterium glutamicum*
- des séquences d'un plasmide de *Corynebacterium glutamicum*
- des séquences d'un plasmide d'*E. coli*.

3. Description de la transformation génétique

La modification génétique consiste en l'introduction du plasmide réplcatif pCABL dans la souche SO317 pour donner la souche finale hyper-productrice de L-lysine. La séquence du plasmide est fournie ainsi que la description et l'origine de tous les éléments fonctionnels.

Le plasmide pCABL dérive d'un plasmide naturel de *C. glutamicum* 2256 dont un fragment de 4451 pb persiste. Pour créer un système navette entre *Corynebacterium* et *E. coli*, des séquences *Ori* (permettant la réplcation chez *E. coli*) et le gène *nptI* (conférant la résistance à la kanamycine) ont été ajoutés. Enfin, dans le but d'augmenter la production de L-lysine, cinq gènes d'intérêt provenant du génome de *Corynebacterium glutamicum* ont été intégrés au plasmide.

pCABL est un plasmide qui se réplique à bas nombre de copies (8 à 10 copies par cellule).

³ Liebl W, Ehrmann M, Ludwig W, Schleifer KH. Int J Syst Bacteriol., 1991, 41-255-260.

⁴ Grimont PAD et Le Flèche A. Institut Pasteur, 2004.

5. Information relative au Microorganisme Génétiquement Modifié

La souche productrice SO317/pCABL est déposée dans une collection japonaise reconnue par le traité de Budapest sous le numéro FERM BP-10045.

En 1996, le Comité d'expert français en Génie Génétique (CGG) l'a classée dans le groupe I : « sans risque pour la santé humaine et pour l'environnement ».

En comparaison avec la souche réceptrice SO317, la souche SO317/pCABL possède les gènes portés par le plasmide pCABL (voir section B2 et B3).

Phénotypiquement, la souche SO317/pCABL se distingue de la souche réceptrice par :

- une plus grande efficacité de production de L-lysine
- une résistance à la kanamycine.

La stabilité génétique et phénotypique de la souche finale productrice de L-lysine a été contrôlée par trois méthodes : (i) dosage de la production de lysine après culture pendant 15 générations sans kanamycine, (ii) contrôle du nombre de colonies possédant encore le plasmide après un test de fermentation sans kanamycine, (iii) extraction de l'ADN plasmidique et analyse de sa carte de restriction. Les résultats de ces analyses montrent que la souche finale productrice de L-lysine est stable.

A l'exception du gène codant pour la résistance à la kanamycine (*nptI*), les autres gènes portés par le plasmide sont des gènes du métabolisme général de *C. glutamicum*. Le plasmide est non conjugatif. L'analyse de la capacité potentielle de transfert de gènes vers un autre organisme est décrite ci dessous §C4.

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 » de la souche productrice de lysine *Corynebacterium glutamicum* SO317/pCABL.

Le procédé de production est décrit mais la fiche technique de la résine échangeuse de cations doit être fournie. 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 sucrière⁵ pour l'alimentation humaine. Les tests de toxicité réalisés sur l'anti-mousse révèlent une très faible toxicité aiguë et une absence de potentiel mutagène. Les mesures permettant de s'assurer de la qualité en production ne sont pas indiquées.

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 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 serait souhaitable de décrire les points de contrôle de cette procédure et de fournir quelques exemples de données d'enregistrement des auto-contrôles réalisées dans le cadre de la production commerciale de ce produit.

L'efficacité du traitement d'inactivation de la biomasse a été vérifiée par étalement du produit (essai réalisé à partir de 2 g de produit). Cet étalement n'a pas permis d'observer la présence de cellules viables de la souche SO317/pCABL.

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 de *Corynebacterium glutamicum* génétiquement modifiée. Son étiquetage actuel est conforme à la réglementation.

La composition chimique du produit a été déterminée sur trois lots obtenus en conditions industrielles. La variabilité des caractéristiques physicochimiques est déterminée. Les méthodes d'analyse utilisées et les résultats obtenus sont fournis.

⁵ Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

Les analyses microbiologiques du produit, objet de la demande, montrent des teneurs conformes à la réglementation sauf pour les résultats des dénombrements de la flore aérobie totale (variation de $5,4 \times 10^4$ à $1,6 \times 10^5$ ufc/g) et de *Bacillus cereus* (variation de $3,0 \times 10^4$ à $9,2 \times 10^4$ ufc/g). La bactérie *Bacillus cereus* est un agent d'intoxication alimentaire pour lequel des limites de 100 à 1000 ufc/g dans des denrées alimentaires sont recommandées par l'Afssa (avis du 13 mars 2008). Aucune hypothèse n'est formulée par le pétitionnaire sur l'origine de cette contamination.

Les propriétés physiques du produit ont été établies.

Le comportement et la stabilité du produit en l'état et mélangé à des aliments destinés aux vaches laitières 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 contenant jusqu'à 20 % du produit pendant 6 mois de conservation avec quelques modifications de paramètres physiques (odeur, couleur, dureté, durabilité).

Les méthodes de contrôle du produit ne sont pas indiquées.

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

Le plasmide pCABL n'est pas conjugatif, le risque principal à considérer est le transfert génétique par transformation. Plusieurs analyses ont été réalisées sur le produit fini pour définir l'état de l'ADN après le processus d'inactivation. Les résultats de ces analyses montrent que l'ADN est présent mais fortement dégradé, il est inactif et ne permet pas la transformation de *Corynebacterium glutamicum* ou d'*E coli* sur la base d'une sélection en présence de kanamycine.

Le transfert du gène *nptI* classé dans le groupe I⁶ de la classification de l'AESA, bien qu'improbable ne semble pas présenter de risque pour la santé humaine et animale. Cependant, il est à noter que la néomycine est un antibiotique utilisé en médecine vétérinaire.

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

6.1. Toxicologie

6.1.1. Toxicité aiguë et sensibilisation

Un essai de toxicité aiguë a été réalisé chez des rats (2 groupes de 3 animaux) auxquels une dose unique de 2000 mg de produit /kg de poids corporel a été administrée par voie orale. Aucun effet néfaste n'est observé après 15 jours d'observation. Cet essai permet de déterminer une DL50 supérieure à 2000 mg de produit / kg p.c..

D'autres essais de toxicité aiguë par inhalation chez le rat ainsi que des essais permettant d'évaluer le caractère irritant pour la peau et pour les yeux réalisés chez le lapin montrent que le produit peut être considéré comme une substance n'induisant pas de toxicité par inhalation et non irritant pour la peau et les yeux.

Toutefois, compte tenu de sa forte teneur en protéines, il doit être considéré comme potentiellement sensibilisant. Des recommandations doivent être transmises pour les travailleurs ayant à le manipuler.

6.1.2. Toxicité subchronique et reprotoxicité

Un essai de toxicité sub-chronique par administration orale répétée pendant treize semaines chez le rat a été réalisé. Le produit a été administré quotidiennement aux animaux aux doses de 0, 1,5, 4,1 et 8,2 g/ kg de poids corporel chez le mâle et de 0, 1,7, 4,5 et 9,1 g/ kg de poids corporel chez la femelle.

⁶ Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants, EFSA 2004, Journal, 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.

Les conditions de l'étude (choix des doses, du témoin...) ne permettent pas de conclure sur l'évaluation toxicologique de ce produit. Compte tenu de l'absence de données précises permettant d'apprécier la quantité quotidienne ingérée par les espèces cibles en g de produit/ kg de poids corporel, les résultats des études de toxicologie réalisées sont inutilisables puisqu'elles ne permettent pas de déterminer de marge de sécurité.

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, même en présence de système métabolique activateur.

Un essai de mutation chromosomique sur des cellules ovariennes de hamster chinois, en culture ne conduit pas à l'observation d'aberrations chromosomiques. Cet essai permet également de conclure que le produit évalué est non clastogène, même en présence de système métabolique activateur.

6.1.4. Etudes sur espèces cibles

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

Chez la vache laitière, les résultats de l'essai de tolérance ne montrent aucun effet néfaste jusqu'à 10 % de produit incorporé dans l'aliment mais la durée d'essai est jugée trop courte (4 semaines) pour pouvoir mettre en évidence un effet. Des essais de tolérance doivent être conduits chez les porcs et les salmonidés. Par ailleurs, les conditions expérimentales (données manquantes liées à des diarrhées fréquentes) invalident cet essai.

6.9. Evaluation nutritionnelle du produit

Des mesures *in vitro* de digestibilité et de dégradabilité du produit montrent une faible dégradabilité ruminale susceptible d'avoir des répercussions sur la digestibilité intestinale et donc sur la biodisponibilité du produit chez les ruminants.

L'évaluation de la valeur nutritive du produit doit être précisée en raison d'une grande variabilité des estimations. Les éléments du dossier révèlent que le produit est une matière première peu dégradable, à faibles valeurs énergétique et azotée en regard de la teneur en azote du produit.

Un essai de performance sur vache laitière et deux essais de tolérance ont été menés avec une inclusion du produit jusqu'à 20 % de la matière sèche. Ces différents essais conduisent à recommander une incorporation du produit ne dépassant pas 10 % de la matière sèche du fait de la réduction des performances au-delà de cette dose.

Une étude comparative des caractéristiques du lait issu de vache nourrie ou non avec le produit ne montre pas de différences.

Aucun résultat n'est fourni sur l'utilisation du produit chez le porc et les salmonidés.

Conclusions

Concernant le micro-organisme génétiquement modifié :

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que du fait :

- de la non-pathogénicité démontrée de la souche ainsi que des souches étant à l'origine des gènes introduits par la transformation génétique,
- de la nature des gènes apportés par la transformation génétique,
- de l'efficacité du procédé d'inactivation sur les concentrats aboutissant à l'absence de cellules viables,
- de l'improbabilité de transfert de l'ADN vers d'autres organismes,

la construction génétique de cette souche ne montre aucun apport, délétion ou modification de matériel génétique susceptible de créer des conditions de pathogénie ou de créer un quelconque danger pour le consommateur animal.

Concernant le produit, biomasse bactérienne destinée à l'alimentation animale :

L'Afssa considère que les éléments scientifiques sont insuffisants pour statuer sur la sécurité d'une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-lysine par fermentation de *Corynebacterium glutamicum* génétiquement modifiée en l'absence d'une évaluation effective du risque toxicologique du produit. De plus, l'Afssa ne peut se prononcer sur l'utilisation en tant que produit azoté de ce produit chez les ruminants en raison de l'insuffisance de la durée d'essai de tolérance et chez le porc et les salmonidés en l'absence d'études chez ces espèces.

L'origine des concentrations élevées en *Bacillus cereus* dans le produit doit être expliquée.

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

**La directrice Générale
Pascale BRIAND**