

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 4 août 2022

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, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, d'une léghémoglobine de soja produite par fermentation d'une souche de *Komagataella phaffii* (anciennement nommée *Pichia pastoris*) génétiquement modifiée (dossier n° EFSA-GMO-NL-2019-162)

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 à 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 publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 4 janvier 2022 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, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, d'une léghémoglobine de soja produite par fermentation d'une souche de *Komagataella phaffii* (anciennement nommée *Pichia pastoris*) génétiquement modifiée (dossier n° EFSA-GMO-NL-2019-162) ».

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) 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'EFSA a cependant offert la possibilité aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. Dans ce cadre, la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses sur ce dossier initial, uniquement vis-à-vis des exigences de la réglementation sur les OGM.

En complément de son évaluation au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, l'EFSA organise aussi l'évaluation de cette demande pour la caractérisation et la sécurité sanitaire de la légghémoglobine synthétisée et son utilisation dans des denrées au titre du Règlement (CE) n° 1331/2008 relatif aux additifs, enzymes et arômes alimentaires.

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) ».

Le dossier initial reçu par l'Anses le 4 janvier 2022 a été complété par une actualisation du rapport d'analyse du séquençage mis à disposition par l'EFSA le 25 février 2022.

L'expertise collective a été réalisée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni les 17 février, 17 mars et 21 avril 2022 sur la base de rapports initiaux rédigés par trois rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur le document guide de l'EFSA (« Guidance on the Risk Assessment of Genetically Modified Microorganisms and Their Products Intended for Food and Feed Use ») relatif aux microorganismes génétiquement modifiés (2011), ainsi que sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

Les sections telles que présentées dans le document guide de l'EFSA (2011) sont reprises ci-dessous.

A. Informations générales

Le produit, objet de la demande d'autorisation de mise sur le marché, est un concentré d'une légghémoglobine de soja, produite par une souche génétiquement modifiée de levure *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*). Cette préparation, appelée « LegH Prep », est destinée à entrer dans la composition de substituts de viande (produits alimentaires non carnés).

Le pétitionnaire propose le classement de la LegH Prep dans la catégorie 3 du document guide de l'EFSA (2011), correspondant aux produits dérivés de micro-organismes génétiquement modifiés (MGM), ne contenant pas de MGM capables de multiplication ou de transfert de gènes, mais pouvant contenir de l'ADN de la souche MGM (« *Products derived from GMMs in which GMMs capable of multiplication or of transferring genes are not present, but in which newly introduced genes are still present (e.g. heat-inactivated starter cultures)* »).

B. Identification, caractérisation des dangers et évaluation de l'exposition

B.1. Informations concernant le MGM

B.1.1. Caractéristiques du micro-organisme hôte ou parental

La souche réceptrice parentale de la souche de production est une souche commerciale de levure *K. phaffii*. L'espèce *K. phaffii* est considérée comme non toxigène et non pathogène. Ces considérations sont confirmées par la présomption d'innocuité reconnue (statut QPS¹) de l'espèce *K. phaffii* (EFSA BIOHAZ Panel, 2022).

Le pétitionnaire indique que la souche commerciale de *K. phaffii* ne contient ni gène de résistance aux antibiotiques, ni plasmide.

B.1.2. Caractéristiques de l'origine des séquences insérées (organisme donneur)

L'origine de la séquence introduite dans la souche réceptrice est le gène de la léghémoglobine c2 (gène *lgb2*) du soja (variété *Glycine max*). Cette léghémoglobine, appelée LGB2, est une protéine synthétisée dans les nodules racinaires du soja. La séquence du gène *lgb2* utilisée pour la transformation génétique a été optimisée pour une expression dans *K. phaffii* et obtenue par synthèse d'ADN. Afin d'améliorer l'expression de la léghémoglobine et d'augmenter la capacité de biosynthèse de l'hème, des séquences de gènes de l'espèce *K. phaffii* ont été insérées ou interrompues dans la souche de production.

B.1.3. Description de la modification génétique

La souche réceptrice a subi des transformations génétiques successives par différents plasmides, ayant permis l'interruption ou l'intégration de séquences d'intérêt. L'ensemble des étapes et des souches intermédiaires est décrit précisément. Les plasmides sont porteurs de divers gènes de résistance à des antibiotiques.

Au final, plusieurs copies des séquences d'intérêt sont intégrées dans l'ADN génomique de la souche de production, appelée MXY0541 par le pétitionnaire.

B.1.4. Informations liées au MGM

Le pétitionnaire présente un certificat de réception par l'American Type Culture Collection (ATCC) de la souche de production MXY0541, ainsi qu'un certificat de stockage. Il ne fournit en revanche pas de certificat de dépôt de la souche, ni de numéro d'identification.

Le GT « Biotechnologie » demande la fourniture de ce certificat de dépôt, dans une collection internationale reconnue par le traité de Budapest, conformément aux lignes directrices de l'EFSA (2011).

Le génome de la souche de production MXY0541 a été séquencé complètement par analyse WGS (*whole genome sequence*) et un assemblage *de novo* a été réalisé. Cette analyse permet d'identifier la souche de production comme une souche de *K. phaffii*, sur la base de la séquence de l'ADN ribosomique 18S et de l'analyse phylogénétique produite.

¹ La présomption d'innocuité reconnue (QPS) se définit comme une présomption fondée sur des preuves raisonnables. Si, lors de leur évaluation, les experts du groupe scientifique de l'EFSA sur les dangers biologiques (BIOHAZ) concluent qu'un groupe de micro-organismes ne suscite pas de problèmes en termes de sécurité, le groupe de micro-organismes dans son ensemble se voit accorder le « statut QPS ».

L'absence d'ADN plasmidique est confirmée par l'analyse WGS réalisée sur la souche de production. L'absence des trois gènes de résistance à des antibiotiques mis en œuvre au cours de la construction de la souche de production a été vérifiée par PCR². Selon le pétitionnaire, les données d'analyse WGS indiquent aussi l'absence de gènes de résistance à des antibiotiques dans le génome de la souche de production mais ne fournit pas les résultats de cette analyse.

Le GT « Biotechnologie » demande la fourniture des résultats de la recherche de ces gènes, conformément aux recommandations de l'EFSA (2021).

La stabilité génétique de la souche de production a, quant à elle, été démontrée par analyse selon la méthode de PCR multiplex, sur trois lots indépendants d'échantillons prélevés en fin de fermentation de la souche de production MXY0541.

Dans la souche de production MXY0541, l'expression de la légghémoglobine est considérablement plus importante que celle des autres protéines de *K. phaffii* surexprimées par les modifications génétiques.

L'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) de la légghémoglobine produite par la souche de production ne montre pas de modification post-traductionnelle. La LGB2 produite par le MGM *K. phaffii* est similaire à une légghémoglobine extraite de nodules racinaires de soja.

Le séquençage complet du matériel génétique de la souche de production MXY0541 a permis de vérifier l'intégration des séquences d'intérêt dans le génome de la souche et l'absence de séquences de plasmides. La souche de production MXY0541 ne présente donc pas de capacité accrue à transférer son matériel génétique à d'autres organismes par rapport à la souche parentale.

Le GT « Biotechnologie » considère que les modifications génétiques de la souche de production ne présentent pas de risque sanitaire.

Le pétitionnaire appuie ses déclarations sur la présomption d'innocuité reconnue (statut QPS) de *K. phaffii*. Selon le document de l'EFSA (EFSA BIOHAZ Panel, 2022), le statut QPS ne peut être retenu pour une souche de *K. phaffii* que si celle-ci ne présente aucun gène d'antibiorésistance et que le produit obtenu ne contient pas de cellules viables de la souche de production. Seule l'absence de levures totales dans la LegH Prep est mentionnée par le pétitionnaire. Pour envisager une évaluation prenant en compte le statut QPS de l'espèce *K. phaffii*, le pétitionnaire doit donc fournir les résultats de la recherche de gènes d'antibiorésistance dans le génome de la souche de production et démontrer l'absence de cellules viables de la souche de production, selon une méthode recensée dans le document de l'EFSA (EFSA CEP Panel, 2019).

Le pétitionnaire mentionne que des substituts de viande contenant de la légghémoglobine recombinante de soja sont déjà sur le marché aux Etats-Unis, à Singapour, Hong-Kong et Macao. Le pétitionnaire n'indique cependant pas si ces produits contiennent de la légghémoglobine produite à partir de la souche de production concernée par la demande examinée dans le cadre de cet avis (souche MXY0541) ou une légghémoglobine produite par une autre souche de production.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses souhaiterait savoir si la souche de production de la légghémoglobine concernée par les autorisations de mise sur le marché dans les différents pays cités par le pétitionnaire est celle soumise pour cette demande d'autorisation, ou s'il s'agit d'une autre souche qu'il conviendrait de préciser.

² PCR (Polymerase Chain Reaction) : Réaction en chaîne par polymérase

B.2. Informations concernant le produit

B.2.1. Informations liées au procédé de production

Le produit, objet de la demande est une préparation de légghémoglobine de soja c2, hémoprotéine de 16 kDa (Fraser et al. 2017), produite par culture en milieu liquide de la levure *K. phaffii* génétiquement modifiée (souche MXY0541).

La fermentation a lieu dans un système clos. La composition du milieu de culture est donnée, tous les ingrédients sont autorisés et de qualité alimentaire.

Le procédé utilisé suit les bonnes pratiques de fabrication et la réglementation sur l'hygiène des ingrédients alimentaires et des enzymes, et une analyse des risques et maîtrise des points critiques (HACCP) est menée sur ce procédé. L'inoculum provient d'une banque de cellules de la souche de production MXY0541, conservée à -80 °C. Il est préalablement testé pour sa pureté et sa capacité à produire la légghémoglobine avant de démarrer la fermentation. Pendant la fermentation, l'absence de bactéries (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7) dans le milieu de fermentation est contrôlée, et le lot est détruit en cas de contamination.

Cependant, les étapes de fermentation et de purification du produit LegH Prep sont présentées de façon trop succincte.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce que les conditions opératoires du procédé de fermentation et de purification soient détaillées, conformément au document guide de l'EFSA (2011), en particulier pour les étapes de filtration, de lyse mécanique et de traitement thermique, qui sont déterminantes pour l'élimination des souches OGM.

B.2.2. Informations liées au procédé de préparation du produit

L'absence de cellules de levures totales et de bactéries pathogènes dans 25 g de préparation LegH Prep a été vérifiée dans 3 lots de production. Aucune recherche spécifique de la souche de production n'est cependant effectuée.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce que le pétitionnaire démontre l'absence de cellules viables de la souche de production, en utilisant la méthode décrite dans « *Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes* » (EFSA CEP Panel, 2019).

Le pétitionnaire indique la présence d'ADN de la souche de production dans le produit LegH Prep. En conséquence, il demande l'inscription de la LegH Prep dans la catégorie 3 selon le document guide de l'EFSA (2011), correspondant aux produits dérivés de micro-organismes génétiquement modifiés (MGM), ne contenant pas de MGM capables de multiplication ou de transfert de gènes, mais pouvant contenir de l'ADN de la souche MGM (« *Products derived from GMMs in which GMMs capable of multiplication or of transferring genes are not present, but in which newly introduced genes are still present (e.g. heat-inactivated starter cultures)* »).

Comme indiqué au point B.1.4., le pétitionnaire mentionne la recherche et l'absence de gènes d'antibiorésistance par séquençage total du génome, mais n'en fournit pas les données.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande la fourniture des résultats de cette recherche, réalisée conformément au document de l'EFSA (2021).

De plus, le GT « Biotechnologie » estime que la classification du produit en catégorie 3 comme décrite dans le document guide de l'EFSA (2011) est directement dépendante de la démonstration de l'absence de cellules viables de la souche de production demandée ci-dessus.

B.2.3. Description du produit

Le pétitionnaire propose la dénomination suivante pour le produit : « léghémoglobine LGB2 produite par une souche génétiquement modifiée de *P. Pastoris* identique à la protéine de soja ».

Le produit final est une solution concentrée et stabilisée de léghémoglobine LGB2, appelée LegH Prep. Elle contient au moins 17 autres protéines intracellulaires de *K. phaffii*, représentant 35 % des protéines totales. Elle contient également des stabilisants et de l'ADN de la souche de production.

Les spécifications de pureté et les résultats des analyses correspondantes pour cinq lots de production de la LegH Prep sont fournis par le pétitionnaire. En outre, les teneurs en méthanol et anti-mousse résiduels ont été mesurées pour cinq autres lots de production. Le méthanol n'est pas présent à plus de 10 mg/kg (seuil de détection). Le pétitionnaire a calculé l'exposition à l'anti-mousse due à la consommation alimentaire de la LegH Prep, en se basant sur la plus haute teneur en anti-mousse mesurée, mais ce calcul n'est pas expliqué en détail.

Le GT « Biotechnologie » demande à ce que le calcul d'exposition à l'anti-mousse soit détaillé dans le dossier.

La préparation commerciale est une solution aqueuse contenant moins de 20 % de matières sèches dissoutes. Le pétitionnaire indique que la détermination de sa granulométrie n'est pas pertinente, et que le point de congélation est supposé être celui de l'eau pure.

B.2.4. Considérations sur le produit pour la santé humaine

Considérant que le produit LegH Prep est également évalué par l'EFSA au titre du Règlement (CE) n° 1331/2008, pour les données relatives à la toxicité et à l'évaluation nutritionnelle, le GT « Biotechnologie » n'a pas évalué ces données au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003. Cette section se limitera donc à l'évaluation de l'allergénicité de l'espèce de production *K. phaffii* et des protéines présentes dans le produit LegH Prep.

Par ailleurs, le GT « Biotechnologie » note que la protéine léghémoglobine LGB2 est naturellement et principalement présente dans les nodules racinaires du soja. En conséquence, le GT « Biotechnologie » souligne qu'il n'existe pas d'historique de consommation de cette partie de la plante en alimentation humaine.

- *Allergénicité de la léghémoglobine LGB2 et des protéines de la souche de production présentes dans le produit LegH Prep*

Dix-huit protéines ont été identifiées dans le produit LegH Prep : la léghémoglobine LGB2 et dix-sept protéines endogènes de la souche de production MXY0541. Les identités de ces dix-sept protéines sont fournies par le pétitionnaire.

Le potentiel allergénique du produit LegH Prep a été évalué sur le potentiel allergénique de chacune de ces dix-huit protéines.

La recherche d'identités de séquences a été réalisée par le pétitionnaire en 2016. Le GT « Biotechnologie » a actualisé la recherche d'identités de séquences globales entre la léghémoglobine et les protéines de *K. phaffii* présentes dans le produit LegH Prep avec les protéines allergéniques avérées de la banque AllergenOnline (2022) et de la banque Compare (2022). Cette recherche est réalisée avec l'algorithme FASTA et une fenêtre glissante de 80 résidus.

Le GT « Biotechnologie » n'a pas identifié d'identités de séquences globales avec des protéines allergéniques.

La recherche des identités locales (100 % d'identité) a été réalisée avec une fenêtre glissante de 8 résidus.

Le GT « Biotechnologie » n'a pas identifié d'identité de séquences locales avec des protéines allergéniques.

La recherche d'identités de séquences avec les peptides immunotoxiques à l'aide de l'option « Celiac disease, exact match » de la version 2022 de la banque AllergenOnline a été réalisée pour la légghémoglobine.

Le GT « Biotechnologie » n'identifie pas d'identité de séquences avec des peptides immunotoxiques pour la légghémoglobine LGB2.

Dans la littérature (Galindo, 1998), des réactions d'hypersensibilité ont été signalées à l'hémoglobine des larves ou vers de vase du genre *Chironomus* (notamment *C. thummi thummi* et *C. kiiensis*), utilisées comme appâts par les pêcheurs ou pour nourrir les poissons par les aquarophiles. L'hémoglobine de *C. thummi* est identifiée par l'IUIS aux allergènes Chi t 1 à Chi t 9 et l'hémoglobine de *C. kiiensis* à l'allergène Chi k 10. L'alignement des séquences de la légghémoglobine LGB2 avec l'hémoglobine de *C. thummi* révèle des pourcentages d'identités (15 %) et d'homologies (61,5 %) assez faibles, bien que les structures tridimensionnelles de ces deux protéines se superposent assez bien. Trois épitopes B liant les IgE ont été identifiés sur la surface moléculaire de l'hémoglobine de *C. thummi* (Van Kampen et al. 2001). L'alignement des séquences de la légghémoglobine LGB2 et de Chi t 1 montre que les régions de la légghémoglobine LGB2 homologues de ces 3 épitopes possèdent des séquences très différentes. Ces résultats suggèrent que la légghémoglobine LGB2 de soja n'aurait pas la capacité de développer des réactions croisées avec les hémoglobines de chironomes ou avec les autres hémoglobines animales, dont l'hémoglobine humaine, qui partagent avec la légghémoglobine c2, des identités et des homologies de séquence encore plus faibles que celles observées avec les hémoglobines de chironomes.

Le pétitionnaire fournit également les résultats de l'hydrolyse pepsique *in vitro* (SGF, *Simulated Gastric Fluid*) de la légghémoglobine LGB2 produite par *K. phaffii*, effectuée en SDS-PAGE après coloration au bleu de Coomassie brillant. Il indique que la légghémoglobine LGB2 n'offre qu'une très faible résistance à la protéolyse puisqu'elle est hydrolysée après 2 minutes d'incubation en présence de pepsine, sans libérer de peptides résiduels. Ces résultats sont présentés dans deux publications (Jin et al. 2018; Reyes et al. 2021). La résistance à la protéolyse trypsique *in vitro* (SIF, *Simulated Intestinal Fluid*) n'a en revanche pas été envisagée par le pétitionnaire.

Les résultats obtenus par le pétitionnaire sont corroborés par une étude bio-informatique de la localisation des sites de clivage par la pepsine et la trypsine sur le modèle tridimensionnel de la légghémoglobine LGB2 réalisée par le GT « Biotechnologie » à l'aide du logiciel YASARA (Krieger, 2002). Cette étude montre l'existence en surface d'un nombre suffisamment important de sites de clivage accessibles à la pepsine et à la trypsine (prédictions PeptideCutter d'Expasy) pour prédire une faible résistance de la protéine à une hydrolyse digestive par la pepsine et la trypsine.

- *Allergénicité des sources des protéines présentes dans le produit LegH Prep*

Le statut QPS de l'espèce *K. phaffii* proposé par l'EFSA (EFSA BIOHAZ Panel, 2022) indique que la littérature relative à cette espèce ne fait pas apparaître de risque sanitaire préoccupant lié à son utilisation.

Par ailleurs, le soja est inscrit dans la liste des allergènes à étiquetage obligatoire du Règlement (UE) n° 1169/2011. De nombreux allergènes ont été identifiés dans les graines de soja et certains d'entre eux sont des allergènes majeurs (allergènes dont les IgE correspondantes sont présentes chez plus de la moitié des patients allergiques au soja).

Dans ce dossier, seule la séquence codante optimisée du gène *lgb2* du soja est présente dans la souche de production MXY0541. Cette séquence n'a pas été isolée du soja mais synthétisée après optimisation. Le potentiel allergénique de la légghémoglobine LGB2 produite par la souche de production MXY0541 est documenté ci-dessus.

En conclusion, sur la base des données et arguments fournis par le pétitionnaire et complétés par le GT « Biotechnologie », le potentiel allergénique de la légghémoglobine LGB2 et des protéines de la souche de production présentes dans la préparation LegH Prep peut être considéré comme faible. Ces protéines n'ont apparemment pas non plus de propriétés adjuvantes. L'origine du gène de la légghémoglobine LGB2, issu du soja, n'impacte pas le potentiel allergénique considéré comme faible de cette protéine puisqu'elle est synthétisée par un MGM et non pas purifiée de plants de soja.

B.3. Impact environnemental du MGM (MXY0541) et de son produit (LegH Prep)

L'évaluation du risque environnemental lié à l'utilisation du MGM dépend directement de la catégorie de ce dernier, telle que définie dans les lignes directrices de l'EFSA (2011) et donc de la présence ou non de cellules viables de la souche de production. Comme indiqué dans la section B.1.4., le pétitionnaire doit donc fournir les résultats de la recherche de gènes d'antibiorésistance précédemment mentionnée et démontrer l'absence de cellules viables, de la souche de production, selon la méthode décrite dans « *Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes* » (EFSA CEP Panel, 2019), afin de démontrer l'absence de risque environnemental.

C. Conclusions du groupe de travail « Biotechnologie »

Le produit LegH Prep faisant également l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1331/2008 relatif aux additifs, enzymes et arômes alimentaires, le champ d'expertise confié au GT « Biotechnologie » dans le cadre de ce dossier se limite à la caractérisation moléculaire, au procédé de production et à l'allergénicité du produit.

En conclusion des points précédemment exprimés, les risques sanitaires relatifs à la consommation de la préparation LegH Prep, contenant la légghémoglobine, ne peuvent pas être totalement caractérisés sur les domaines expertisés, en raison notamment (i) du manque d'informations sur le traitement thermique final lors du procédé de production, (ii) de l'absence des résultats de recherche des gènes d'antibiorésistance dans le génome de la souche de production et (iii) de l'absence de recherche de cellules viables de la souche de production dans le produit. Les commentaires émis par le GT « Biotechnologie » lors de la période de consultation de l'EFSA et relatifs à ces aspects sont disponibles en annexe de cet avis.

Le GT « Biotechnologie » conclut néanmoins que le potentiel allergénique de la légghémoglobine LGB2 et des protéines de la souche de production présentes dans la préparation LegH Prep peut être considéré comme faible et non préoccupant.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie », qui constate le manque de certaines données déterminantes pour pouvoir se prononcer sur les risques sanitaires relatifs à la consommation de la préparation LegH Prep contenant la légghémoglobine LGB2, sur le

champ d'expertise développé dans le présent rapport, excluant l'évaluation de la toxicité et l'évaluation nutritionnelle.

Dans la mesure où des études ou données complémentaires pourraient être versées au dossier à la demande de l'EFSA, le contenu du présent avis ne préjuge pas des conclusions finales qui pourraient être rendues ultérieurement par l'Anses au vu de ces nouvelles données.

Dr Roger Genet

Règlement (UE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) n° 1924/2006 et (CE) n° 1925/2006 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 87/250/CEE de la Commission, la directive 90/496/CEE du Conseil, la directive 1999/10/CE de la Commission, la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil, les directives 2002/67/CE et 2008/5/CE de la Commission et le règlement (CE) n° 608/2004 de la Commission. JO L 304 du 22.11.2011, p. 18–63

Règlement (CE) n° 1331/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant une procédure d'autorisation uniforme pour les additifs, enzymes et arômes alimentaires. JO L 354 du 31.12.2008, p. 1–6

Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, p. 1-23.

Van Kampen, V., V. Liebers, I. Sander, Z. Chen, X. Baur, M. Raulf-Heimsoth, et F. W. Falkenberg. 2001. « B-Cell Epitopes of the Allergen Chi t 1.01: Peptide Mapping of Epitopes Recognized by Rabbit, Murine, and Human Antibodies ». *Allergy* 56 (2): 118-25. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.056002118.x>.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2022). Avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, d'une léghémoglobine de soja produite par fermentation d'une souche de *Komagataella phaffii* (anciennement nommée *Pichia pastoris*) génétiquement modifiée (dossier n° EFSA-GMO-NL-2019-162). (saisine 2022-SA-0001). Maisons-Alfort : Anses, 15 p.

ANNEXE 1

Commentaires de l'Anses à destination de la DGCCRF pour transmission à l'EFSA

concernant la demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, d'une légghémoglobine de soja produite par fermentation d'une souche de *Komagataella phaffii* (anciennement nommée *Pichia pastoris*) génétiquement modifiée

Dossier n° EFSA-NL-2019-162

L'Anses endosse l'ensemble des commentaires émis par le GT « Biotechnologie » sur le dossier initial. A noter que la présente demande fait également l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n°1331/2008 et que l'évaluation de certaines sections relèvera de celui-ci et non du Règlement (CE) n°1829/2003. A ce titre ces sections n'ont pas été expertisées par le GT « Biotechnologie ».

A) Informations générales

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

B) Identification, caractérisation des dangers et évaluation de l'exposition

1 Informations concernant le MGM

1.1. – 1.3.

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour ces sections n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

1.4. Information liée au MGM

Le pétitionnaire fournit un certificat de réception et de stockage de souche par l'American Type Culture Collection (ATCC). Cependant le certificat de dépôt de la souche dans une collection internationale reconnue par le traité de Budapest est manquant, ainsi que le numéro d'identification.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande la fourniture de ces informations, conformément aux lignes directrices de l'EFSA telles que précisées dans *Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use*¹ (2011), ou une justification de leur absence.

1.4.1 Description des traits génétiques ou caractéristiques phénotypiques et, plus précisément, chacun des nouveaux traits et caractéristiques qui peuvent être exprimés ou réprimés

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

1.4.2 Structure et nombre de vecteur et/ou d'ADN du donneur présent dans le MGM

Le génome de la souche de production a été séquencé entièrement et un assemblage *de novo* a été réalisé. Le rapport d'analyse du séquençage a été mis à disposition par l'EFSA en complément du dossier initial, le 25 février 2022. Le GT « Biotechnologie » note que le nombre de copies du gène codant la léghémoglobine n'est pas précisément indiqué par le pétitionnaire et varie selon les sections du dossier. De plus, le pétitionnaire mentionne la recherche de gènes d'antibiorésistance par séquençage total, mais n'en fournit pas les données.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire fournisse les résultats de cette recherche, qui devra être effectuée selon les préconisations retenues dans *EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain*² (2021).

1.4.3 - 1.4.6

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour ces sections n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

1.4.5 Historique d'utilisation antérieure du MGM

Le pétitionnaire mentionne que des produits d'analogues de viande contenant de la léghémoglobine de soja sont déjà sur le marché aux Etats-Unis, à Singapour, Hong-Kong et Macao (dossier sections B.4.8 et C.4.8).

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande à ce que soit précisé si la souche de production concernée est celle soumise pour cette demande d'autorisation, ou s'il s'agit d'une autre souche qu'il conviendrait de préciser.

1.4.8 Sécurité pour l'Homme et les animaux

Le pétitionnaire retient la classification QPS pour sa souche de production. Selon *Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021*³ (2022), « for *K. phaffi*, the QPS applies for production purposes only (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass) ». Seule l'absence de levures totales est mentionnée dans le dossier.

Pour envisager une évaluation dans le cadre d'une classification QPS de cette souche, le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire démontre l'absence de cellules viables, viables non cultivables ou intactes de la souche de production, selon une méthode recensée dans le document *Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes*⁴ (2019). Le pétitionnaire devra également fournir les résultats de la recherche de gènes d'antibiorésistance dans le génome de la souche de production selon les préconisations retenues dans *EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain*² (2021).

2. Informations concernant le produit

2.1. Informations liées au procédé de production

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande à ce que les conditions opératoires du procédé de production et de purification soient davantage détaillées par le pétitionnaire, comme exigé dans *Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use*¹ (2011), en particulier pour les étapes de filtration, de lyse mécanique et de traitement thermique.

2.2. Informations liées au procédé de préparation du produit

2.2.1 Démonstration de l'absence du MGM dans le produit

L'absence de cellules de levures totales et de bactéries pathogènes dans 25 g a été vérifiée dans 3 lots de production. Aucune recherche spécifique de la souche de production n'est cependant effectuée.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire démontre l'absence de cellules viables, viables non cultivables ou intactes de la souche de production, selon une méthode recensée dans le document *Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes*⁴ (2019). Par ailleurs, le GT « Biotechnologie » de l'Anses estime que la classification du produit en catégorie 3 comme décrit dans le document *Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use*¹ (2011) est directement dépendante de cette démonstration.

2.2.2 Information sur l'inactivation des cellules de MGM et évaluation de la présence de cellules intactes restantes

cf. B.2.2.1

2.2.3 Information sur la présence potentielle d'ADN recombinant

Le pétitionnaire indique la présence d'ADN de la souche de production dans le produit LegH Prep. Comme indiqué au point 1.4.2, le pétitionnaire mentionne la recherche de gènes d'antibiorésistance par séquençage total du génome, mais n'en fournit pas les données. Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire fournisse les résultats de cette recherche, qui devra être effectuée selon les préconisations retenues dans *EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain*² (2021).

2.3. Description du produit

2.3.1 – 2.3.2

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour ces sections n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

2.3.3 Composition

La teneur en anti-mousse résiduel a été mesurée dans cinq lots de production. Le pétitionnaire a calculé l'exposition à l'antimousse due à la consommation alimentaire de son produit, en se basant sur la plus haute teneur mesurée, mais ce calcul n'est pas expliqué en détail. Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le calcul d'exposition soit détaillé dans le dossier.

2.3.4 Propriétés physiques

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que les informations fournies par le pétitionnaire pour cette section soient complétées en accord avec *Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use*¹ (2011) en précisant par exemple la viscosité ou le pH du produit final, ou une justification de leur absence.

2.3.5 Propriétés technologiques

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses n'a pas expertisé les informations contenues dans cette section. L'évaluation de ces informations relèvera d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1331/2008.

2.4. Considérations sur le produit pour la santé humaine

2.4.1 Toxicologie

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses n'a pas expertisé les informations contenues dans cette section. L'évaluation de ces informations relèvera d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1331/2008.

2.4.2 Allergénicité

Les analyses bio-informatiques effectuées par le pétitionnaire ont été actualisées avec la version 2022 de la banque AllergenOnline par le GT « Biotechnologie » de l'Anses et n'appellent pas de commentaire de sa part.

2.4.3 Evaluation nutritionnelle

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses n'a pas expertisé les informations contenues dans cette section. L'évaluation de ces informations relèvera d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1331/2008.

3. Evaluation de l'exposition/caractérisation de la consommation des denrées alimentaires

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses n'a pas expertisé les informations contenues dans cette section. L'évaluation de ces informations relèvera d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1331/2008.

4. Impact environnemental du MGM et de son produit

4.2. Evaluation des produits de catégorie 3

Comme indiqué au point 2.2.1, le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire démontre l'absence de cellules viables, viables non cultivables ou intactes de la souche de production, selon une méthode recensée dans le document *Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes*⁴ (2019), pour pouvoir considérer la classification du produit en catégorie 3.

C. Caractérisation du risque

Le produit LegH Prep faisant également l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre d'autres réglementations, le champ d'expertise confié au GT « Biotechnologie » de l'Anses dans le cadre de ce dossier se limite à la caractérisation moléculaire, au procédé de production et à l'allergénicité du produit. En conclusion des points précédemment exprimés, le risque relatif au produit commercialisé ne peut pas être totalement caractérisé sur ce champ, en raison notamment (i) du manque d'informations sur le traitement thermique final lors du procédé de production, (ii) de l'absence des résultats de recherche des gènes d'antibiorésistance dans le génome de la souche de production et (iii) du manque de démonstration de l'absence de cellules viables de la souche de production, de cellules viables non cultivables ou intactes dans le produit.

Par ailleurs, le GT « Biotechnologie » de l'Anses attire également l'attention de l'EFSA sur le fait que la léghémoglobine est principalement présente dans les nodules racinaires du soja, partie de la plante dont il n'existe pas d'historique de consommation en alimentation humaine, à ce jour.

Références

1. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. EFSA J. 9, 2193 (2011).
2. European Food Safety Authority (EFSA), E. F. S. EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain. EFSA J. 19, e06506 (2021).
3. Koutsoumanis, K. et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021. EFSA J. 20, e07045 (2022).
4. Silano, V. et al. Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes. EFSA J. 17, e05741 (2019).