

Maisons-Alfort, le 28 mars 2003

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à l'autorisation d'emploi d'une hexose oxydase de *Hansenula polymorpha*  
génétiquement modifiée dans les produits de panification et boulangerie fine, les  
pâtes et nouilles, les fromages frais et affinés, les frites de pommes de terre, les  
poudres de blanc d'œufs, les produits à base de protéines de lactosérum, le tofu,  
le ketchup, le mayonnaise et les sauces salades**

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

Par courrier reçu le 14 mai 2002, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 13 mai 2002 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à l'autorisation d'emploi d'une hexose oxydase de *Hansenula polymorpha* génétiquement modifiée dans les produits de panification et boulangerie fine, les pâtes et nouilles, les fromages frais et affinés, les frites de pommes de terre, les poudres de blanc d'œufs, les produits à base de protéines de lactosérum, le tofu, le ketchup, le mayonnaise et les sauces salades.

Après consultation des Comités d'experts spécialisés « Biotechnologie », réuni le 20 février 2003, et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », réuni le 14 janvier 2003, l'Afssa rend l'avis suivant.

### **Applications technologiques envisagées – mécanisme d'action**

Considérant que la demande concerne une préparation enzymatique dont l'activité principale est une hexose oxydase ; que l'action de l'enzyme sur ses substrats (sucres réducteurs) conduit par oxydation à la formation de lactones et de peroxyde d'hydrogène ;

Considérant que le mécanisme métabolique en action est largement répandu chez les êtres vivants, mais que les niveaux de production des métabolites intermédiaires n'ont pas fait l'objet de dosages analytiques dans les produits finis ;

Considérant que du peroxyde d'hydrogène est produit au cours de la réaction enzymatique de l'hexose oxydase et que le dossier d'évaluation ne comporte pas de résultats sur les résidus de peroxyde d'hydrogène ou sur les produits issus de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec les constituants des aliments revendus ;

Considérant que cet emploi dans les produits revendus est souhaité afin de limiter le développement des produits de la réaction de Maillard ;

Considérant que l'emploi de cette enzyme dans la fabrication des produits frits à base de pommes de terre serait une alternative indirecte à l'utilisation de substances anti-germinatives dans le traitement des pommes de terre ;

Considérant que la seule activité enzymatique secondaire reconnue, à l'état de traces, est de type catalase ;

Considérant cependant que la démonstration expérimentale des doses d'emploi nécessaires et suffisantes, pour l'apparition des effets recherchés, n'a pas été présentée pour la majorité des applications envisagées ;

Considérant que l'absence des résidus éventuels de lactose et des contaminants protéiques provenant du lait, à la suite de l'emploi de l'hexose oxydase dans la préparation de tofu, n'a pas été démontrée et que cette démonstration reste importante dans le cas des consommateurs souffrant d'intolérance au lactose ou de réactions allergiques aux protéines de lait ;

### **Souche de production**

#### Identification

Considérant que la souche de production de la préparation enzymatique est une souche recombinée de *Hansenula polymorpha* ; et que le pétitionnaire indique que l'identité de la souche recombinante par rapport à la souche d'origine est corroborée par les résultats des tests toxicologiques réalisés sur la préparation enzymatique, dont la vocation n'est nullement de répondre à une question relative à une identification de souche ;

#### Construction génétique

Considérant que la souche de production a été classée groupe 1, classe 1, confinement L1 par la CGG<sup>1</sup> pour la production d'hexose oxydase envisagée ;

Considérant que le gène codant pour l'hexose oxydase est isolé à partir de l'algue *Chondrus crispus* qui n'est pas connue comme productrice de toxines et qui sert de matière première à la production de carraghénane pour l'industrie alimentaire et cosmétique, et que l'analyse des données bibliographiques ne fait apparaître aucun caractère pathogène, toxigène ou infectieux concernant cette algue ;

Considérant que, dans la mesure où cette algue ne peut être utilisée comme organisme producteur de l'enzyme, le pétitionnaire a inséré le gène de l'enzyme dans la levure *Hansenula polymorpha* ;

#### Toxicité

Considérant qu'au plan taxonomique, les familles *Pichia* et *Hansenula* sont reliées et que *H. polymorpha* a parfois été nommée *Pichia angusta*, *Hansenula angusta*, *Hansenula polymorpha* et *Torulopsis methano-thermo* ;

Considérant que dans les familles *Pichia* et *Hansenula*, les espèces autres que *H. polymorpha* peuvent être pathogènes mais que *H. polymorpha* peut être considérée comme un organisme de production sûr, sans effet toxigène et sans risque décrit de potentiel allergisant ;

Considérant par ailleurs que des souches recombinantes de *H. polymorpha* ont été mises au point pour la production de phytase, de vaccin anti-hépatite B, d'anticoagulants saratine ou hirudine ou d'autres protéines/enzymes ;

### **Procédé de fabrication de la préparatio enzymatique**

Considérant que la préparation enzymatique est issue d'un procédé de fermentation submergée et que, l'enzyme étant produite de façon intracellulaire dans l'organisme hôte, son extraction nécessite l'utilisation de LTAB<sup>2</sup>, suivie d'étapes de centrifugation, filtration/ultra-filtration, concentration et filtration stérilisante conduisant à la purification de l'enzyme ;

<sup>1</sup> Commission de Génie Génétique

<sup>2</sup> Bromure de lauryl triméthyl ammonium

Considérant que des explications ont été demandées au pétitionnaire quant au choix du LTAB utilisé vis-à-vis du CTAB<sup>3</sup>, ce dernier disposant, contrairement au premier, de données de génotoxicité et toxicité générale ;

Considérant que le pétitionnaire a apporté le 29 octobre 2002 les éléments de réponse suivants :

- une extrapolation des données de toxicité du CTAB au LTAB ;
- la référence à un avis de l'Institut CETOX considérant que le mode d'action et le profil de toxicité des différents composants ammoniums quaternaires sont suffisamment similaires de manière générale pour conclure que la toxicité du LTAB ne diffère pas de manière significative de celle du CTAB ;

Considérant que, s'il est vrai que les profils de toxicité des ammoniums quaternaires sont proches, il existe toutefois des différences de toxicité, notamment après administration unique, et des risques d'hypersensibilité plus ou moins marqués. Ces différences sont d'ailleurs illustrées par le choix en seconde intention du LTAB en raison de son activité de « perméation membranaire » deux fois plus élevée que celle du CTAB. La quantité utilisée est ainsi réduite de moitié, ce qui diminue l'exposition des professionnels et des consommateurs, mais pas obligatoirement le risque si la toxicité du LTAB est deux fois plus importante, ce qui n'est pas renseigné ;

Considérant ainsi que les explications apportées ne sont pas convaincantes quant à l'absence de risque sanitaire lié au LTAB ;

Considérant que l'absence du micro-organisme de production est garantie par la filtration stérile réalisée sur la préparation liquide contenant l'enzyme avant atomisation ;

Considérant qu'il n'est pas fait précisément état de l'application d'un programme de Bonnes Pratiques de Fabrication pour la production, le conditionnement et le stockage ;

### **Préparation enzymatique**

#### **Critères de pureté**

Considérant que l'analyse chimique et microbiologique et la recherche d'une éventuelle activité antibiotique portant sur trois lots de produit fini attestent de la conformité de la préparation enzymatique avec les spécifications requises par l'arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi de préparations enzymatiques dans la fabrication de certaines denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine ;

#### **Données de sécurité**

Considérant qu'une attestation issue de l'avis d'un panel d'experts indépendants conclut, sur la base des informations fournies par le pétitionnaire, que le statut GRAS<sup>4</sup> peut être attribué à la préparation enzymatique ;

Considérant que :

- les tests de toxicité orale (tests de toxicités aiguë chez le rat, subaiguë à 2 semaines chez le rat et sub-chronique à 13 semaines chez le rat) n'ont pas mis en évidence d'effet toxique,
- les tests de mutagenèse *in vitro* (test d'Ames sur *Salmonella typhimurium*) n'ont pas mis en évidence d'effet mutagène,
- les tests d'aberration chromosomique *in vitro* sur lymphocytes humains n'ont pas mis en évidence d'effet clastogène,
- une estimation de l'exposition maximalisée est rapportée en fonction des diverses applications envisagées,
- il n'a pas été calculé de facteur de sécurité pour l'ensemble des applications envisagées ;

<sup>3</sup> Bromure d'hexadecyltriméthyl ammonium

<sup>4</sup> Generally Recognized As Safe

Inactivation de la préparation enzymatique dans le produit final

Considérant que, pour que l'hexose oxydase puisse être considérée comme un auxiliaire technologique dans les applications revendiquées, la démonstration de l'inactivation de l'enzyme dans les produits finis devrait être apportée ; considérant que le pétitionnaire revendique une élimination de l'enzyme par la cuisson, la pasteurisation ou le séchage, mais que cette démonstration n'est pas apportée pour l'ensemble des applications revendiquées,

L'Afssa estime que les éléments fournis dans le dossier d'évaluation ne permettent pas de s'assurer de l'innocuité sanitaire pour le consommateur ni de l'intérêt technologique de l'utilisation de cette préparation enzymatique dans l'ensemble des différents produits revendiqués, et rend donc un avis défavorable à cette demande.

**Martin HIRSCH**