

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 25 février 2015

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

relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une alpha-amylase
issue d'une souche génétiquement modifiée de *Bacillus licheniformis* contenant le gène
codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus* pour la brasserie,
l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable

Le présent document est un extrait de l'avis du 25 février 2015, après suppression des parties confidentielles qui relèvent du secret industriel ou commercial, non publiables.

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 3 juin 2014 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 d'emploi d'une alpha-amylase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Bacillus licheniformis* contenant le gène codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus* pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Suite à l'expertise d'un dossier de demande d'avis relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une alpha-amylase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Bacillus licheniformis* contenant le gène codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus* pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable, l'Anses a rendu un avis défavorable le 18 avril 2012 en raison d'interrogations sur la génotoxicité de l'enzyme alimentaire et d'un besoin de justification sur le calcul de la marge de sécurité.

Le 3 juin 2014, les informations complémentaires apportées par le pétitionnaire ont été transmises à l'Anses par la DGCCRF conduisant à l'ouverture de cette saisine liée.

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) ».

Après consultation du GT « Biotechnologie », réuni les 17 juillet et 28 octobre 2014, l'Anses a effectué auprès de la DGCCRF, deux demandes de compléments d'information, les 23 juillet et 3 novembre 2014. Elles ont fait l'objet de réponses respectivement les 14 octobre 2014 et 13 janvier 2015 permettant de poursuivre l'expertise.

L'expertise collective a été réalisée sur la base de 5 rapports d'expertise, par le Groupe de travail « Biotechnologie », réuni les 17 juillet 2014, 28 octobre 2014 et 18 février 2015.

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 10 mai 2011¹ fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine.

Selon l'article 1 de l'arrêté du 7 mars 2011², le dossier doit être établi selon le guide³ de l'EFSA pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

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 rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

3.1 Données sur la génotoxicité

Les tests de génotoxicité présentés lors de la première demande [test de mutation réverse sur cinq souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante (test d'Ames) et test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes périphériques humains, en culture] mettaient en œuvre des doses d'enzyme alimentaire plus faibles que les doses classiquement recommandées par l'OCDE. Les effets mutagènes et clastogènes observés dans ces deux tests étaient de faible amplitude mais statistiquement significatifs. La cytotoxicité inhabituelle et les anomalies des tests de génotoxicité observées à des doses d'enzyme testées relativement faibles ne permettaient donc pas de se prononcer sur l'innocuité de cette enzyme alimentaire (avis du 18 avril 2012, saisine 2011-SA-0240).

Dans ce nouveau dossier, trois nouvelles études ont été réalisées : un test de mutation réverse sur quatre souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante et une souche mutante d'*Escherichia coli* (test d'Ames), un test *in vitro* de mutation génique sur des cellules de lymphome thymique de souris et un test *in vitro* du micronoyau sur lymphocytes périphériques humains. Ces

¹ Décret n° 2011-529 du 10 mai 2011 fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine.

² Arrêté du 7 mars 2011 relatif aux lignes directrices pour la constitution des dossiers de demande d'autorisation d'emploi d'auxiliaires technologiques en alimentation humaine

³ Guidance of EFSA prepared by the Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids on the Submission of a Dossier on Food Enzymes. *The EFSA Journal* (2009) 1305, 1-26

études ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE⁴ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

Le pétitionnaire indique avoir conduit ces trois nouvelles études avec le même lot d'enzyme alimentaire que les deux premières études présentées dans la saisine initiale (saisine 2011-SA-0240). Les trois études ont été réalisées à différentes doses pour le produit à tester (enzyme alimentaire), en présence et en absence de système d'activation métabolique S9 et avec les contrôles positifs et négatifs appropriés.

La nouvelle étude de mutation réverse sur bactéries (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante et une souche d'*Escherichia coli* tryptophane dépendante) est réalisée à des concentrations d'enzyme pouvant atteindre 5000 µg/boîte (dose maximale recommandée par la ligne directrice de l'OCDE) en présence de système d'activation métabolique S9 et de 500 µg/boîte sans système d'activation métabolique S9. Elle ne révèle pas d'augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire et donc pas d'effet mutagène.

Quelle que soit la dose d'enzyme mise en œuvre (jusqu'à 250 µg/ml en l'absence de S9 et jusqu'à 5000 µg/ml en présence de S9), l'étude *in vitro* de mutation génique sur des cellules de lymphome thymique de souris L5178Y/TK^{+/−} ne révèle pas d'augmentation de la fréquence des mutations supérieure à 90 mutants par million de cellules, critère de positivité de ce test. L'enzyme alimentaire ne montre pas d'effet mutagène dans cette étude.

L'étude *in vitro* du micronoyau sur lymphocytes périphériques humains ne montre pas de différences significatives entre les cellules traitées et témoins pour le pourcentage de cellules binucléées présentant un micronoyau quelle que soit la dose et la condition testée (jusqu'à 500 µg/ml en l'absence de S9 et jusqu'à 5000 µg/ml en présence de S9). L'enzyme alimentaire ne montre donc pas d'effet clastogène dans les conditions testées.

Les résultats de ces trois nouvelles études indiquent que l'enzyme alimentaire ne montre pas de potentiel génotoxique.

Une différence de cytotoxicité est mise en évidence pour un même lot d'enzyme, entre les études du dossier initial et les trois nouvelles études présentées. La comparaison entre le bulletin d'analyse complet de l'enzyme testée présent dans le dossier initial et celui réalisé en 2014 montre la bonne stabilité du lot d'enzyme. Les différences des conditions expérimentales utilisées pour le test d'Ames et la mise en œuvre de deux tests *in vitro* distincts de l'étude du dossier initial peuvent expliquer les différences de cytotoxicité observées entre les études du dossier initial et les trois nouvelles.

3.2 Exposition alimentaire

L'estimation de la consommation maximale de l'enzyme est calculée par la méthode du Budget en considérant le niveau de consommation des denrées alimentaires hors boissons (sauf pour le lait) à 50 g/kg de poids corporel/jour et une proportion de 25 % de ces denrées consommées quotidiennement par la population générale traitées par l'enzyme à la dose maximale recommandée avec une activité enzymatique conservée intégralement. Le niveau de consommation des boissons (sauf pour le lait) est estimé à 100 ml/kg de poids corporel/jour. Dans ce cas, l'enzyme étant destinée uniquement à des boissons alcoolisées distillées, une proportion de 10 % des denrées consommées quotidiennement est retenue en considérant qu'elles sont traitées par l'enzyme à la dose maximale recommandée avec une activité enzymatique conservée intégralement.

⁴ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

Le rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité à 90 jours chez le Rat (66,81 mg TOS/kg de poids corporel/jour) divisée par la consommation maximale de l'enzyme *via* les denrées alimentaires solides et liquides permet de calculer une marge de sécurité de 109.

3.3 Conclusion du GT

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette alpha-amylase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Bacillus licheniformis* contenant le gène codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus* (souche DP-Dzb45) pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) n'a pas mis en évidence de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette alpha-amylase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Bacillus licheniformis* contenant le gène codant une alpha-amylase de *Geobacillus stearothermophilus* (souche DP-Dzb45) pour la brasserie, l'amidonnerie, la production de sirops de glucose et l'industrie de l'alcool potable. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, alpha-amylase, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, amidonnerie, brasserie, production de sirop, alcool potable