



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 8 avril 2008

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur le dossier de demande d'autorisation d'une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-thréonine par fermentation 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 18 janvier 2008 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes d'une demande d'avis sur le dossier de demande d'autorisation d'une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-thréonine par fermentation d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée, en tant que produit azoté pour l'alimentation animale au titre du règlement (CE) 1829/2003 (dossier n°EFSA-FR62007-44).

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. Il est établi selon les lignes directrices pour 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 mars 2008, et « Biotechnologie », réuni le 20 mars 2008, l'Afssa rend l'avis suivant :

Argumentaire

A. Information générale

Le produit, objet de la demande, est une matière première, co-produit de la production de L-thréonine par fermentation d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée, dénommé PT73 *E. coli* (THR). Le pétitionnaire préconise son utilisation en tant que produit azoté chez le porc à un taux maximum d'incorporation de 12 %, chez les ruminants à un taux maximum d'incorporation de 7,3 % et chez les salmonidés à un taux maximum d'incorporation de 13 %. 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.

La bactérie *Escherichia coli* dérivée de la souche *E. coli* K12 a été modifiée génétiquement pour obtenir une souche hautement productrice de thréonine. La souche finale a été construite à

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.

partir d'une souche réceptrice dans laquelle a été introduit par transformation un plasmide dont tous les gènes fonctionnels proviennent de *E. coli* K12.

La L-thréonine produite par fermentation de la souche d'*Escherichia coli* modifiée est utilisée comme additif nutritionnel en alimentation animale.

B. Informations relatives au microorganisme génétiquement modifié

1. Caractéristiques du microorganisme hôte

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. L'identification moléculaire de la souche parentale, de la souche intermédiaire et de la souche productrice de thréonine a été vérifiée par ribotypage et sérotypage moléculaire à l'Institut Pasteur de Paris.

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 l'absence de pathogénicité (infectivité, toxigénicité et virulence) sur la souche réceptrice, sur une souche intermédiaire et sur la souche *E. coli*, à l'origine de certains gènes donneurs. Les résultats montrent que les bactéries:

- ne possèdent pas de gènes de facteurs de virulence,
- ne présentent pas de facteurs de pathogénicité,
- 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 réceptrice ne possède pas de gène de résistance aux antibiotiques fonctionnels. Cependant, une partie du gène de résistance *npfI* est présent dans son génome.

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 TK7 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 une autre souche *E. coli*, non pathogène. Les études de pathogénicité réalisées sur cette souche confirment, comme pour les souches réceptrice et intermédiaire, qu'elle ne présente pas de caractère de pathogénicité.

3. Description de la transformation génétique

La souche réceptrice a été transformée par le plasmide pK1:APT:AB pour donner la souche finale TK7. Le plasmide a été complètement séquencé et ne possède pas de cadre de lecture ouverte (ORF) inconnu.

Le plasmide pK1:APT:AB est dérivé successivement de deux plasmides non conjugatifs. Il contient 6 éléments fonctionnels dont 5 sont des gènes du métabolisme d'*E. coli* ayant pour objectif d'améliorer le flux de synthèse de thréonine, ces gènes proviennent de diverses souches d'*E. coli* K12. Le 6^{ème} gène est le marqueur de sélection, il s'agit du gène de résistance à la kanamycine *npfI* (amino 3' phosphotransférase).

Le plasmide pK1:APT:AB, présent en faible nombre de copies, est non conjugatif.

5. Information relative au Microorganisme Génétiquement Modifié

La souche TK7 a été considérée par la Commission de Génie Génétique (CGG) comme résultant d'un autoclonage en 2001. Cette souche est déposée dans une collection de souches japonaise selon les procédures du traité de Budapest.

La souche TK7 se distingue de la souche *E. coli* K12 et de la souche réceptrice par :

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

- la présence du gène *nptI* conférant la résistance à la kanamycine.

Etant donné les multiples modifications génétiques réalisées pour aboutir à la souche de production TK7, il est demandé au pétitionnaire de fournir un profil de résistance aux principaux antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire de la souche finale TK7.

La stabilité de la souche est un élément déterminant puisqu'une instabilité pourrait se traduire par un effet sur le processus de production de la L-thréonine. La stabilité est contrôlée selon 3 méthodes, (i) dosage de la production de thréonine après culture pendant 15 générations sans kanamycine, (ii) contrôle du nombre de colonies possédant encore le plasmide après fermentation (proche de 100 %), (iii) analyse du profil de restriction du plasmide isolé en fin de fermentation. Les résultats de ces contrôles n'ont jamais mis en évidence de délétions ou de recombinaisons plasmidiques et montrent que la souche est stable. De plus, le caractère de résistance à la kanamycine permet de s'assurer de la présence du plasmide.

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'*Escherichia coli* TK7.

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.

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

2. Informations liées au procédé de purification

Après fermentation, les bactéries sont inactivées par traitement acide et thermique qui selon la littérature conduit à la perte de viabilité des formes végétatives et à une dénaturation partielle de l'ADN. Ce procédé a fait l'objet d'une démarche HACCP. Dans ce cadre, il est souhaitable d'avoir accès aux données d'enregistrement des auto-contrôles.

L'efficacité du traitement d'inactivation thermique de la biomasse a été vérifiée en utilisant différentes techniques :

- Etalement du produit (5 g) sur milieu contenant de la kanamycine,
- FISH (Fluorescence hybridation *in situ*) qui permet d'observer l'état physiologique des cellules,
- DVC FISH (Direct viable count FISH) qui permet d'observer l'activité métabolique des cellules,
- Coloration au DAPI qui permet de détecter les bactéries mortes ou viables.

Aucune bactérie n'a été détectée après l'étalement. Les études de fluorescence montrent qu'aucune bactérie ne présente une activité physiologique après l'inactivation.

Ce même dossier avait été examiné en 2004 par la Commission de Génie Biomoléculaire qui avait conclu dans son avis du 23 septembre 2004 : « Sur la base des données figurant dans la demande et dans l'état actuel des connaissances, la Commission de Génie Biomoléculaire estime que le co-produit de la production de L-thréonine ne contient pas de microorganisme génétiquement modifié viable ».

3. Description du produit

Le produit, objet de la demande, est un produit organique, biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production d'un acide aminé par fermentation sur substrats agricoles d'une souche d'*Escherichia 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 dont un obtenu en conditions industrielles. Seul, ce lot peut être considéré comme représentatif du produit, objet de la

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

demande. La variabilité des caractéristiques du produit doit être étudiée avec des analyses complémentaires réalisées à partir d'échantillons obtenus dans des conditions industrielles.

Les méthodes d'analyse utilisées et les résultats obtenus pour l'échantillon produit en conditions industrielles sont fournis. Les analyses microbiologiques du produit, objet de la demande, ne révèlent pas de contamination.

Les propriétés physiques du produit ont été établies sur l'échantillon obtenu en conditions industrielles.

Le comportement et la stabilité du produit en l'état et mélangé à des aliments destinés aux porcs ont été déterminés par des analyses microbiologiques et physicochimiques. Les résultats montrent une stabilité de la qualité microbiologique et physicochimique du produit en l'état pendant 12 mois de conservation et des aliments contenant jusqu'à 20 % du produit pendant 6 mois de conservation.

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

Le risque pris en compte dans cette évaluation concerne le transfert du gène de résistance à la kanamycine *nptI* apporté par le plasmide introduit lors de la transformation. Les autres gènes introduits sont des gènes du métabolisme d'*E. coli*.

Un fragment du gène *nptII* est aussi présent dans le génome de la bactérie mais n'est pas fonctionnel.

Le plasmide pK1:APT:AB n'est pas conjugatif, le risque principal à considérer est le transfert génétique par transformation.

Plusieurs analyses ont été réalisées 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,
- amplification PCR de fragment du gène *nptI*,
- transformation d'une souche bactérienne ayant une forte capacité de transformation.

Ces expériences montrent que la majorité des fragments ont une taille inférieure à 1 kb et que l'état de l'ADN n'a permis ni l'amplification, ni le transfert (par transformation) du gène entier *nptI*.

Considérant les caractéristiques de la résistance à la kanamycine apportées par le gène *nptI* :

- La kanamycine est peu utilisée comme antibiotique en thérapeutique humaine,
- La résistance à la kanamycine due au gène *nptI*, comme *nptII*, n'apporte pas la résistance à l'amikacine (dérivé de la kanamycine), antibiotique de « réserve » contre certaines infections nosocomiales,
- Le gène *nptI*, comme *nptII*, est largement répandu dans la nature (sols et bactéries intestinales),
- Le gène *nptII* est classé dans le groupe I de la classification de l'AESA⁴.

En conclusion, sur la base de ces données, la possibilité de transfert de gène à partir de l'ADN présent dans la biomasse est très improbable (cf. avis CGB 24 septembre 2004). De plus, étant donné la nature des gènes présents, en particulier, des gènes de résistance *nptI* et *nptII*, si un transfert avait lieu, cela ne semble pas présenter de risque pour la santé humaine et animale.

⁴ Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants, EFSA 2004, Journal, 48, p.1-18
Group I: It is therefore extremely unlikely (if at all) that the presence of these antibiotic resistance genes in the genome of transgenic plants will change the already existing bulk spread of these antibiotic resistance genes in the environment or will impact significantly on human and animal health.

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

En l'absence de biomasse issue d'*Escherichia coli* non transformée autorisée comme aliment destiné à l'alimentation animale en Europe, une évaluation comparée de risques de type « équivalence en substances » est impossible. La biomasse bactérienne, objet de la demande, correspond à une nouvelle matière première sans historique de consommation par un animal en Europe, raison pour laquelle une évaluation complète des risques a été conduite.

6.1. Toxicologie

6.1.1. Toxicité aiguë et sensibilisation

Un essai de toxicité aiguë par voie orale chez la ratte permet de fixer la DL50 du produit comme supérieure à 1 800 mg/kg de poids corporel. Un essai d'irritation primaire cutanée chez le lapin permet de conclure à l'absence de potentiel irritant et corrosif du produit sur la peau.

Un essai de toxicité aiguë par inhalation chez le rat montre un caractère irritant du produit pour le système respiratoire. Le caractère irritant du produit sur les yeux est identifié par un test d'essai d'irritation primaire oculaire chez le lapin. En raison de la nature protéique du produit, le pétitionnaire considère qu'il possède un potentiel sensibilisant cutané. Ces résultats conduisent à établir des recommandations pour les travailleurs et donc à faire figurer les phrases de risque sur la fiche de sécurité du produit.

6.1.2. Toxicité subchronique et reprotoxicité

Un essai de toxicité subchronique par administration orale répétée pendant 3 mois chez le rat permet de fixer une dose sans effet de 5 % du produit dans l'aliment complet.

L'étude de la fonction de reproduction et du développement chez la ratte (traitement des jours 1 à 21 de la gestation) conclut à une dose sans effet de 10 % du produit dans la ration pour la maternotoxicité et de 20 % pour la fœtotoxicité.

Conformément aux lignes directrices communautaires, 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.

6.1.3. Génotoxicité

Un essai de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella typhimurium* et une souche d'*Escherichia 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 ne permet pas de conclure sans équivoque à la non-induction d'aberrations chromosomiques. Pour s'assurer de l'absence de potentiel génotoxique du produit, il convient donc de compléter ces essais par un second essai de mutation chromosomique en système eucaryote.

6.1.4. Etudes sur espèces cibles

Le pétitionnaire revendique l'utilisation du produit chez le porc, les ruminants et les salmonidés.

Chez le porc en croissance-finition, les résultats des deux essais de tolérance ne montrent aucun effet néfaste jusqu'à 10 % de produit incorporé dans l'aliment. Au-delà de 10 %, les performances de croissance des porcs sont dégradées et leur taux de bilirubine plasmatique augmenté. Des essais de tolérance doivent être conduits chez les ruminants et les salmonidés.

En raison des éléments manquants dans le dossier toxicologique, il n'est pas possible de statuer sur l'innocuité des denrées d'origine animale pour le consommateur humain.

Le pétitionnaire indique que l'agent anti-mousse utilisé dans le procédé de production du produit est susceptible d'être retrouvé dans les tissus comestibles. Il convient que des données quantitatives et qualitatives sur la présence de cet agent anti-mousse dans le produit lui-même et dans les produits animaux consommés par l'Homme soient fournies à partir de lots de produit obtenus avec le taux maximum d'utilisation de l'agent anti-mousse.

6.9. Evaluation nutritionnelle du produit

Des mesures *in vitro* de digestibilité et de dégradabilité du produit montrent une faible dégradabilité ruminale susceptible d'avoir des répercussions sur la digestibilité intestinale et donc sur la biodisponibilité du produit chez les ruminants.

Une évaluation de la valeur nutritive du produit, réalisée dans les systèmes d'unités les plus couramment utilisés en Europe pour les ruminants doit être fournie.

Des essais de digestibilité ont été menés chez le porc, le mouton et la truite arc-en-ciel.

Chez le porc, les digestibilités iléale apparente et fécale du produit sont élevées.

Le produit n'ayant pas été substitué aux différents aliments de la ration dans les mêmes proportions, l'essai de digestibilité sur mouton n'est pas recevable.

Pour la truite arc-en-ciel, les digestibilités observées du produit sont inférieures à celles de la farine de poisson, matière première de référence.

Des essais de performance ont été conduits chez le porc et la truite arc-en-ciel.

Les performances zootechniques des porcs (vitesse de croissance, indice de consommation, poids de carcasse, teneur en viande et épaisseur du muscle) sont similaires chez les animaux recevant une ration témoin et ceux recevant le produit entre 6 et 12 % de l'aliment complet. Toutefois, en raison des tests de tolérance, l'incorporation du produit ne doit pas être supérieure à 10 % de la ration pour les porcs en croissance-finition.

Les performances de croissance mesurées chez des truites arc-en-ciel ont été réalisées par remplacement de la farine de poisson par le produit, objet de la demande, jusqu'à 60 % de substitution. A partir de 40 % du produit incorporé dans l'aliment, l'efficacité alimentaire et la croissance des poissons se sont révélées plus faibles que celles des poissons recevant une alimentation témoin. Les paramètres zootechniques et morphométriques sont identiques jusqu'à 20 % de substitution de la farine de poisson.

Une étude comparative des caractéristiques de la viande de porc, nourri ou non avec le produit, objet de la demande, n'a pas montré de différences.

Conclusions

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

- de la non-pathogénicité démontrée de la souche TK7, ainsi que des souches étant à l'origine des gènes introduits par la transformation génétique,
- de l'efficacité 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 la nature des gènes de résistance aux antibiotiques *nptI* et *nptII* évoqués,

la transformation génétique subie par le microorganisme ne constitue un risque ni spécifique, ni additionnel par rapport à celui de la biomasse. Il est cependant demandé de fournir un profil de résistance aux principaux antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire de la souche finale TK7 pour confirmer l'absence de tout autre gène de résistance fonctionnel.

L'Afssa considère par ailleurs que les éléments scientifiques fournis sont insuffisants pour statuer sur une biomasse bactérienne tuée et séchée, co-produit de la production de L-thréonine par fermentation d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée, en tant que produit azoté pour l'alimentation animale en l'absence :

- des données d'enregistrement des autocontrôles du plan HACCP, liés au processus d'inactivation de la biomasse bactérienne,
- de l'étude de la variabilité des caractéristiques du produit par comparaison avec d'autres échantillons issus de production en conditions industrielles,
- de données quantitatives de la présence d'anti-mousse dans le produit, objet de la demande, et dans les denrées alimentaires issues des animaux nourris avec le produit, d'études complémentaires en toxicologie conformément aux lignes directrices en vigueur,
- d'un essai de tolérance chez les ruminants et les salmonidés,
- d'une évaluation de la valeur nutritive du produit et du taux d'incorporation maximum chez les ruminants.

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

La Directrice Générale

Pascale BRIAND