



Maisons-Alfort, le 27 octobre 2008

AVIS

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

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le jeudi 31 juillet 2008 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis sur la demande d'autorisation de mise sur le marché d'une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-thréonine par fermentation d'une souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée en tant que produit azoté pour l'alimentation animale au titre du règlement (CE) 1829/2003 (dossier n°EFSA-FR-2008-59).

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-thréonine par fermentation de la souche bactérienne d'*Escherichia coli* (*E. coli*) appelée AG3139. Cette souche dérive de la souche originale K12 qui a été génétiquement modifiée pour accroître considérablement la production de thréonine. La souche finale est nommée *E. coli* K-12 FERM BP-10942 et la L-thréonine produite par fermentation de la souche d'*E. coli* modifiée est utilisée comme additif nutritionnel en alimentation animale.

¹ The EFSA Journal (2006) 374, 1-115

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

Le pétitionnaire préconise l'utilisation de ce co-produit, sous forme granulée, en tant que produit azoté à un taux maximum de 12 % chez le porc, de 8 % chez les ruminants et de 13 % chez les salmonidés. Aucune utilisation en alimentation humaine n'est revendiquée.

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

Un dossier de demande d'autorisation d'emploi d'un co-produit comparable a été déposé en 2007 à l'AESA et a fait l'objet d'une évaluation scientifique par l'Afssa (saisine 2008-SA-0015, avis du 8 avril 2008). Cette demande a été retirée par le pétitionnaire suite à la mise au point d'une nouvelle souche d'*E. coli* génétiquement modifiée. Contrairement à l'ancienne souche, les gènes d'intérêt sont intégrés dans le chromosome bactérien de la souche d'*E. coli* K-12 FERM BP-10942 et les gènes marqueurs de résistance à des antibiotiques ont été éliminés.

B. Informations relatives au microorganisme génétiquement modifié

1. Caractéristiques du microorganisme hôte

La souche bactérienne d'*E. coli* AG3139 utilisée pour la production de L-thréonine dérive de la souche *E. coli* K-12 MG1655 après modifications génétiques afin d'accroître la production de L-thréonine et d'obtenir une plus grande flexibilité des sources possibles de glucides.

La souche réceptrice, qui a été génétiquement modifiée, dérive de la souche originale de Lederberg *Escherichia coli* K12, largement utilisée par les laboratoires de génétique bactérienne. La confirmation de l'identité de l'isolat a été effectuée par ribotypage et sérotypage moléculaire.

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

Une série d'analyses a été réalisée afin de confirmer que :

- la souche réceptrice MG1655 et la souche AG3139, productrice de L-thréonine, ne possèdent pas de gènes de facteurs de virulence,
- la souche réceptrice MG1655, la souche AG3139 et la souche *E. coli* à l'origine de certains gènes donneurs ne présentent pas de facteurs de pathogénie et ne produisent pas d'entérotoxines ou de vérotoxine.

En conséquence, ces souches peuvent être classées dans le groupe 1 selon l'annexe III de la Directive 2000/54/EC (agent biologique dont le risque d'être responsable d'une maladie humaine est peu probable) et sont considérées comme non pathogènes.

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

2. Caractéristiques du microorganisme donneur des gènes d'intérêt

Les séquences introduites dans la souche finale AG3139 ont toutes pour origine le génome ou des vecteurs/transposons d'*E. coli* K12 à l'exception d'un élément dont l'organisme donneur est une autre souche *E. coli*, non pathogène.

Les analyses évoquées ci-dessus (voir § B.1) réalisées sur cette souche confirment qu'elle ne produit pas d'entérotoxines et qu'elle est dépourvue de facteurs de pathogénie.

3. Description de la transformation génétique

La souche réceptrice MG1655 a subi de nombreuses modifications génétiques réalisées en plusieurs étapes, utilisant deux modes de transformation qui aboutissent à l'intégration, parfois en plusieurs copies, des gènes d'intérêt dans le chromosome bactérien. Les gènes modifiés, supprimés ou apportés sont des gènes du métabolisme d'*E. coli* dans l'objectif d'améliorer le flux de synthèse de thréonine.

Pour les dix étapes de la construction, les points suivants sont décrits :

- les étapes intermédiaires,
- les plasmides employés et leurs caractéristiques,
- les gènes d'intérêts,
- la séquence complète des éléments intégrés.

Les techniques de transformation utilisent des vecteurs réplicatifs et intégratifs qui portent les gènes d'intérêt ainsi que des gènes marqueurs de résistance à des antibiotiques. Après l'intégration des gènes d'intérêt, les vecteurs portant les gènes marqueurs de résistance à des antibiotiques sont éliminés.

Certains gènes d'intérêt sont portés par des transposons comportant des gènes marqueurs de résistance à des antibiotiques. Tous les gènes marqueurs de résistance à des antibiotiques ont été éliminés ou inactivés dans la souche finale, AG3139. L'absence des gènes de résistance à la tétracycline, à la streptomycine, à la kanamycine, au chloramphénicol et à la bléomycine a été confirmée par des expériences de Southern blot.

Le nombre de copies de chacun des transgènes insérés a été déterminé ; il varie de 3 à 7.

5. Information relative au Microorganisme Génétiquement Modifié

La souche AG3139 a été considérée en 2005 par la Commission de Génie Génétique (CGG) comme résultant d'un autoclonage. Cette souche est déposée dans une collection de souches japonaise selon les procédures du traité de Budapest.

L'identité de la souche AG3139 en comparaison avec la souche initiale MG1665 a été vérifié par ribotypage et sérotypage moléculaire.

Les résultats d'un antibiogramme de la souche AG3139 montrent qu'elle est sensible à 35 antibiotiques comprenant les antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine et vétérinaire.

La souche AG3139 se distingue de la souche *E. coli* K12 et de la souche MG1665 par :

- la présence d'un élément provenant d'une autre souche *E. coli* non pathogène,
- l'apport de séquences et de gènes provenant de *E. coli* K12 permettant la dérégulation des gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés.

Les sites d'intégration de toutes les copies des transgènes ont été déterminés et les séquences des régions flanquantes ont été analysées. Cette analyse consiste à rechercher des cadres de lecture ouverte (ORF) potentiels dans ces régions et à comparer leurs séquences aux séquences présentes dans les bases de données publiques. Aucune de ces séquences ne correspond à un peptide toxique connu.

La souche AG3139 ne contient pas de gènes de résistance à des antibiotiques (voir §3).

De nouvelles techniques permettant l'intégration stable des gènes d'intérêt dans le chromosome bactérien ont été mises en oeuvre. Les résultats d'expériences de type Southern blot réalisées sur l'ADN extrait de la souche AG3139 après 15 à 20 repiquages successifs, utilisant diverses enzymes de restriction et comme sonde un élément commun à toutes les insertions montrent que les éléments intégrés sont stables et ne se transposent pas.

C. Informations liées au produit Génétiquement Modifié

1. Informations liées au procédé de production

Le produit, objet de la demande, est une biomasse bactérienne tuée et inactivée, co-produit de la fermentation aérobie en « fed batch » d'*E. coli* AG3139.

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 sucrière³ pour l'alimentation humaine. Les données fournies permettent de conclure à la très faible toxicité aiguë et subaiguë de cet agent anti-mousse ainsi qu'à son absence de potentiel mutagène.

La pureté et la constance de la souche de production sont vérifiées.

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

Le procédé de production du produit, objet de la demande, est similaire à celui du produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0015 en dehors d'adaptations liées, notamment, aux caractéristiques de la souche bactérienne (concentration de certains nutriments, débit d'air, pH, température...).

2. Informations liées au procédé de purification

Après fermentation, les bactéries sont inactivées par traitement thermique et acide qui selon la littérature conduit à la perte de viabilité des formes végétatives et à une dénaturation de l'ADN. Ce procédé a fait l'objet d'une démarche HACCP. Il serait souhaitable de décrire les points de contrôle de cette procédure.

Les résultats d'analyses microbiologique et moléculaire (PCR) réalisées sur trois lots de produit montrent l'absence de cellules recombinantes revivifiables et d'ADN potentiellement transférable.

Les résultats des études de marquage fluorescent utilisant l'hybridation *in situ* FISH, la DVC FISH (Direct viable count FISH) et la coloration au DAPI avaient permis de conclure à l'absence de bactérie présentant une activité physiologique dans le co-produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0015.

3. Description du produit

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

La composition chimique du produit a été déterminée sur trois lots fabriqués en conditions industrielles. Ces trois lots n'ont pas subi la granulation, traitement technologique potentiellement à l'origine de modifications de composition des produits.

Les méthodes d'analyse utilisées et les résultats obtenus pour les échantillons de produit sont fournis. Les teneurs en cellulose brute, en glucides, en azote amidique, en acides nucléiques totaux, en acides gras font défaut ainsi que le calcul des taux de protéines vraies. Les analyses microbiologiques réalisées sur un échantillon du produit, objet de la demande, ne révèlent pas de contamination. Cependant, en raison du délai écoulé (14 mois) entre la fabrication et la mise en analyses du produit, les résultats obtenus peuvent ne pas refléter, qualitativement et quantitativement, la flore présente. Les teneurs en dioxines, PCB, HAP, résidus de pesticides présentées dans le dossier ont été mesurées dans le produit, présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0015 mais pas dans le produit, objet de la demande.

Les propriétés physiques du produit fournies sont celles du produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0015. La granulation n'est donc pas prise en compte.

Le comportement et la stabilité du produit en l'état et mélangé à des aliments n'ont pas été déterminés sur le produit, objet de la demande.

La composition chimique des trois lots est comparée à la composition d'un lot du produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0015, fabriqué en conditions industrielles. Cette comparaison montre une teneur en protéines et en acide acétique supérieure pour le produit, objet de la demande, et une teneur en sulfates plus faible. Son pH est de 5,1 au lieu de 4 pour l'autre produit. Ces différences sont trop importantes pour que ces deux produits puissent être considérés comme identiques. Par conséquent, les résultats des essais conduits avec le produit, présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0015, ne peuvent pas être utilisés pour argumenter l'autorisation d'emploi du produit, objet de la demande. Des essais sont à conduire avec ce nouveau produit.

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

L'absence de gènes de résistance à des antibiotiques dans la souche AG3139 a été démontrée (voir § B3).

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

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

- migration de l'ADN sur gel d'agarose,
- expériences PCR classique et PCR quantitative,
- essai de transformation d'une souche bactérienne ayant une forte capacité de transformation.

Les résultats de ces expériences montrent que la majorité des fragments d'ADN sont de petites tailles et que l'état de l'ADN ne permet pas le transfert (par transformation).

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

6.1. Toxicologie

Les deux produits ayant des compositions différentes, les essais de toxicité réalisés avec le produit, présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0015, ne sont pas transposables au produit, objet de la demande.

Les essais de toxicité aiguë, de sensibilisation, de toxicité subchronique et de reprotoxicité ainsi que les essais de tolérance sur espèces cibles sont à réaliser avec le produit, objet de la demande.

Trois essais de génotoxicité ont été conduits avec le produit, objet de la demande. Un essai de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella typhimurium* et une souche d'*E. coli*) et un essai de mutation génique sur des cellules de lymphome de souris ne montrent pas d'induction de mutations géniques. Un essai de mutation chromosomique sur des cellules ovariennes de hamster chinois, en culture, permet de conclure à la non-induction d'aberrations chromosomiques.

6.9. Evaluation nutritionnelle du produit

L'ensemble des études doit être conduit avec le produit, objet de la demande :

- essais de digestibilité chez les espèces cibles,
- essais de performance chez les espèces cibles,
- effets du produit sur la qualité des denrées alimentaires.

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 AG3139, ainsi que des souches étant à l'origine des gènes introduits par la transformation génétique,
- de la nature des gènes apportés ou modifiés par la transformation génétique,
- de l'efficacité démontrée du procédé d'inactivation thermique sur les concentrats aboutissant à l'absence de cellules VNC (viable mais non cultivable),
- de l'improbabilité de transfert de l'ADN vers d'autres organismes,
- de l'absence de gènes de résistance à des antibiotiques,

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 l'animal.

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

L'Afssa considère que le produit, objet de la demande, présente des différences de composition trop importantes avec le produit, objet de la demande du dossier 2008-SA-0015 (avis de l'Afssa du 8 avril 2008) pour que les analyses et résultats des essais réalisés avec ce produit soient transposables à la demande actuelle. Par conséquent, les éléments scientifiques fournis sont insuffisants pour statuer sur la biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la

production de L-thréonine par fermentation de la souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée AG3139, en tant que produit azoté pour l'alimentation animale.

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

**La Directrice Générale
Pascale BRIAND**