



Maisons-Alfort, le 5 juin 2008

## AVIS

### **de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une phospholipase C produite par une souche de *Pichia pastoris* génétiquement modifiée pour la démucilagination des huiles végétales comestibles**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

#### **Rappel de la saisine**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 22 février 2008 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une phospholipase C produite par une souche de *Pichia pastoris* génétiquement modifiée pour la démucilagination des huiles végétales comestibles.

#### **Méthode d'expertise**

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 31 juillet 2001 relatif aux auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine et doit être établi selon le guide pour la constitution d'un dossier relatif à l'emploi de préparations enzymatiques en alimentation humaine (Afssa, 26 septembre 2003).

Après consultation du Comité d'experts spécialisé «Biotechnologie », réuni le 22 mai 2008, l'Afssa rend l'avis suivant :

#### **Argumentaire**

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

###### **Activité enzymatique principale**

Considérant que l'activité enzymatique principale consiste en une phospholipase C (phosphatidylcholine cholinephosphohydrolase, E. C. 3.1.4.3) ;

Considérant que la phospholipase C hydrolyse des liaisons ester en position 3 des phospholipides avec une affinité plus grande pour la phosphatidylcholine (PC) qu'elle convertit en 1,2-diacylglycérol et phosphorylcholine ;

###### **Activités enzymatiques secondaires**

Considérant qu'aucune activité enzymatique secondaire en quantité significative n'a été mise en évidence ;

Considérant qu'aucune activité hémolytique n'a été mesurée ;

###### **Applications technologiques**

Considérant que la préparation enzymatique est un auxiliaire technologique destiné à hydrolyser des phospholipides au cours du raffinage et plus précisément lors de l'étape de démucilagination, de l'huile de soja et d'autres huiles végétales destinées à être utilisées en alimentation humaine ;

### **Souche de production**

#### Sécurité du micro-organisme hôte

Considérant que *Pichia pastoris* SMD 1168 est un micro-organisme reconnu non pathogène et non toxigène pour l'Homme et les animaux ;

#### Obtention de la souche de production

Considérant que le gène codant la phospholipase C a été isolé d'une bibliothèque d'ADN environnementale du sol ;

Considérant que la souche de production de la préparation enzymatique est la souche mutante de *Pichia pastoris* DVSA-PLC-004 ;

Considérant que l'intégration et la stabilité des cassettes d'expression et la construction et la stabilité de la souche de production sont présentées de façon précise ;

### **Procédé de fabrication de la préparation enzymatique**

Considérant que la préparation enzymatique est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation ainsi que les critères de l'Organisation de coopération et de développement économiques en matière de bonne pratique industrielle à grande échelle (BPIGE) ;

Considérant que le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé de fermentation immergée en conditions aérobies en présence de méthanol, suivie d'étapes de cytophérèse, de clarification, de plusieurs filtrations et de formulation ;

Considérant que les matières premières et auxiliaires technologiques utilisés sont de qualité alimentaire ;

### **Préparation enzymatique**

#### Critères de pureté

Considérant que les critères de pureté chimique et biologique répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires ;

#### Données de sécurité

Considérant que toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE<sup>1</sup> et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire ;

Considérant que le test de toxicité orale aiguë par gavage à la dose unique de 2000 mg de préparation enzymatique/kg de poids vif chez le rat n'a révélé aucun effet néfaste ;

Considérant que le test de toxicité orale subaiguë à 14 jours consécutifs chez le rat n'a pas montré de signes cliniques de toxicité jusqu'à la dose maximale testée ;

Considérant que le test de toxicité orale sub-chronique à 90 jours chez le rat a permis de fixer la valeur NOAEL<sup>2</sup> à 2000 mg/kg de poids corporel/jour ;

Considérant que l'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella typhimurium* et une souche d'*Escherichia coli* tryptophane dépendante) n'a révélé

<sup>1</sup> Organisation de Coopération et de Développement Economiques

<sup>2</sup> No Observed Adverse Effect Level

aucune augmentation du nombre de révertants en présence de la préparation enzymatique et donc aucun effet mutagène ;

Considérant que le test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes humains en culture n'a pas mis en évidence d'effet clastogène de la préparation enzymatique ;

Considérant que le test du micronucleus chez la souris n'a pas montré de dommages chromosomiques *in vivo* ;

Considérant que le facteur de sécurité calculé (rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité à 90 jours, sur l'estimation de la consommation maximale de l'enzyme susceptible de se trouver dans la denrée alimentaire) est de 18 300 si la totalité de l'enzyme ajoutée dans l'huile brute est présente dans l'huile consommée (pire cas) et de  $1,8.10^8$  avec une prise en compte de l'élimination de l'enzyme par le procédé de raffinage dans l'huile consommée ;

#### **Devenir de la préparation enzymatique dans le produit final**

Considérant que la phospholipase C est éliminée par les étapes successives du raffinage suite à la démulagination en raison de sa très faible solubilité dans l'huile et de plus, que le résidu d'enzyme potentiel est inactivé par les étapes de chauffage ;

Considérant que le potentiel allergique a été recherché par homologies de séquences dans les bases de données d'allergènes ;

Considérant que les potentiels irritant et sensibilisant ont été évalués par voie dermique,

#### **Conclusion**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que l'emploi d'une phospholipase C produite par la souche de *Pichia pastoris* génétiquement modifiée DVSA-PLC-004 pour la démulagination des huiles végétales comestibles ne présente pas de risque sanitaire pour le consommateur, dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire. L'Afssa rend donc un avis favorable à cette demande.

**Mots clé :** auxiliaire technologique, *Pichia pastoris*, phospholipase C, huiles végétales, démulagination.

**La Directrice Générale**

**Pascale BRIAND**