



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 22 décembre 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-lysine 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 6 octobre 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-lysine 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-2008-61).

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 « Alimentation animale », réuni le 18 novembre 2008 et « Biotechnologie », réuni le 18 décembre 2008, l'Afssa rend l'avis suivant :

Argumentaire

A. Information générale

Le produit, objet de la demande, est une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-lysine par fermentation de la souche bactérienne d'*Escherichia coli* (*E. coli*) appelée N°19E. Cette souche dérive de la souche originale K12 qui a été génétiquement modifiée pour accroître la production de lysine. La souche finale est nommée *E. coli* K-12 FERM BP-10941 et la L-lysine produite par fermentation de la souche d'*E. coli* modifiée est utilisée comme additif nutritionnel en alimentation animale.

Le pétitionnaire préconise l'utilisation de ce co-produit, sous forme granulée, en tant que produit azoté à un taux maximum de 7 % chez le porc, de 8 % chez les ruminants et de 13 % chez les salmonidés. Aucune utilisation en alimentation humaine n'est revendiquée.

27-31, avenue
du Général Leclerc
94701

Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 50
Fax 01 49 77 26 13
www.afssa.fr

REPUBLIQUE
FRANÇAISE

¹ The EFSA Journal (2006) 374, 1-115

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

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-0016, 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.

B. Informations relatives au microorganisme génétiquement modifié

La souche bactérienne d'*E. coli* N°19E (FERM BP-10941) utilisée pour la production de L-lysine dérive de la souche *E. coli* K-12 S B-7 après modifications génétiques afin d'accroître la production de L-lysine et d'obtenir une plus grande flexibilité des sources possibles de glucides pour la fermentation.

1. Caractéristiques du microorganisme hôte

La souche réceptrice *E. coli* K-12 S B-7 dérive par une série de mutagenèses de la souche originale de Lederberg *Escherichia coli* K12, largement utilisée par les laboratoires de génétique bactérienne. Elle ne contient ni prophage, ni plasmide conjugatif, ni plasmide auto-transmissible.

La souche K12 d'origine a été listée comme microorganisme non pathogène dont le caractère non toxigène est documenté. L'absence de pathogénicité (infectiosité, toxigénicité, virulence) est démontrée par plusieurs études sur la souche réceptrice *E. coli* K-12 S B-7, les souches de construction intermédiaires et la souche de production N°19E.

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, non toxigènes.

La confirmation de l'identité de l'isolat *E. coli* K-12 S B-7 a été effectuée par ribotypage et sérotypage moléculaire.

2. Caractéristiques du microorganisme donneur des gènes d'intérêt

Les séquences introduites ou modifiées dans la souche finale N°19E ont toutes comme origine le génome ou des vecteurs/transposons d'*E. coli* K12 à l'exception :

- d'un élément dont l'organisme donneur est la souche *E. coli* H155. Cette souche ne produit pas d'entérotoxine et ne présente pas de facteur de pathogénicité,
- d'un gène provenant d'un autre microorganisme non pathogène largement utilisé en microbiologie industrielle et bien décrit dans le dossier.

3. Description de la transformation génétique

La souche réceptrice *E. coli* K-12 S B-7 a subi des modifications génétiques successives, utilisant deux modes de transformation génétique conduisant à l'intégration chromosomique des gènes d'intérêt. L'ensemble des étapes et des souches intermédiaires est décrit très précisément. Les sites d'intégration de chaque cassette sont détaillés.

En définitive, plusieurs copies des gènes d'intérêt sont intégrées dans le chromosome bactérien de la souche de production (*E. coli* N°19E), les séquences de construction non désirées sont éliminées et les gènes de résistance à des antibiotiques utilisés pour la sélection sont évincés. Aucun plasmide additionnel n'est conservé dans la souche de production.

4. Identification du microorganisme conventionnel équivalent et de ses caractéristiques

Sans objet.

5. Information relative au Microorganisme Génétiquement Modifié

La souche *E. coli* N°19E a été déposée dans une collection de souches japonaise selon les procédures du traité de Budapest sous la référence FERM BP-10941. Dans son avis du 5 juillet 2007, la CGG³ a classé cette souche dans le groupe I classe 1 confinement L1.

L'identité de la souche *E. coli* N°19E en comparaison avec la souche hôte *E. coli* K-12 S B-7 a été vérifiée par ribotypage et sérotypage moléculaire.

Les résultats d'un antibiogramme de la souche *E. coli* N°19E montrent qu'elle est sensible aux 29 antibiotiques testés comprenant les antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine et vétérinaire. L'absence des gènes de résistance aux trois antibiotiques utilisés au cours de la transformation est confirmée par des expériences de Southern blot.

La recherche des cadres ouverts de lecture générés par l'intégration des transgènes n'a pas mis en évidence de séquences correspondant à un peptide toxique.

La stabilité de la souche de production a été vérifiée concernant le niveau de production de L-lysine et concernant les caractéristiques génétiques après 15 à 20 générations par analyse du profil d'hybridation en analyse Southern blot. Les transgènes sont intégrés dans le chromosome bactérien et n'ont pas la capacité de transposition vers d'autres organismes.

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* N°19E.

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 sucrière⁴ pour l'alimentation humaine. Les données fournies permettent de conclure à la très faible toxicité aiguë 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.

Le procédé de production du produit, objet de la demande, est similaire à celui du produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0016 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.

Une analyse bactériologique sur milieu spécifique est réalisée pour vérifier l'absence de cellules recombinantes revivifiables. Les résultats d'analyse ne sont pas présentés.

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-lysine par fermentation sur substrats végétaux d'origine agricole d'une souche d'*E. coli* génétiquement modifiée. Selon l'arrêté du 27 août

³ Commission du Génie Génétique

⁴ Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

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 deux lots fabriqués en conditions industrielles mais pour un lot, le séchage a été effectué en installation pilote. La composition de ces deux lots est similaire lorsque rapportée à la matière sèche. Ces deux 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 protéines brutes, matières grasses brutes, cendres brutes sont données pour les deux échantillons mais pas les teneurs en cellulose brute et en glucides. Les limites de variation ne sont pas fournies. Les analyses microbiologiques réalisées sur les deux échantillons de produit, objet de la demande, ne révèlent pas de contamination. 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-0016 mais pas dans le produit, objet de la demande.

Les propriétés physiques du produit, objet de la demande, fournies dans ce dossier sont celles du produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0016. 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 mais sur celui présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0016.

La composition chimique des deux lots est comparée à la composition d'un lot du produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0016, fabriqué en conditions industrielles. Cette comparaison montre une teneur en matières grasses brutes et en acides aminés (notamment en lysine libre) supérieure pour le produit, objet de la demande, et une teneur en protéines, en azote ammoniacal, en sulfates, en chlorures, en vitamines B2, B3 et B5 plus faible. 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-0016, 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

Plusieurs études ont été menées sur le produit, objet de la demande, qui n'ont pas permis de détecter la présence de cellules viables et d'ADN transférable après le processus d'inactivation. L'ADN est fortement dégradé.

Les résultats de l'essai de transformation d'une souche bactérienne ayant une forte capacité de transformation sont ceux de l'expérience réalisée avec le produit présenté dans le dossier 2008-SA-0015. Ils montrent que l'état de l'ADN ne permet pas le transfert par transformation.

5. Comparaison du produit GM avec son équivalent conventionnel

Sans objet.

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

6.1. Toxicologie

Un essai de toxicité subchronique a été réalisé avec 3 doses, aussi bien du produit, objet de la demande que du produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0016. Ces deux essais de toxicité subchronique par administration orale répétée pendant 3 mois chez le Rat permettent de fixer une dose sans effet de 3 % du produit dans l'aliment complet, pour les deux produits.

Trois essais de génotoxicité ont été conduits avec le produit, objet de la demande, et avec le produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0016. Pour les deux produits, 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. Pour les deux produits, un essai sur des cellules ovariennes de Hamster chinois, en culture, permet de conclure à l'absence d'aberrations chromosomiques.

Les deux produits de nature proche présentent des toxicités subchronique et génétique similaires. Dans le cadre de l'évaluation de la sécurité du produit, objet de la demande, les essais de toxicité aiguë, de sensibilisation et de tératogenèse chez le Rat, réalisés avec le produit présenté dans le dossier de saisine 2008-SA-0016, sont considérés comme transposables au produit, objet de la demande.

Conformément aux lignes directrices communautaires et comme demandé dans l'avis du 8 avril 2008 (saisine 2008-SA-0016), ces études de toxicité devraient être complétées par un essai de reprotoxicité sur au moins deux générations en ligne directe, par un essai de tératogenèse chez le lapin et par un essai de toxicité chronique chez deux espèces animales dont l'une appartient à l'ordre des rongeurs (étude d'une durée supérieure ou égale à deux ans chez le Rat ou étude d'une durée supérieure ou égale à 80 semaines chez la Souris) et l'autre à une espèce non-rongeur. Ces études ainsi que des essais de tolérance sur espèces cibles sont à réaliser avec le produit, objet de la demande.

6.9. Evaluation nutritionnelle du produit

Pour permettre l'évaluation nutritionnelle du produit, les études suivantes doivent être conduites 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-pathogénie démontrée de la souche N°19E et des microorganismes donneurs des gènes d'intérêt,
- 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 dans la souche de production,

la construction génétique de la souche *E. coli* N°19E 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 consommateur.

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-0016 (avis de l'Afssa du 8 avril 2008) pour que les analyses de composition et résultats des essais d'évaluation nutritionnelle réalisés avec ce produit soient transposables à la demande actuelle. Par conséquent, les éléments scientifiques fournis sont insuffisants pour statuer sur la biomasse de bactéries tuées et séchées, co-produit de la production de L-lysine par fermentation de la souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée N°19E, 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**