

Maisons-Alfort, le 29 mars 2004

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
sur l'autorisation définitive d'un additif de la catégorie des enzymes  
à base de 6-phytase destiné aux poulets à l'engraissement, poules pondeuses,  
dindons, porcelets, porcs et truies**

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

Par courrier reçu le 5 août 2003, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 1<sup>er</sup> août 2003, par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, d'une demande d'avis sur l'autorisation définitive d'un additif de la catégorie des enzymes à base de 6-phytase destiné aux poulets à l'engraissement, poules pondeuses, dindons, porcelets, porcs et truies.

Ce dossier entre dans le cadre de la directive 70/524/CEE modifiée et doit être établi selon les lignes directrices fixées par la directive 87/153/CEE du Conseil du 16 février 1987 modifiée.

L'additif est actuellement autorisé de façon provisoire, chez ces espèces animales, sous des formes moins concentrées (5000 et 2500 FYT<sup>1</sup>/g d'additif) et produites à partir d'une souche différente d'*Aspergillus oryzae* (DSM 11857). Parallèlement à l'autorisation définitive de l'additif issu de la nouvelle souche, le pétitionnaire demande l'augmentation des activités phytasiques de 5000 à 20 000 FYT/kg d'aliment complet pour la forme liquide et de 2500 à 5000 FYT/kg d'aliment complet pour la forme granulée.

L'additif est une préparation enzymatique à base de 6-phytase EC 3.1.3.26. obtenue par *Aspergillus oryzae* DSM 14223 à partir d'un gène de *Peniophora lycii*. Il se présente sous formes liquide et granulée contenant respectivement 20 000 et 5000 FYT par gramme d'additif.

Les doses d'incorporation de l'additif recommandées par le pétitionnaire correspondent aux activités enzymatiques suivantes (en FYT / kg d'aliment complet) :

	Dose minimale	Doses recommandées
Poulet à l'engraissement	250	500 - 1000
Poule pondeuse	300	450 - 1000
Dindon à l'engraissement	250	500 - 1000
Porcelet	250*	500 - 1000
Porc à l'engraissement	250*	500 - 1000
Truie	750	750 - 1000

\* Ces doses minimales ont été abaissées par rapport à l'autorisation provisoire

Cet additif est préconisé durant toute la durée d'alimentation des animaux pour améliorer la digestibilité du phosphore des aliments contenant des produits végétaux riches en phytates (au moins 0,25 % de phosphore phytique).

27-31, avenue  
du Général Leclerc  
BP 19, 94701  
Maisons-Alfort cedex  
Tel 01 49 77 13 50  
Fax 01 49 77 26 13  
www.afssa.fr

REPUBLIQUE  
FRANÇAISE

<sup>1</sup> 1 FYT = quantité d'enzyme libérant 1 micromole de phosphate inorganique par minute à partir de phytate de sodium, à pH 5,5 et à 37 °C.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Alimentation animale », réuni les 11 février et 10 mars 2004, l'Afssa rend l'avis suivant.

### **Considérations relatives à la sécurité de la nouvelle souche productrice**

Les ancienne (DSM 11857) et nouvelle (DSM 14223) souches productrices de la phytase sont construites à partir d'*Aspergillus oryzae* A1560 génétiquement modifié par l'introduction du même gène de *Peniophora lycii* codant pour la phytase.

La nouvelle souche se distingue de l'ancienne souche sur deux points de sa construction génétique :

- le remplacement du gène de sélection du plasmide recombinant codant pour la résistance à l'ampicilline par un gène codant pour l'utilisation métabolique de l'acétamide ;
- la suppression de la production de deux métabolites secondaires (acide cyclopiazonique et acide kojique).

La stabilité génétique des gènes insérés et l'absence de gène de résistance aux antibiotiques dans la nouvelle souche sont démontrées.

L'innocuité de la phytase produite par la nouvelle souche est démontrée aux niveaux oculaire et cutané ainsi que par inhalation.

Des études de toxicité sub-chronique conduites sur des rats n'ont révélé aucun signe clinique ou lésions anormales après deux et treize semaines. Le rapport final de cette deuxième étude n'a pas été fourni.

L'analyse (électrophorèse, comparaison des séquences des acides aminés N-terminaux) des phytases issues de la souche d'origine (*Peniophora lycii*), de l'ancienne (*A. oryzae* DSM 11857) et de la nouvelle souche (*A. oryzae* DSM 14223) indique leur similitude biochimique, ainsi que l'équivalence de leur stabilité et de leur activité en fonction du pH et de la température.

### **Considérations relatives à l'identité, aux caractéristiques et aux conditions d'emploi de l'additif**

La stabilité des formes granulée et liquide de l'additif sous sa nouvelle version (nouvelle souche et activités enzymatiques plus élevées) est acceptable après 12 mois de stockage à 25 °C.

La stabilité de l'additif dans les prémélanges (forme granulée) et dans les aliments (formes granulée et liquide) est satisfaisante après 3 mois de stockage à 25 °C. L'homogénéité dans les prémélanges et les aliments est également établie.

### **Considérations relatives à l'efficacité de l'additif**

#### ***Chez le poulet à l'engraissement,***

Neuf essais d'efficacité, dont sept réalisés depuis l'autorisation provisoire, sont présentés pour évaluer l'effet de différentes doses d'additif (correspondant à des activités enzymatiques de 250 à 1000 FYT/kg d'aliment complet) sur l'hydrolyse du phosphore phytique, la digestibilité apparente du phosphore et du calcium et les performances de croissance du poulet. Le dernier essai récent compare l'efficacité de l'additif issu de la nouvelle souche à celle de l'additif issu de l'ancienne souche.

Les deux essais présentés dans le cadre de l'autorisation provisoire montraient qu'une dose d'additif correspondant à une activité enzymatique de 250 FYT/kg d'aliment complet

augmentait significativement d'une part, la digestibilité du phosphore et l'énergie métabolisable, et, d'autre part, le gain moyen quotidien des animaux.

En ce qui concerne les essais récents, les niveaux de phytase dans l'aliment sont vérifiés mais les données expérimentales brutes ne sont pas fournies.

#### ***Chez les poules pondeuses,***

Cinq essais, dont trois réalisés depuis l'autorisation provisoire, sont présentés pour évaluer l'effet de différentes doses d'additif (correspondant à des activités enzymatiques de 250 à 1000 FYT/kg d'aliment complet) sur l'hydrolyse du phosphore phytique, le rejet de phosphore, les performances de production et la qualité de la coquille chez les poules pondeuses. Le dernier essai étudie spécifiquement l'efficacité de l'additif issu de la nouvelle souche.

Un des essais présentés dans le cadre de l'autorisation provisoire montrait un effet positif de doses d'additif correspondant à des activités enzymatiques de 250, 500 et 1000 FYT/kg d'aliment complet sur l'absorption de phosphore et la dégradation de phosphore phytique chez des animaux carencés en phosphore (1,1 g/kg d'aliment). Cet effet n'est pas confirmé dans le deuxième essai lorsque l'apport de phosphore est de 1,7 g/kg d'aliment.

Les données expérimentales brutes des essais récents ne sont pas fournies et les niveaux de phytase dans les aliments ne sont analysés que dans deux essais sur trois.

#### ***Chez les dindons à l'engraissement,***

Sept essais, dont cinq réalisés depuis l'autorisation provisoire, sont présentés pour évaluer l'effet de différentes doses d'additif (correspondant à des activités enzymatiques de 250 à 750 FYT/kg d'aliment complet) sur la digestibilité apparente du phosphore et du calcium, les performances de croissance et la minéralisation osseuse. Aucun essai n'a été réalisé sur l'efficacité de l'additif issu de la nouvelle souche.

Les deux essais présentés dans le cadre de l'autorisation provisoire montraient une amélioration de la rétention du phosphore et du calcium, de la minéralisation osseuse ainsi que de la croissance des animaux dès une dose d'incorporation d'additif correspondant à 250 FYT/kg d'aliment complet.

En ce qui concerne les essais récents, les niveaux de phytase dans les aliments sont vérifiés mais les données expérimentales brutes ne sont pas fournies.

#### ***Chez les porcelets sevrés,***

Huit essais, dont cinq réalisés depuis l'autorisation provisoire, sont présentés pour évaluer l'effet de différentes doses d'additif (correspondant à des activités enzymatiques de 250 à 1000 FYT/kg d'aliment complet) sur la digestibilité fécale apparente du phosphore et du calcium, les performances de croissance et la résistance à la rupture de l'os. Le dernier essai étudie spécifiquement l'efficacité de l'additif issu de la nouvelle souche.

Les essais présentés dans le cadre de l'autorisation provisoire montraient l'efficacité de toutes les doses testées (correspondant à 250, 500, 750 et 1000 FYT/kg d'aliment complet) sur la digestibilité du phosphore et du calcium. Le manque d'information sur le contrôle des activités phytasiques dans les aliments ou sur le protocole expérimental, nombre de répétitions par traitement notamment, ne permet cependant pas de considérer ces essais pour l'autorisation définitive.

Deux des essais récents (essais 3 et 4) montrent une incohérence au niveau du nombre de répétitions entre la description du protocole, où l'unité expérimentale correspond à la loge, et l'analyse statistique, où elle correspond à l'animal, qui ne permet pas de juger la validité des résultats concernant la digestibilité du phosphore et du calcium.

Par ailleurs, les données expérimentales brutes ne sont pas fournies pour les essais récents, à l'exception d'un essai, et l'activité enzymatique dans les aliments n'a pas été rapportée dans tous les essais.

#### ***Chez le porc à l'engraissement,***

Neuf essais, dont cinq réalisés depuis l'autorisation provisoire, sont présentés pour évaluer l'effet de différentes doses d'additif (correspondant à des activités enzymatiques de 250 à 1000 FYT/kg d'aliment) sur la digestibilité fécale apparente du phosphore et du calcium, la résistance à la rupture de l'os et les performances de croissance. Deux essais étudient l'efficacité de l'additif issu de la nouvelle souche.

Les essais présentés dans le cadre de l'autorisation provisoire montraient l'efficacité des doses correspondant à 250, 500, 750 et 1000 FYT/kg d'aliment complet sur la digestibilité du phosphore. Un essai indiquait également une amélioration de la digestibilité du calcium pour des activités enzymatiques de 500, 750 et 1000 FYT/kg d'aliment complet. Enfin, deux essais établissaient un effet sur la vitesse de croissance des animaux pour ces mêmes activités enzymatiques. Le manque d'information sur le contrôle des activités phytasiques dans les aliments ou sur le protocole expérimental, nombre de répétitions par traitement notamment, ne permet cependant pas de considérer ces essais pour l'autorisation définitive.

Deux des essais récents (essais 5 et 7), dont un effectué avec l'additif issu de la nouvelle souche, présentent une incohérence au niveau du nombre de répétitions entre la description du protocole, où l'unité expérimentale correspond à la loge, et l'analyse statistique, où elle correspond à l'animal, qui ne permet pas de juger la validité des résultats de digestibilité.

Les données expérimentales brutes des essais récents ne sont pas fournies et l'activité enzymatique dans les aliments n'a pas été rapportée dans deux essais.

#### ***Chez la truie,***

Trois essais, dont un réalisé depuis l'autorisation provisoire, sont présentés pour évaluer l'effet de différentes doses d'additif (correspondant à des activités enzymatiques de 250 à 1000 FYT/kg d'aliment) sur la digestibilité fécale apparente du phosphore, du calcium ou d'autres éléments minéraux. Aucun essai n'a été conduit sur l'efficacité de l'additif issu de la nouvelle souche.

Les deux essais présentés dans le cadre de l'autorisation provisoire montraient l'efficacité des doses d'additif correspondant à 750 et 1000 FYT/kg d'aliment complet sur la digestibilité du phosphore. Un de ces essais montrait également une amélioration de la digestibilité du calcium pour une activité enzymatique de 750 FYT/kg d'aliment complet. Le manque d'information sur le contrôle des activités phytasiques dans les aliments ne permet cependant pas de considérer ces essais pour l'autorisation définitive.

En ce qui concerne l'essai récent, les activités enzymatiques dans les aliments sont contrôlées mais les données expérimentales brutes ne sont pas fournies.

#### **Considérations relatives à la tolérance des espèces cibles à l'additif**

De nouveaux essais de tolérance ont été réalisés chez l'ensemble des espèces cibles, à l'exception de la truie, avec l'additif issu de la nouvelle souche à des doses correspondant à des activités enzymatiques de 10 000 FYT/kg d'aliment complet. Les données expérimentales brutes de ces essais ne sont pas fournies.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que :

1. les éléments scientifiques fournis dans le dossier de demande de changement de souche de l'additif de la catégorie des enzymes à base de 6-phytase EC 3.1.3.26 apportent :
  - la démonstration de l'innocuité de la nouvelle souche productrice de la phytase ;
  - un commencement de preuve de l'innocuité de l'enzyme produite qui doit être confirmée par le rapport final du deuxième essai de toxicité sub-chronique ;
  - la démonstration de l'équivalence de la stabilité et des activités des enzymes issues de l'ancienne et de la nouvelle souche productrice.
2. les éléments scientifiques fournis dans le dossier de demande d'autorisation définitive de l'additif de la catégorie des enzymes à base de 6-phytase destiné aux poulets à l'engraissement, poules pondeuses, dindons, porcelets, porcs et truies démontrent :
  - la stabilité de la nouvelle forme de l'additif (issu de la nouvelle souche et présentant des activités enzymatiques supérieures), ainsi que sa stabilité et son homogénéité dans les prémélanges et les aliments ;
  - la tolérance des espèces cibles à l'additif.
3. en l'absence des données de contrôle de l'activité phytasique dans les aliments, de précisions sur le protocole, et des données expérimentales brutes relatives aux essais récents, elle ne peut se prononcer sur l'efficacité de l'additif de la catégorie des enzymes à base de 6-phytase, aux doses préconisées par le pétitionnaire, sur la digestibilité du phosphore chez le poulet à l'engraissement, la poule pondeuse, le dindon à l'engraissement, le porcelet, le porc à l'engraissement et la truie.

**Martin HIRSCH**