



AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment
ou d'un ingrédient alimentaire : préparation enzymatique contenant une activité
prolyl-oligopeptidase pour une utilisation dans les compléments alimentaires**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 4 mai 2012 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : « Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou ingrédient alimentaire : préparation enzymatique contenant une activité prolyl-oligopeptidase pour une utilisation dans les compléments alimentaires ».

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le nouvel ingrédient (NI) est une préparation enzymatique produite par la souche recombinée d'*Aspergillus niger* GEP44 contenant une activité enzymatique principale prolyl-oligopeptidase. Une préparation enzymatique semblable est autorisée en tant qu'auxiliaire technologique en brasserie et pour la production d'hydrolysats de protéines par l'arrêté du 27 août 2009 publié au JORF le 16 octobre 2009. Elle a fait l'objet d'un avis de l'Afssa du 26 avril 2005.

La prolyl-oligopeptidase clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxyl des résidus proline. Elle appartient à la famille des sérine peptidases S28. Le pétitionnaire souhaite que le NI soit autorisé comme ingrédient dans des compléments alimentaires destinés aux personnes intolérantes au gluten.

L'intolérance au gluten ou maladie cœliaque est une entéropathie auto-immune déclenchée par l'ingestion de gluten chez des individus génétiquement prédisposés. Le gluten est présent dans l'albumen de certaines céréales (blé, seigle...). Il est composé en majorité de gliadines et gluténines, protéines de réserve des céréales. Au cours de la panification, le gluten forme un réseau visco-élastique emprisonnant le CO₂ dégagé lors de la fermentation anaérobie des sucres présents dans la pâte. Après consommation de

denrées à base de céréales contenant du gluten (pain, pâtes alimentaires...), les protéines du gluten, transformées au niveau de l'intestin grêle, peuvent entraîner chez les sujets à risque, une réaction inflammatoire au niveau de la muqueuse intestinale à l'origine, dans les formes classiques de la maladie, d'une atrophie villositaire et d'un syndrome de malabsorption intestinale. La prévalence de la maladie coéliqua a longtemps été sous-estimée du fait de l'existence de formes asymptomatiques (formes silencieuses et formes latentes), qui représentent actuellement la majorité des cas diagnostiqués chez l'adulte. Sa prévalence est aujourd'hui estimée aux alentours de 1 % de la population générale en Europe et en Amérique du Nord. Le traitement de la maladie coéliqua est le régime sans gluten à vie, c'est-à-dire l'éviction totale et définitive de tous les aliments contenant du blé, de l'orge et du seigle (Malamut et Cellier, 2010 ; FDA, 2006). L'avoine serait tolérée par la majorité des patients mais la prudence s'impose car l'avoine présente dans les produits du commerce peut contenir une part de blé. Le régime sans gluten est une source de contraintes importante pour le patient et sa famille, tant sur le plan psycho-social qu'économique. La prescription médicale du régime sans gluten doit donc être réalisée une fois le diagnostic de maladie coéliqua confirmé.

Le pétitionnaire considère que le NI appartient à la classe 5.1 définie dans la recommandation 97/618/CE de la Commission européenne regroupant les NI constitués de « micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) ou produits à partir de tels micro-organismes » et « le micro-organisme hôte dans lequel est introduite une modification génétique a déjà été utilisé comme aliment ou comme source d'aliment dans la Communauté, dans des conditions de préparation et de consommation comparables ». Différentes souches d'*Aspergillus niger* sont utilisées comme souches productrices d'enzymes alimentaires autorisées comme auxiliaires technologiques pour certaines applications. L'utilisation d'une enzyme en tant qu'auxiliaire technologique ne lui donne pas un historique de consommation en tant qu'aliment et donc, l'espèce *Aspergillus niger* ne peut être considérée comme un aliment ou comme une source d'aliment dans la Communauté. La classe 5.2 est donc plus adéquate pour ce NI : NI constitué de « micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) ou produits à partir de tels micro-organismes » et « le micro-organisme hôte dans lequel est introduite une modification génétique n'a jamais été utilisé comme aliment ou comme source d'aliment dans la Communauté, dans des conditions de préparation et de consommation comparables ».

Les informations requises pour les NI de classe 5.2 sont :

- I. Spécification du NI
- II. Effet du procédé de production appliqué au NI
- III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI
- IV. Effet de la modification génétique sur les propriétés de l'organisme hôte
- V. Stabilité génétique de l'OGM utilisé comme source de NI
- VI. Spécificité de l'expression du nouveau matériel génétique
- VII. Transfert de matériel génétique à partir de MGM
- VIII. Aptitude du micro-organisme génétiquement modifié à survivre dans l'intestin humain et à le coloniser
- IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévus du NI
- X. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI
- XI. Informations d'ordre microbiologique sur le NI
- XII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par les comités d'experts spécialisés (CES) « Biotechnologie » et « Nutrition humaine », sur la base de rapports initiaux rédigés indépendamment par 4 rapporteurs entre le 24 mai et le 21 août 2012.

Ce dossier entre dans le cadre du Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Le dossier de demande d'autorisation d'un nouvel aliment ou nouvel ingrédient alimentaire doit être établi selon la recommandation de la Commission du 29 juillet 1997¹.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

Cette expertise porte sur une préparation enzymatique contenant une activité principale prolyl-oligopeptidase (NI) et non pas sur les compléments alimentaires contenant ce NI. La formulation de ces compléments alimentaires (composition dont potentiellement d'autres préparations enzymatiques ou des substances à but nutritionnel ou physiologique) pouvant générer des interactions ou des surdosages ne peut être analysée en l'absence de données. Une autre réglementation² s'appliquera à la commercialisation des compléments alimentaires contenant le NI.

I. Spécification du NI

Le NI est une préparation enzymatique avec une activité enzymatique principale prolyl-oligopeptidase (E.C. 3.4.21.26), protéine glycosylée de 526 acides aminés et de 66 kDa. Une activité enzymatique secondaire, alpha-amylase, est présente.

La prolyl-oligopeptidase clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxyl des résidus proline et libère des peptides et de la proline. Elle présente une activité maximale à pH 4,6 et 50 °C. L'enzyme est inactivée après 5 min à 99 °C.

Selon les spécifications indiquées par le pétitionnaire, le NI se présente sous forme de microgranulés de couleur quasi-blanche à crème avec une matière sèche supérieure à 90 %, une activité prolyl-oligopeptidase supérieure à 45 PPU³/g de TOS⁴ et une concentration de benzoate de sodium inférieure à 0,1 %. Les teneurs maximales spécifiées pour les métaux lourds et les contaminants biologiques sont : plomb ≤ 5 mg/kg, arsenic ≤ 3 mg/kg, cadmium ≤ 0,5 mg/kg, mercure ≤ 0,5 mg/kg, absence d'activité antimicrobienne, comptage sur plaque < 5.10⁴/g, anaérobies sulfite-réductrices < 30 cfu/g,

¹ Recommandation de la Commission du 29 juillet 1997 (97/618/CE) concernant les aspects scientifiques relatifs à la présentation des informations requises pour étayer des demandes d'autorisation de mise sur le marché de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires et l'établissement de rapports d'évaluation initiale au titre du règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil.

² Décret n° 2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires

³ Prolyl peptidase unit : une « PPU » est définie comme la quantité d'enzyme libérant le p-nitroanilide à une vitesse de 1 µmol par minute à partir du substrat synthétique z-gly-Pro-pNA (carbobenzoxy-glycine-p-nitroanilide) à pH 4,6 et à 37°C

⁴ Total organic solids, composés organiques solides

coliformes < 30 cfu/g, salmonelles : absence dans 25 g, *Escherichia coli* : absence dans 25 g, *Staphylococcus aureus* : absence dans 1 g, moisissures < 10 cfu/g, levures < 10 cfu/g et absence des mycotoxines usuellement analysées.

Une unité d'activité de prolyl-oligopeptidase (PPU) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de p-nitroanilide par minute à partir d'un substrat synthétique (carbobenzoxy-glycine-proline-p-nitroanilide) à pH 4,6 et 37 °C.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du CES « Biotechnologie ».

II. Effet du procédé de production appliqué au NI

Selon le pétitionnaire, le NI est produit à partir de la souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée GEP 44 porteuse du gène *gepA* d'*Aspergillus niger* G306. Le pétitionnaire présente la généalogie de la souche de production, les constructions génétiques, la transformation, le nombre de copies du transgène intégrées dans le génome.

Le NI est produit sous les bonnes pratiques de production pour l'alimentation humaine. Le pétitionnaire déclare que l'organisme hôte est non pathogène, ne produit aucune toxine connue et possède un historique d'utilisation industrielle sûre. La souche parentale et par conséquent, la souche de production ont une durée de vie limitée en dehors des conditions optimales du fermenteur. La souche de production ne contient pas de gène de résistance à un antibiotique.

Le NI est produit par fermentation submergée contrôlée de la souche d'*Aspergillus niger* GEP 44. Le procédé de production comprend la fermentation, la purification et la formulation du produit. Tous les ingrédients et auxiliaires technologiques utilisés sont de qualité alimentaire. Aucun conservateur n'est ajouté. Les résultats d'analyse du milieu de fermentation et de l'ultra-filtrat enzymatique présentés ne révèlent aucune toxine connue.

Le NI serait commercialisé sous forme granulée contenant au maximum 30 % de maltodextrine de maïs. Le NI ne contiendrait pas de gluten. Concernant sa stabilité, l'analyse de la forme commerciale de l'enzyme indique une perte de moins de 5 % pour une conservation de 12 mois à une température inférieure à 15 °C.

Le CES « Biotechnologie » souligne que les modifications génétiques, la généalogie des souches jusqu'à la souche de production GEP44 sont décrites précisément par le pétitionnaire. Toutefois, il aurait été pertinent de vérifier l'intégrité des séquences intégrées par le séquençage moléculaire de la région modifiée.

Le CES « Biotechnologie » n'a pas de remarque sur le procédé de production du NI.

III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI

Selon le pétitionnaire, *Aspergillus niger* est utilisé depuis de nombreuses années pour la production d'acides organiques et d'enzymes destinées à l'alimentation humaine. La contamination des denrées par *Aspergillus niger* et l'historique d'utilisation industrielle ont confirmé la non-pathogénicité du microorganisme proposé dans les conditions d'utilisation (Schuster *et al.*, 2002). Les études de toxicologie et les analyses réalisées pour les autorisations d'emploi des enzymes alimentaires antérieures n'ont pas mis en évidence la présence de toxines connues.

Le pétitionnaire indique que la souche parentale et la souche intermédiaire d'*Aspergillus niger* ont été utilisées pour plusieurs productions. La souche de production GEP44 a été

classée le 23 octobre 2003 par la CGG⁵ dans le groupe I, classe 1, confinement L1 pour la production de la prolyl-oligopeptidase.

La souche de production est éliminée lors des étapes de purification du NI. Des analyses du Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) (2003) n'ont pas détecté de mycotoxines dans les conditions de la fermentation réalisée pour la production du NI dans le milieu de fermentation et dans l'ultra-filtrat enzymatique. Dans des conditions de culture permettant une expression maximale de métabolites secondaires, la souche de production GEP44 synthétise plusieurs métabolites inconnus et aucune mycotoxine connue usuellement analysée.

Le CES « Biotechnologie » rappelle que la production de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires (nigragilline, nigerazine B, malformines, naphtho-gamma-pyrones, acide oxalique) par une souche d'*Aspergillus niger* est souche dépendante et conditions de fermentation dépendantes (Van Dijck *et al.*, 2002 ; Blumenthal, 2003 ; Olempska-Beer *et al.*, 2006 ; Frisvad *et al.*, 2011). Il attire l'attention sur une évolution des conditions de production de l'enzyme et sur la nécessité de mise en place d'analyses fréquentes des mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.

IV. Effets de la modification génétique sur les propriétés de l'organisme hôte

La souche parentale et la souche de production GEP 44 ont été identifiées par le Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) comme *Aspergillus niger*. Le pétitionnaire indique que l'insertion de plusieurs copies du gène *gepA* d'*Aspergillus niger* ne modifie pas les caractéristiques de la souche de production.

La souche de production ne contient pas de gène de résistance à un antibiotique.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du CES « Biotechnologie ».

V. Stabilité génétique de l'OGM utilisé comme source de NI

La stabilité de la souche de production GEP44 est vérifiée par le pétitionnaire et est assurée par le recours fréquent à des cultures issues de stock.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du CES « Biotechnologie ».

VI. Spécificité de l'expression du nouveau matériel génétique

La séquence du gène *gepA* code la prolyl-oligopeptidase. Des analyses SDS-PAGE et des mesures d'activité enzymatique ont vérifié l'identité du NI avec la prolyl-oligopeptidase.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du CES « Biotechnologie ».

VII. Transfert de matériel génétique à partir de l'OGM

Plusieurs copies du gène *gepA* sont intégrées de façon stable dans le génome de la souche de production GEP44 et ne sont pas sous forme mobilisable. Le pétitionnaire souligne que la souche parentale et la souche de production (le NI produit ne lui conférant pas d'avantage pour sa survie) ont une durée de vie limitée en dehors des conditions optimales du fermenteur.

Le CES « Biotechnologie » note que la description de la purification du NI ne permet pas d'identifier l'étape permettant l'élimination de l'ADN de la souche de production du NI. L'absence de cet ADN dans le NI devrait être documentée.

⁵ Commission de Génie Génétique

VIII. Aptitude du micro-organisme génétiquement modifié à survivre dans l'intestin humain et à le coloniser

Les arguments du pétitionnaire sur ce sujet sont : *Aspergillus niger* est une espèce non pathogène. La souche de production GEP44, à l'instar de la souche parentale, a une durée de vie limitée en dehors des conditions optimales du fermenteur. La souche de production est éliminée du milieu après fermentation et les analyses réalisées sur le NI confirme l'absence de colonie de la souche de production. La souche de production ne contient pas de gène de résistance à un antibiotique.

Le pétitionnaire conclut que la colonisation de l'intestin humain par la souche d'*Aspergillus niger* produisant la prolyl-oligopeptidase est considérée comme improbable.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du CES « Biotechnologie ».

IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévu du NI

Le pétitionnaire indique que le produit est destiné à être utilisé comme ingrédient dans les compléments alimentaires comme aide à la digestion des protéines. Il indique que ces compléments alimentaires seraient plus particulièrement destinés aux personnes intolérantes au gluten.

Le pétitionnaire estime que 20 PPU³ du produit sont nécessaires pour digérer 1 g de gluten. Il indique que les personnes suivant un régime sans gluten (RSG) consomment souvent entre 50 mg et 2 g de gluten de façon involontaire et que cela entraîne un inconfort intestinal chez plus de la moitié des personnes intolérantes au gluten sous RSG. Afin de digérer ce gluten résiduel, le pétitionnaire estime ainsi qu'une dose de 40 PPU/j du produit est suffisante. Le pétitionnaire souligne que les personnes ayant des symptômes sévères liés à leur intolérance au gluten devraient adhérer à un strict RSG et que le produit peut aider à la digestion du gluten résiduel ou consommé de façon non intentionnelle, mais ne remplace pas un RSG.

Toutefois, dans une autre partie du dossier, il est indiqué que, donné à des patients intolérants au moment de l'ingestion de produits contenant du gluten, comme du pain, ou des produits de boulangerie faits à partir de blé, orge ou seigle, l'enzyme peut aider à dégrader le gluten et soulager les symptômes de l'intolérance au gluten.

Le pétitionnaire présente ensuite un tableau dans lequel il estime la quantité de gluten présente dans certains aliments (pain, pâte, pizza, tarte aux pommes, bière) et la quantité d'enzyme qui serait nécessaire pour dégrader le gluten.

Dans la suite du dossier, il propose une utilisation de 40 PPU/repas, ce qui correspond à une consommation quotidienne de 120 PPU/j. Le pétitionnaire indique que cette dose est inférieure à la dose journalière acceptable (DJA) pour l'Homme, qu'il estime à 2,2 PPU/kg poids corporel/jour équivalent à 132 PPU/j chez l'adulte de 60 kg.

Le CES « Nutrition humaine » note que la population ciblée inclut des populations très variables, allant de personnes atteintes de la maladie cœliaque à des personnes évitant les aliments contenant du gluten sans aucune indication médicale. Le pétitionnaire ne traite pas du cas des enfants et ne propose pas d'âge minimal pour l'utilisation du produit. L'apport maximal de 132 PPU/j calculé par le pétitionnaire correspond à une personne adulte et ne peut être retenu pour les enfants.

Le CES « Nutrition humaine » relève par ailleurs que l'utilisation du produit dans un complément alimentaire est discutable dans la mesure où le complément alimentaire ne viendrait pas compléter un régime normal (comme prévu dans la définition réglementaire du complément alimentaire) mais un régime sans gluten ou à faible teneur en gluten.

Le CES « Nutrition humaine » note que ni l'estimation de la dose de gluten résiduel dans l'alimentation consommée par des sujets intolérants au gluten (entre 0,5 et 2 g/j d'après le pétitionnaire), ni la dose d'enzyme nécessaire à la digestion d'une quantité déterminée de gluten (20 PPU d'enzyme pour 1 g de gluten) ne sont étayées par des publications scientifiques référencées. La quantité de gluten résiduel dans l'alimentation retenue pour l'évaluation (2 g) semble élevée pour des régimes d'éviction, dans lesquels l'exposition au gluten devrait être inférieure à 50 mg/j, voire à 10 mg/j, sur la base des lésions histologiques qui peuvent être observées au niveau de la muqueuse intestinale (Collin *et al.*, 2004 ; Catassi *et al.*, 2007 ; Akobeng *et al.*, 2008 ; Troncone *et al.*, 2008). Ainsi, le calcul de la dose journalière préconisée par le pétitionnaire semble davantage fondé sur le non dépassement de la DJA que sur les propriétés du produit.

X. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI

Dans cette partie, le pétitionnaire indique que la valeur nutritionnelle de l'enzyme ne diffère pas de celle des autres protéines ingérées. La consommation préconisée de 40 PPU/repas équivaldrait à environ 916 mg d'enzyme ingérés à chaque repas, en considérant une activité de 43,7 PPU/g de TOS⁶, ce qui ne modifie pas significativement l'apport calorique total.

L'enzyme présentée par le pétitionnaire a fait l'objet de 2 études expérimentales *in vitro* (Stepniak *et al.*, 2006b ; Mitea *et al.*, 2008)⁷. Une étude clinique à la dose de 160 PPU/j a été déclarée par le pétitionnaire dans un registre (ClinicalTrials.gov. 2011) ; l'étude est terminée dans sa phase clinique depuis le mois de mai 2009, mais, à la connaissance du CES « Nutrition humaine », ses résultats n'ont pas été publiés à ce jour. Dans l'étude *in vitro* de Stepniak *et al.* (2006), les auteurs ont conclu que l'enzyme était active à des valeurs de pH mesurées dans l'estomac, c'est-à-dire comprises entre 2 et 8, que l'activité de l'enzyme était maximale à un pH compris entre 4 et 5, et que l'enzyme résistait à la digestion avec de la pepsine ; en outre, le gluten et tous les peptides dérivés du gluten capables de stimuler les lymphocytes T testés ont été dégradés par l'enzyme. Les auteurs soulignent que des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'enzyme peut être utilisée dans des compléments alimentaires pour limiter l'exposition au gluten des patients. Dans l'étude de Mitea *et al.* (2008), l'action de l'enzyme a été mesurée dans un dispositif à plusieurs compartiments destiné à reproduire les conditions de différentes parties du tube digestif (estomac, duodénum, jéjunum, iléon). Des aliments contenant du gluten (expérience n°1 : 70 g de pain et 110 mL d'eau ; expérience n°2 : 50 g d'un mélange de hamburger, frites, ketchup, 50 g de pain, 110 mL de soda) ont été mélangés à de la salive artificielle en présence ou en l'absence d'enzyme (à raison de 200 mg d'enzyme/g de protéine). Le mélange a été introduit dans le dispositif. Dans les différents compartiments du dispositif, les quantités de peptides dérivés du gluten testés sont diminuées en présence de l'enzyme et leur dégradation est plus rapide. Les quantités de peptides atteignant le duodénum sont réduites.

Le CES « Nutrition humaine » estime que les données disponibles sont insuffisantes pour évaluer l'action et le devenir de l'enzyme dans les conditions d'emploi envisagées.

Le CES « Nutrition humaine » s'interroge sur l'action possible de l'enzyme sur les autres enzymes et hormones digestives.

⁶ Total organic solids, composés organiques solides

⁷ Les données rapportées dans ces deux études ne permettent toutefois pas d'établir la correspondance exacte avec le produit du pétitionnaire.

Les CES « Nutrition humaine » et « Biotechnologie » notent que le principe de l'hydrolyse enzymatique du gluten afin de diminuer ses propriétés immunotoxiques constitue un domaine de recherche d'actualité qui engendre des pistes intéressantes pour les sujets atteints de maladie cœliaque. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, les CES estiment que l'efficacité de l'enzyme n'est pas démontrée dans les conditions d'emploi envisagées. Il existe un consensus sur le fait que les propriétés des enzymes doivent être explorées sur des modèles *ex vivo* ou *in vivo*, avec les limites inhérentes à ces modèles expérimentaux, et que l'efficacité ne peut être assurée que sur la base de résultats d'études cliniques (Khosla *et al.*, 2005 ; Matysiak-Budnik *et al.*, 2005 ; Stepniak *et al.*, 2006a).

Le CES « Nutrition humaine » estime ainsi qu'il existe un risque potentiel lié à la diminution de l'observance du régime sans gluten chez les patients atteints de maladie cœliaque. La consommation du produit pourrait en effet inciter à une augmentation de la consommation d'aliments contenant du gluten chez les patients, et, en l'absence de démonstration de l'efficacité du produit, à une augmentation de l'exposition aux peptides immunotoxiques.

Le CES « Nutrition humaine » souligne qu'un suivi strict d'un régime sans gluten constitue à ce jour le seul traitement de la maladie cœliaque. Au-delà des manifestations cliniques de type douleurs abdominales, diarrhée ou inconfort intestinal – qui ne sont pas nécessairement observées dans les formes atypiques de la maladie cœliaque – la non observance du régime est à l'origine de déficiences nutritionnelles, notamment en fer, calcium et en certaines vitamines, résultant d'une malabsorption intestinale (Vilppula *et al.*, 2011). Elle est également associée à une augmentation du risque de survenue de nombreuses complications (Malamut *et al.*, 2010 ; Cosnes *et al.*, 2011)⁸, notamment à une déminéralisation osseuse pouvant conduire à une ostéopénie ou à une ostéoporose (McFarlane *et al.*, 1996 ; Valdimarsson *et al.*, 1996 ; Bai *et al.*, 1997 ; Mora *et al.*, 2001), et pourrait être associée à une augmentation du risque de maladies auto-immunes (Ventura *et al.*, 1999 ; Cosnes *et al.*, 2008), de troubles de la fertilité (Bast *et al.*, 2009 ; Freeman 2010)⁹, et de complications malignes, en particulier de lymphome (Holmes *et al.*, 1989 ; Askling *et al.*, 2002).

Par ailleurs, le CES « Nutrition humaine » note que le produit est susceptible d'être consommé par des personnes qui ne présentent pas de troubles associés à la consommation de gluten mais qui choisissent de suivre un régime pauvre en gluten, sans indication médicale, parce qu'elles perçoivent le gluten comme nocif. Pour ces personnes, le bénéfice attendu du produit serait donc nul, alors que le risque d'effet indésirable ne peut pas être entièrement écarté, en raison notamment des incertitudes sur l'action possible de l'enzyme sur les autres enzymes et hormones digestives.

XI. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

Le pétitionnaire indique que le NI respecte les limites de contamination microbiologique appliquées aux enzymes¹⁰ utilisées comme auxiliaires technologiques¹¹ ou additifs¹².

⁸ pour revue

⁹ pour revue

¹⁰ General enzyme specifications of the food chemical codex (FCC, 7th ed, 2010-2011)

¹¹ Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

¹² Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) (FAO JECFA Monographs 3, compendium of food additive specifications, 2006).

En raison de la production du NI par une souche d'*Aspergillus niger* et du niveau de consommation de NI recommandé par le pétitionnaire, le CES « Biotechnologie » préconise la mise en place de recherches fréquentes des mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.

XII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

Le pétitionnaire indique que des protéases sont utilisées comme auxiliaires technologiques ou dans des compléments alimentaires dans différents pays. Des protéases d'origine bactérienne ou fongique (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus melleus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoproteolyticus* et *Rhizopus niveus*) auraient été référencées dans « l'Enzyme Technical Association's list » pour les enzymes commercialisées dans les compléments alimentaires avant 1994. Des enzymes produites par des souches d'*Aspergillus niger* (Schuster *et al.*, 2002) dont la prolyl-oligopeptidase produite par la souche GEP44 font partie de la liste positive de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié pour un emploi d'auxiliaires technologiques.

Les études de sécurité ont été réalisées avec une enzyme purifiée et non formulée.

Etude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat

Cette étude a été conduite conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (B.P.L.) et la recommandation OCDE 408 sur 10 animaux de chaque sexe par groupe. Une étude de toxicité aiguë pendant 14 jours chez le rat a permis de choisir les doses testées pour l'étude de toxicité subchronique. Le traitement des rats a été fait par gavage à raison de 2000, 7000 et 20000 mg/kg p.c./j, équivalent à 518, 1813 et 5180 mg de matière sèche/kg de poids corporel/j. En dehors des signes cliniques, de l'évolution pondérale et de la consommation alimentaire, des examens ophtalmologiques, hématologiques et biochimiques sanguins, et neuro-comportementaux ont été pratiqués ainsi que les examens macroscopiques et microscopiques des organes prélevés en fin d'étude (n=45). Les aspects identité et stabilité de la préparation enzymatique utilisée, contenu protéique de la suspension de gavage ont été documentés. En dehors d'une augmentation significative du poids corporel chez les femelles à la dose la plus forte par rapport au groupe témoin, et d'une réduction significative de la consommation alimentaire chez les mâles, sans retentissement sur le poids corporel, aucun autre effet délétère n'a été rapporté. Ces effets pouvant être attribués au fort apport énergétique de cette dose forte d'enzyme et non à des effets toxiques, la NOAEL est fixée à 20000 mg/kg p.c./j.

Etudes de génotoxicité

Etude de *mutagenicité* sur 4 souches de *Salmonella typhimurium* histidine dépendantes (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) et une souche d'*Escherichia coli* WP2 uvrA tryptophane dépendante selon les B.P.L. et la recommandation OCDE 471.

La préparation testée est identifiée. La présence d'histidine ou de protéines dans la préparation ayant conduit à observer une augmentation de mutations reverses en même temps qu'une augmentation légère du tapis bactérien, un second essai a été mis en œuvre selon la technique du « treat and plate » adaptée à cette situation et permettant d'exclure les faux positifs. Les concentrations testées, avec ou sans activation métabolique, allaient de 62 à 5000 µg de matière sèche par plaque. Une absence de mutation reverse est observée avec la préparation jusqu'à 5000 µg/plaque en présence ou absence d'activation métabolique versus témoins négatif et positif.

Test d'*aberration chromosomique* sur cellules de mammifères (lymphocytes périphériques humains) selon les B.P.L. et la recommandation OCDE 473.

La concentration maximale retenue lors d'un essai préliminaire est de 5000 µg/mL. La préparation est testée par méthode directe après 4, 24 ou 48 heures de contact avec ou

sans activation métabolique avec 4 heures de contact. Aucun effet clastogène n'est observé avec la préparation testée.

Marge de sécurité

La NOAEL correspond à la dose la plus forte testée dans l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat soit 20 g/kg p.c./jour ou 220 PPU/ kg p.c./jour ou 5040 mg TOS/ kg p.c./jour. En utilisant le facteur de sécurité de 100, la dose journalière acceptable serait de 2,2 PPU/kg p.c./jour équivalent à la dose journalière de 132 PPU pour un adulte de 60 kg.

Allergénicité

Au plan de l'allergénicité, le pétitionnaire a fourni les résultats de recherche sur les banques de données Allermatch (www.Allermatch.org) basées principalement sur les données de WHO-IUIS et SwissProt, prenant en compte la comparaison des séquences des acides aminés de l'enzyme avec celles d'allergènes connus. La démarche répond aux directives de la FAO/OMS (FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 2001) en utilisant deux critères d'appariement :

- Plus de 35 % d'identité dans la séquence d'acides aminés de la protéine exprimée en utilisant une fenêtre de 80 acides aminés,
- Une identité de 6 ou plus acides aminés contigus.

Il est conclu à l'absence de potentiel allergénique de la préparation enzymatique.

Le CES « Biotechnologie » indique que les protéases sont naturellement présentes dans tous les organismes vivants (bactéries, champignons, plantes, animaux, humains) et sont impliquées dans de multiples réactions physiologiques. Les polyoligopeptidases, un sous-groupe de protéases, sont présentes dans divers végétaux comme les épinards (Kuwabara, 1992), les carottes (Yoshimoto *et al.*, 1987), le riz (Tripathi et Sowdhamini, 2006), les papayes, dans les champignons (*Agaricus bisporus*)(Sattar *et al.*, 1990), mais aussi dans de nombreux tissus animaux comme les muscles (vache, porc, poulet, poissons) entrant dans l'alimentation de l'Homme. Ces enzymes sont également retrouvées dans l'estomac et l'intestin de l'Homme.

Le CES « Biotechnologie » note que les études de sécurité réalisées montrent la non-génotoxicité de la préparation enzymatique et l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat permet de fixer une NOAEL à la dose la plus forte testée, dose qui n'entraîne pas d'effet délétère.

Le « CES Biotechnologie » souligne que l'apport maximal de 132 PPU/personne ne s'applique qu'aux adultes et non pas aux enfants dans le cas où ils seraient concernés par l'emploi de ce NI.

Conclusion du CES « Biotechnologie »

Au vu des résultats fournis par le pétitionnaire, le CES « Biotechnologie » n'identifie pas de risque au niveau toxicologique du nouvel ingrédient dans les conditions de production présentées. Il rappelle qu'en raison de l'identité de la souche de production, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires, il convient de mettre en place une surveillance de ces substances dans la production du NI.

Le CES « Biotechnologie » souligne l'importance que l'efficacité de l'enzyme soit démontrée dans les conditions d'emploi envisagées.

Le « CES Biotechnologie » souligne que l'apport maximal de 132 PPU/personne ne s'applique qu'aux adultes et non pas aux enfants dans le cas où ils seraient concernés par l'emploi de ce NI.

Conclusion du CES « Nutrition humaine »

Le CES « Nutrition humaine » émet un avis défavorable quant à la mise sur le marché du nouvel ingrédient. Il estime en effet qu'il existe un risque lié à la diminution de l'observance du régime sans gluten chez les patients atteints de maladie cœliaque pouvant conduire, en l'absence de démonstration de l'efficacité du produit, à une augmentation de l'exposition aux peptides immunotoxiques. Le CES souligne qu'un suivi strict d'un régime sans gluten constitue à ce jour le seul traitement de la maladie cœliaque, indispensable pour la prévention des complications liées à la maladie. Le CES s'interroge en outre sur l'action possible de l'enzyme sur les autres enzymes et hormones digestives.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions des CES « Biotechnologie » et « Nutrition humaine » et émet donc un avis défavorable.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Novel food, prolyl oligopeptidase, protéase, *Aspergillus niger*, maladie cœliaque, gluten.

BIBLIOGRAPHIE

- Afssa (2005) Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 26 avril 2005 sur la demande d'avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une protéase produite par une souche recombinée d'*Aspergillus niger* en brasserie et pour la production d'hydrolysats de protéines (saisine 2005-SA-0002).
- Akobeng AK and Thomas AG (2008). Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 1044-52.
- Askling J, Linet M, Gridley G, Halstensen TS, Ekstrom K and Ekbohm A (2002). Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology* 123: 1428-35.
- Bai JC, Gonzalez D, Mautalen C, Mazure R, Pedreira S, Vazquez H, Smecuol E, Siccardi A, Cataldi M, Niveloni S, Boerr LA and Maurino E (1997). Long-term effect of gluten restriction on bone mineral density of patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 11: 157-64.
- Bast A, O'Bryan T and Bast E (2009). Celiac disease: a comprehensive review and update, series # 5 - Celiac disease and reproductive health. *Pract Gastroenterol* 13: 10-21.
- Blumenthal CZ (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol and Pharmacol* 39: 214-228.
- Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F, Mandolesi A, Bearzi I and Fasano A (2007). A prospective, double-

- blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 85: 160-6.
- ClinicalTrials.gov. (2011). Registered study NCT00810654 : Effect of *Aspergillus niger* prolyl endoprotease (AN-PEP) enzyme on the effects of gluten ingestion in patients with coeliac disease. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00810654>
- Collin P, Thorell L, Kaukinen K and Mäki M (2004). The safe threshold for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease? *Aliment Pharmacol Ther* 19: 1277-83.
- Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, Hugot JP, Ginies JL, Dabadie A, Mouterde O, Allez M and Nion-Larmurier I (2008). Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6: 753-8.
- Cosnes J and Nion-Larmurier I (2011). [Complications of celiac disease]. *Pathol Biol (Paris)*. May 26. [Epub ahead of print]
- Freeman HJ (2010). Reproductive changes associated with celiac disease. *World J Gastroenterol* 16: 5810-4.
- Frisvad J.C., Larsen T.O, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson R.A and Nielsen K.F. (2011) Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One* 6(8):e23496.doi:10.1371/journal.pone.0023496.
- Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D and Allan RN (1989). Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet. *Gut* 30: 333-8.
- Khosla C, Gray GM and Sollid LM (2005). Putative efficacy and dosage of prolyl endopeptidase for digesting and detoxifying gliadin peptides. *Gastroenterology* 129: 1362-3; author reply 1363.
- Kuwabara T (1992). Characterization of a prolyl endopeptidase from spinach thylakoids. *FEBS Lett* 300: 127-130
- Malamut G and Cellier C (2010). Maladie cœliaque de l'adulte. *Rev Fr Allergol* 50: 254-9.
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N and Heyman M (2005). Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 129: 786-96.
- McFarlane XA, Bhalla AK and Robertson DA (1996). Effect of a gluten free diet on osteopenia in adults with newly diagnosed coeliac disease. *Gut* 39: 180-4.
- Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L and Koning F (2008). Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut* 57: 25-32.
- Mora S, Barera G, Beccio S, Menni L, Proverbio MC, Bianchi C and Chiumello G (2001). A prospective, longitudinal study of the long-term effect of treatment on bone density in children with celiac disease. *J Pediatr* 139: 516-21.
- Olempska-Beer Z.S, Merker R.I, Ditto M.D and DiNovi M.J. (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms- a review. *Regul Toxicol and Pharmacol* 45: 144-158.
- Sattar AKMA, Yamamoto N, Yoshimoto T and Tsuru D (1990). Purification and characterization of an Extracellular prolyl endopeptidase from *Agaricus bisporus*. *J. Biochem.* 107:256-261
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J. C and van Dijck P. W. M (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:426-435.
- Stepniak D and Koning F (2006a). Enzymatic gluten detoxification: the proof of the pudding is in the eating! *Trends Biotechnol* 24: 433-4.
- Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L and Koning F (2006b). Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G621-9.
- Tripathi LP and Sowdhamini R (2006). Cross genome comparisons of serine proteases in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* 7: 200.
- Troncone R, Auricchio R and Granata V (2008). Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 329-33.
- Valdimarsson T, Lofman O, Toss G and Strom M (1996). Reversal of osteopenia with diet in adult coeliac disease. *Gut* 38: 322-7.
- Van Dijck PWM, Selten GCM and Hempenius RA (2003). On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains. *Regul Toxicol and Pharmacol* 38: 27-35.
- Ventura A, Magazzu G and Greco L (1999). Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 117: 297-303.
- Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R, Luostarinen M, Laurila K, Mäki M and Collin P (2011). Clinical benefit of gluten-free diet in screen-detected older celiac disease patients. *BMC Gastroenterol* 11: 136.
- Yoshimoto T, Abdus Sattar AKM, Hirose W and Tsuru D (1987). Studies on prolyl endopeptidase from carrot (*Daucus carota*): purification and enzymatic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* 916: 29-37.