



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 30 juin 2010

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les informations nécessaires à la dénomination d'une préparation enzymatique destinée à être employée dans la fabrication de denrées alimentaires

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 2 avril 2010 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'appui scientifique et technique sur les informations nécessaires à la dénomination d'une préparation enzymatique destinée à être employée dans la fabrication de denrées alimentaires, dans le cadre de la mise en œuvre du Règlement 1332/2008¹.

2. CONTEXTE

Les Règlements 1331/2008² et 1332/2008¹ portent la réglementation européenne concernant les enzymes alimentaires. Toutefois, selon l'article 24 du Règlement 1332/2008, jusqu'à la publication d'une liste communautaire des enzymes alimentaires, la réglementation nationale des Etats-membres s'applique.

En France, la réglementation nationale sur les préparations enzymatiques s'appuie sur le décret 2001-725³ et l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁴ dans lequel figurent les listes des autorisations d'emploi de préparations enzymatiques en annexes IC et ID.

Chaque entrée de ces listes comprend :

- comme dénomination de l'auxiliaire technologique, le nom de l'activité enzymatique principale avec indication de son origine,
- la catégorie de l'auxiliaire technologique (= enzymes pour ces deux annexes),
- les denrées alimentaires pour la production desquelles l'emploi de cet auxiliaire technologique est autorisé,
- les conditions d'emploi ou fonction de cet auxiliaire technologique,

¹ Règlement (CE) n° 1332/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 concernant les enzymes alimentaires et modifiant la directive 83/417/CEE du Conseil, le Règlement (CE) n° 1493/1999 du Conseil, la directive 2000/13/CE, la directive 2001/112/CE du Conseil et le Règlement (CE) n° 258/97.

² Règlement (CE) n° 1331/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant une procédure d'autorisation uniforme pour les additifs, enzymes et arômes alimentaires.

³ Décret n° 2001-725 du 31 juillet 2011 relatif aux auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine.

⁴ Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

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

- la teneur résiduelle maximale de cet auxiliaire technologique dans les denrées alimentaires (correspondant à l'activité enzymatique résiduelle).

La DGCCRF a sollicité un appui technique de l'Afssa sur la dénomination de l'auxiliaire technologique enzymatique, en particulier sur l'importance de l'indication du nom (code ou numéro d'identité) de souches de micro-organismes de production, en plus du nom de l'espèce.

3. METHODE D'EXPERTISE

Une expertise du dossier a été réalisée en interne par l'unité d'évaluation des risques biologiques de la DERNS (Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires) à l'Afssa avec l'appui du Comité d'experts spécialisé (CES) « Biotechnologie », réuni les 18 mai et 14 juin 2010.

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Afssa est fondé sur l'avis du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

L'Afssa a publié un *guide pour la constitution d'un dossier relatif à l'emploi de préparations enzymatiques en alimentation humaine* le 26 septembre 2003 afin de préciser les données nécessaires pour l'évaluation des risques des préparations enzymatiques. Dans ce cadre, les avis émis par l'Afssa reprennent des indications suffisamment précises pour caractériser chaque préparation enzymatique évaluée.

La présente réflexion du CES « Biotechnologie » ne porte que sur la dénomination des préparations enzymatiques auxiliaires technologiques, destinées à être employées dans la fabrication de denrées alimentaires selon l'arrêté du 19 octobre 2006⁴ modifié.

Dans l'annexe IC de l'arrêté du 19 octobre 2006⁴ modifié, chaque autorisation d'emploi est délivrée pour une préparation enzymatique issue d'un procédé précis (organisme d'origine, procédé de production, procédé de purification...) et pour une fonction technologique précise.

4.1 Définition de la préparation enzymatique :

Une préparation enzymatique est un extrait plus ou moins purifié obtenu à partir de tissus ou organes animaux, végétaux ou de micro-organismes. Une préparation enzymatique est appelée à contenir :

- un ensemble de protéines dont sont décrites seulement l'activité enzymatique principale (activité enzymatique revendiquée) et les activités enzymatiques secondaires pouvant générer un risque sanitaire ou interférer d'un point de vue technologique,
- des substances provenant de l'extraction des tissus animaux ou végétaux ou de la fermentation dans le cas des enzymes issues de micro-organismes,
- des substances ajoutées en vue de la stabilisation et de la standardisation de la préparation enzymatique sur l'activité enzymatique principale.

Les préparations enzymatiques sont donc des mélanges plus ou moins complexes caractérisés par une activité enzymatique principale et un organisme de production.

Ces préparations enzymatiques doivent répondre à l'absence de risque sanitaire pour le consommateur, défini par l'arrêté du 19 octobre 2006⁴ modifié. Cet arrêté spécifie des exigences d'hygiène dans le procédé de fabrication et précise que les préparations enzymatiques ne doivent contenir ni contaminants chimiques, ni contaminants biologiques au-delà des limites réglementaires et ne doivent pas induire de toxicité pour l'Homme. Les préparations enzymatiques issues de micro-organismes ne doivent pas contenir de cellule viable ou revivifiable de la souche de production et pour les MGM, pas non plus d'ADN fonctionnel.

Les activités enzymatiques principales sont désignées selon leur nom systématique ou leur nom accepté. Le numéro de classification enzymatique de la Commission enzyme de l'IUBMB⁵ est indiqué dans le dossier de demande d'autorisation. Il figure dans les avis de l'Afssa. Le numéro de registre CAS⁶ ou le numéro EINECS⁷ ou ELINCS⁸ sont également des alternatives au numéro IUBMB. Ces numéros pourraient être des alternatives au nom systématique dans les autorisations d'emploi.

4.2 Origine de la préparation enzymatique :

Les préparations enzymatiques sont extraites soit de tissus ou d'organes animaux ou végétaux, soit en majorité, sont produites par culture de micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) :

- Pour une origine animale, le tissu ou organe utilisé doit être identifié précisément, propre à la consommation humaine et dépourvu de tout risque infectieux. Les procédés de production doivent être mis en œuvre selon les bonnes pratiques d'hygiène.
- Le matériel végétal utilisé doit être identifié précisément et correspondre à une partie comestible, d'une plante saine. Toute toxicité éventuelle doit être discutée. S'il s'agit d'une plante génétiquement modifiée, le dossier déposé devra suivre les informations exigées par les lignes directrices⁹ de l'EFSA (2006) pour les plantes GM.
- Les micro-organismes utilisés ne doivent pas être pathogènes, ni toxigènes. Ils sont ou non génétiquement modifiés. La production des enzymes se fait via des étapes de culture du micro-organisme puis de purification de la fraction portant l'activité enzymatique recherchée. Les préparations enzymatiques obtenues doivent être dénuées de tout micro-organisme de production.

La source de production conditionne la composition d'une préparation enzymatique en dehors de l'activité enzymatique principale. En cela, c'est un élément indispensable à l'évaluation de la sécurité sanitaire. L'origine de la préparation enzymatique est toujours indiquée dans les autorisations d'emploi inscrites dans l'arrêté du 19 octobre 2006⁴ modifié.

⁵ International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)

⁶ Chemical Abstract Service (CAS)

⁷ European Inventory of Existing Chemical Substances (EINECS)

⁸ European List of Notified Chemical Substances (ELINCS)

⁹ Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed

4.3 Identité du micro-organisme de production :

Les micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) sont la source majoritaire de préparations enzymatiques. Ils peuvent être séparés en deux catégories :

- Micro-organismes non génétiquement modifiés ou autoclonés :

Ces micro-organismes sont des souches répertoriées ou le plus souvent des souches nouvelles issues de souches répertoriées, ayant subi une mutagenèse naturelle ou induite. Les souches mutantes d'intérêt sont sélectionnées principalement sur leur capacité de production de la protéine recherchée.

L'autoclonage était défini par le décret n° 93-774 paragraphe 2.II : « *L'autoclonage consiste en l'insertion dans un micro-organisme d'un acide nucléique en provenance de ce même micro-organisme, d'un micro-organisme de même espèce ou d'une espèce très proche au niveau phylogénétique et avec laquelle des échanges génétiques naturels sont possibles.* »

Pour qu'une souche de micro-organisme puisse être considérée comme résultant d'une opération d'autoclonage, une demande de classement doit être adressée au Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche qui consulte le Haut Conseil des Biotechnologies (HCB).

Pour les micro-organismes non GM ou autoclonés, la source de la préparation enzymatique à citer est donc la souche microbienne de production.

- Micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) :

Les MGM sont des micro-organismes obtenus autrement que par multiplication ou recombinaison naturelle, à l'exception des micro-organismes autoclonés. Les MGM utilisés pour produire des préparations enzymatiques correspondent à la classe de danger C1 des OGM de la Commission de Génie Génétique : « *La classe de danger C1 est constituée par des OGM non pathogènes pour l'Homme, les animaux, les plantes et ne présentant pas d'effet délétère sur l'environnement, pour lesquels la nature du vecteur et/ou de l'insert, quelle que soit la classe de l'organisme à partir duquel il a été cloné, ne conduisent pas à une modification de l'innocuité.* »

La source de la préparation enzymatique est là-aussi la souche microbienne de production mais il est aussi important de connaître la souche hôte (souche avant transformation), le système vecteur et l'origine du transgène d'intérêt.

La souche de production d'une préparation enzymatique GM ou non GM fait partie d'un règne, d'un embranchement, d'une classe, d'une famille, d'un genre, d'une espèce, éventuellement d'une sous-espèce et quelquefois d'un sérotype. La taxonomie est un élément fondamental pour l'évaluation de risques en biotechnologie. La description taxonomique doit donc être la plus précise possible pour chaque souche de production afin de la différencier des autres souches du même groupe taxonomique. Les pétitionnaires doivent utiliser les dernières techniques d'identification des espèces et la nomenclature taxonomique la plus récente.

Pour la dénomination de la souche, le code d'identification peut être attribué par un gérant reconnu d'une collection de souches de micro-organismes. Le traité de Budapest oblige d'ailleurs à ce dépôt dans une collection dans le cadre d'un brevet industriel. Le code d'identification attribué peut être utilisé comme dénomination pour la souche de production, en plus du nom de l'espèce.

4.4 Sécurité des préparations enzymatiques :

La mention du statut GRAS¹⁰ d'une préparation enzymatique, attribué par la FDA¹¹, est un élément d'appréciation de la sécurité qu'il convient cependant de pondérer en fonction de la pertinence des données disponibles.

¹⁰ Generally Recognized As Safe

¹¹ Food and Drug Administration

La nécessité de tests toxicologiques pour les préparations enzymatiques issues de tissus ou organes animaux ou végétaux se décide au cas par cas, en fonction de la nature de ces tissus ou organes.

Par contre, des tests toxicologiques réalisés selon les lignes directrices établies par l'OCDE¹² sont requis systématiquement pour toutes les préparations enzymatiques issues de micro-organismes GM ou non GM. Ces tests sont mis en œuvre afin de révéler la présence éventuelle de substances à effet indésirable dans les préparations enzymatiques.

En dehors de l'activité enzymatique principale, la préparation enzymatique contient des constituants issus du micro-organisme producteur (toxines et métabolites secondaires) et du procédé de fabrication (solvants, milieu de culture, anti-mousse...). Ils sont donc intimement liés à la nature de la souche microbienne de production.

Par ailleurs, la stabilité des souches doit être démontrée, en particulier par l'absence de dérive consécutive aux repiquages, précultures et cultures successives du micro-organisme de production. Par exemple, si le gène codant la protéine d'intérêt est présent sur de l'ADN plasmidique, la stabilité de ce plasmide dans la souche de micro-organisme est nécessaire pour que la préparation enzymatique conserve ses caractéristiques. Ces éléments participent au contrôle de la non-dérive des souches de production. Cette non-dérive est une garantie de la stabilité de composition de la préparation enzymatique isolée d'une fermentation microbienne.

C'est pourquoi la connaissance la plus fine des souches de micro-organismes et des procédés technologiques est importante pour la sécurité sanitaire des préparations enzymatiques.

Les souches de production utilisables pour produire des préparations enzymatiques ne doivent être ni pathogènes, ni toxigènes. Il est capital que ces pré-requis soient validés.

- Micro-organismes non génétiquement modifiés ou autoclonés :

Plusieurs éventualités existent pour ces souches :

- La souche de production appartient à un groupe taxonomique (espèce, sous-espèce...) déjà utilisé pour des applications alimentaires,
- La souche de production n'a jamais été utilisée pour ces applications,
- La souche de production appartient à un groupe taxonomique qui ne compte aucun membre présentant une toxicité ou une pathogénicité,
- Différents statuts de pathogénicité existent dans le groupe taxonomique de la souche de production,
- Le groupe taxonomique de la souche de production est classé QPS¹³ par l'EFSA,
- La souche de production n'a pas encore pu être classée dans un groupe taxonomique.

Dans ces différents cas, les informations existantes sont très hétérogènes. Il convient donc qu'un maximum de données alimente le dossier de demande d'autorisation d'emploi afin de pouvoir se prononcer sur la sécurité du micro-organisme. Dans le cas où la souche de micro-organisme n'est pas classée dans un groupe taxonomique, des études de pathogénicité et de toxigénicité doivent être menées sur des animaux de laboratoire avec la souche de production utilisée dans le dossier de demande. Les données brutes sont nécessaires pour l'analyse de la sécurité de cette souche. Les recommandations de l'Afssa¹⁴ (2002) peuvent être prises comme références indicatives.

Il est à noter que dans la plupart des cas étudiés, les souches de micro-organismes non GM utilisées ne sont pas les souches parentales mais des souches ayant subi une mutagenèse

¹² Organisation de Coopération et de Développement Economiques

¹³ Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal* (2007) 587, 1-16.

¹⁴ Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agroalimentaire- souches nouvelles ou modifiées- application différente de souches déjà utilisées, Afssa, 22 novembre 2002

naturelle (repiquages successifs) ou induite (traitement chimique, irradiation...) suivie d'une sélection. Le but recherché est en général, d'obtenir des souches mutantes métaboliques surproduisant ou permettant une purification plus aisée (production extracellulaire augmentée...) de la protéine d'intérêt. La composition de la préparation enzymatique est alors liée aux métabolites produits par cette souche mutante et également aux conditions de production et de purification optimisées vis-à-vis de cette souche. La composition de la préparation enzymatique pourrait donc être notablement impactée par la substitution en production industrielle d'une souche mutante par une autre souche mutante bien que l'espèce du micro-organisme reste la même.

Il est donc indispensable pour garantir la sécurité d'emploi d'une préparation enzymatique, que son évaluation et son autorisation fassent explicitement référence à la souche de production utilisée, par une dénomination spécifique en plus du nom de l'espèce.

- Micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) :

L'ensemble des remarques sur les micro-organismes non GM s'applique aux souches de micro-organismes hôtes et de production GM.

Pour les MGM, en plus des données sur la souche de production, il est important d'avoir des informations précises sur la souche hôte (souche avant transformation), le système vecteur et l'origine du transgène d'intérêt. Ces trois éléments sont à prendre en compte simultanément du fait que les dangers éventuels de la souche de production résultante peuvent être potentiellement supérieurs à la somme des dangers de chacun de ces éléments pris individuellement. Des données détaillées sont demandées (phylogénie complète de la souche hôte jusqu'à la souche de production, caractérisation moléculaire, caractérisation des gènes marqueurs...). La souche de production MGM doit être identifiée de façon distinctive des souches parentales par un nom précis.

La comparaison de séquences entre le transgène intégré dans la souche de production et le gène présent dans l'organisme d'origine doit être présentée dans le dossier de demande d'autorisation. Dans le cas où ces séquences diffèrent, les conséquences des mutations sur les caractéristiques de l'enzyme recombinante obtenue doivent être caractérisées précisément.

Les vecteurs utilisés doivent être non conjugatifs et non mobilisables. La capacité de remobilisation des séquences intégrées doit être recherchée.

Il est donc indispensable pour garantir la sécurité d'emploi d'une préparation enzymatique, que son évaluation et son autorisation fassent explicitement référence à la souche de production MGM utilisée, par une dénomination spécifique en plus des noms des espèces.

4.5 Suivi des souches de micro-organismes de production :

Les souches de production utilisées doivent être stables, parfaitement caractérisées et avec une filiation établie.

Un contrôle qualité interne à l'entreprise avec suivi des souches doit être mis en place (auto-contrôles, traçabilité...). Les contrôles doivent permettre de vérifier l'absence de souches contaminantes au cours du temps dans la production industrielle.

Le suivi dans l'entreprise doit être suffisant pour affirmer que la souche utilisée en production industrielle est la même que la souche de micro-organisme ayant fait l'objet de l'autorisation d'emploi, et donc de l'évaluation par l'Afssa. Pour cela, il est indispensable que cette souche soit identifiée de façon précise, conservée et qu'elle porte un nom distinct des autres souches de la même espèce.

Lors du dépôt de demande d'extension d'emploi d'une préparation enzymatique à d'autres applications technologiques, l'identité de la souche de production avec celle utilisée dans la première autorisation ainsi que l'équivalence des conditions de production sont des preuves

nécessaires pour s'assurer de la stabilité de la composition de la préparation enzymatique et de sa sécurité d'emploi.

5. CONCLUSION

Les préparations enzymatiques étant des extraits plus ou moins purifiés, il est indispensable que soient clairement précisés et garantis pour chacune d'entre elles l'identification et les caractéristiques de l'activité enzymatique principale ainsi que le mode de production.

La composition d'une préparation enzymatique, en dehors de l'activité enzymatique revendiquée, est liée à son origine et au procédé de production. Que cette origine soit animale, végétale ou microbienne, elle doit être la plus documentée et précise possible. Pour les micro-organismes génétiquement modifiés ou non, le nom de l'espèce est à compléter par l'identité de la souche de production.

En conséquence, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère indispensable que l'évaluation et l'autorisation d'emploi d'une préparation enzymatique donnée mentionnent dans sa dénomination :

- le nom de l'activité enzymatique principale (nom systématique et le numéro de classification enzymatique),
- la source de production [tissus animaux ou végétaux, espèce(s) d'un micro-organisme],
- complétés dans le cas d'un micro-organisme (GM ou non GM), par le nom spécifique de la souche de production ou le code d'identification correspondant, délivré par un gérant d'une collection de souches.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Préparation enzymatique, nom, autorisation, origine, animal, végétal, micro-organisme, souche.