

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 31 juillet 2014

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment
ou d'un ingrédient alimentaire : préparation enzymatique contenant une activité protéase
pour une utilisation dans les compléments alimentaires**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 26 mars 2014 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire : préparation enzymatique contenant une activité protéase pour une utilisation dans les compléments alimentaires.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le nouvel ingrédient (NI) est une préparation enzymatique produite par la souche autoclonée d'*Aspergillus niger* GEP44 contenant une activité enzymatique principale protéasique. Une préparation enzymatique semblable est autorisée en tant qu'auxiliaire technologique en brasserie et pour la production d'hydrolysats de protéines par l'arrêté du 27 août 2009 publié au JORF le 16 octobre 2009. Elle a fait l'objet d'un avis de l'Afssa du 26 avril 2005.

Cette protéase est une enzyme qui clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxyl des résidus proline. Le pétitionnaire souhaite que le NI soit autorisé comme ingrédient dans des compléments alimentaires destinés aux personnes intolérantes au gluten, afin de favoriser la dégradation du gluten, ses protéines étant particulièrement riches en proline.

Lors d'une première expertise, l'Anses a adopté les conclusions des comités d'experts spécialisés (CES) « Biotechnologie » et « Nutrition humaine » et a émis un avis défavorable sur cette demande le 31 août 2012.

Suite à une nouvelle saisine fournissant des pièces complémentaires, l'Anses a adopté de nouveau les conclusions du GT « Biotechnologie » et du CES « Nutrition humaine » sur cette demande le 24 octobre 2013.

Sur la base du dossier fourni, l'Anses n'avait pas mis en évidence de toxicité propre au produit sous réserves :

- 1) d'une surveillance régulière des mycotoxines et autres métabolites secondaires dans la production du NI,
- 2) d'une clarification de la dose quotidienne d'enzyme préconisée *in fine* qui, dans tous les cas, ne doit pas dépasser la dose journalière admissible établie à partir de l'étude de toxicité,
- 3) d'une information claire du consommateur sur le fait que la consommation du produit ne doit pas affecter l'observance d'un régime sans gluten strict, prescrit en particulier pour la maladie cœliaque, et que le produit n'est pas destiné aux enfants de moins de 3 ans.

Par ailleurs, l'Anses souhaitait attirer l'attention :

- sur les effets sanitaires indirects que pourrait occasionner l'usage des produits utilisant cette enzyme, s'il s'accompagne d'un relâchement de l'observance du régime sans gluten strict prescrit sur avis médical ; des enquêtes s'intéressant aux pratiques des consommateurs des compléments alimentaires contenant l'enzyme permettraient de documenter plus précisément ces possibles effets sanitaires indirects,
- sur la difficulté à définir avec précision la nouvelle population cible, compte tenu de l'absence de consensus de la communauté médicale sur l'existence même de la « sensibilité au gluten » hors maladie cœliaque, en l'état actuel des connaissances.

L'Agence soulignait enfin que des évaluations concomitantes de la sécurité et de l'efficacité des nouveaux aliments et ingrédients permettraient d'optimiser les expertises des dossiers soumis.

L'Anses a proposé dans ces précédents avis, que le Nouvel Ingrédient soit placé dans la classe 5.2 : NI constitué de « micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) ou produits à partir de tels micro-organismes » et « le micro-organisme hôte dans lequel est introduite une modification génétique n'a jamais été utilisé comme aliment ou comme source d'aliment dans la Communauté, dans des conditions de préparation et de consommation comparables ».

Toutes les informations requises pour les NI de classe 5.2 sont reprises dans cet avis :

- I. Spécification du NI
- II. Effet du procédé de production appliqué au NI
- III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI
- IV. Effet de la modification génétique sur les propriétés de l'organisme hôte
- V. Stabilité génétique de l'OGM utilisé comme source de NI
- VI. Spécificité de l'expression du nouveau matériel génétique
- VII. Transfert de matériel génétique à partir de MGM
- VIII. Aptitude du micro-organisme génétiquement modifié à survivre dans l'intestin humain et à le coloniser
- IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévus du NI
- X. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI
- XI. Informations d'ordre microbiologique sur le NI
- XII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI.

Pour assurer une lisibilité des expertises de l'Agence sur ce dossier, le présent avis regroupe à la fois :

- les nouvelles conclusions liées aux éléments de réponses reçues dans cette troisième saisine du 26 mars 2014,
- les informations présentes dans les avis du 31 août 2012 (saisine liée n° 2012-SA-0120) et du 24 octobre 2013 (saisine liée n° 2013-SA-0112).

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » (GT pilote) et le comité d'experts spécialisé (CES) « Nutrition humaine » entre le 17 avril et le 18 juillet 2014 sur la base de rapports initiaux rédigés indépendamment par 5 rapporteurs.

Ce dossier entre dans le cadre du Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Le dossier de demande d'autorisation d'un nouvel aliment ou nouvel ingrédient alimentaire doit être établi selon la recommandation de la Commission du 29 juillet 1997¹.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT ET DU CES

Cette expertise porte sur une préparation enzymatique contenant une activité principale protéasique (NI) et non pas sur les compléments alimentaires contenant ce NI. La formulation de ces compléments alimentaires (composition dont potentiellement d'autres préparations enzymatiques ou des substances à but nutritionnel ou physiologique) pouvant générer des interactions ou des surdosages ne peut être analysée en l'absence de données. Une autre réglementation² s'appliquera à la commercialisation des compléments alimentaires contenant le NI.

I. Spécification du NI

Le NI est une préparation enzymatique avec une activité enzymatique principale protéasique, protéine glycosylée de 526 acides aminés et de 66 kDa. Une activité enzymatique secondaire, alpha-amylase, est présente.

Le NI clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxyl des résidus proline et libère des peptides et de la proline. Il présente une activité maximale à pH 4,6 et 50 °C. L'enzyme est inactivée après 5 min à 99 °C.

Selon les spécifications indiquées par le pétitionnaire, le NI se présente sous forme de microgranulés de couleur quasi-blanche à crème avec une matière sèche supérieure à 90 %, une

¹Recommandation de la Commission du 29 juillet 1997 (97/618/CE) concernant les aspects scientifiques relatifs à la présentation des informations requises pour étayer des demandes d'autorisation de mise sur le marché de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires et l'établissement de rapports d'évaluation initiale au titre du règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil.

²Décret n° 2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires

activité protéasique supérieure à 45 PPU³/g de TOS⁴ et une concentration de benzoate de sodium inférieure à 0,1 %. Les teneurs maximales spécifiées pour les métaux lourds et les contaminants biologiques sont : plomb ≤ 5 mg/kg, arsenic ≤ 3 mg/kg, cadmium $\leq 0,5$ mg/kg, mercure $\leq 0,5$ mg/kg, absence d'activité antimicrobienne, comptage sur plaque $< 5.10^4$ /g, anaérobies sulfite-réductrices < 30 cfu/g, coliformes < 30 cfu/g, salmonelles : absence dans 25 g, *Escherichia coli* : absence dans 25 g, *Staphylococcus aureus* : absence dans 1 g, moisissures < 10 cfu/g, levures < 10 cfu/g et absence des mycotoxines usuellement analysées.

Une unité d'activité du NI (PPU) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de p-nitroanilide par minute à partir d'un substrat synthétique (carbobenzoxy-glycine-proline-p-nitroanilide) à pH 4,6 et 37 °C.

II. Effet du procédé de production appliqué au NI

Selon le pétitionnaire, le NI est produit à partir de la souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée GEP 44 porteuse du gène *gpaA* d'*Aspergillus niger* G306. Le pétitionnaire présente la généalogie de la souche de production, les constructions génétiques, la transformation, le nombre de copies du transgène intégrées dans le génome.

Le NI est produit selon les bonnes pratiques de production pour l'alimentation humaine. Le pétitionnaire déclare que l'organisme hôte est non pathogène, ne produit aucune toxine connue et possède un historique d'utilisation industrielle sûre. La souche parentale et par conséquent, la souche de production ont une durée de vie limitée en dehors des conditions optimales du fermenteur. La souche de production ne contient pas de gène de résistance à un antibiotique.

Le NI est produit par fermentation submergée contrôlée de la souche d'*Aspergillus niger* GEP 44. Le procédé de production comprend la fermentation, la purification et la formulation du produit. Tous les ingrédients et auxiliaires technologiques utilisés sont de qualité alimentaire. Aucun conservateur n'est ajouté. Les résultats d'analyse du milieu de fermentation et de l'ultra-filtrat enzymatique présentés ne révèlent aucune des toxines recherchées.

Le NI serait commercialisé sous forme granulée contenant au maximum 30 % de maltodextrine de maïs. Le NI ne contiendrait pas de gluten. Concernant sa stabilité, l'analyse de la forme commerciale de l'enzyme indique une perte de moins de 5 % pour une conservation de 12 mois à une température inférieure à 15 °C.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Biotechnologie » soulignait que les modifications génétiques, la généalogie des souches jusqu'à la souche de production GEP44 sont décrites précisément par le pétitionnaire. Toutefois, il aurait été pertinent de vérifier l'intégrité des séquences intégrées par le séquençage moléculaire de la région modifiée.

Le CES « Biotechnologie » n'avait pas de remarque sur le procédé de production du NI.

En 2013, le pétitionnaire répond que son utilisation d'un système d'intégration multiple dans *Aspergillus niger* de façon standardisée n'ayant pas révélé de délétions de copies de transgènes sur différentes souches produites, le conduit à ne pas réaliser de séquençage de routine pour les nouvelles souches.

Dans l'avis du 24 octobre 2013, le GT « Biotechnologie » soulignait qu'aucun élément nouveau ne permet de vérifier l'intégrité des séquences intégrées dans la souche hôte.

³Prolyl peptidase unit : une « PPU » est définie comme la quantité d'enzyme libérant le p-nitroanilide à une vitesse de 1 μ mol par minute à partir du substrat synthétique z-gly-Pro-pNA (carbobenzoxy-glycine-p-nitroanilide) à pH 4,6 et à 37°C

⁴Total organic solids, composés organiques solides

Aucun élément nouveau n'étant apporté dans les réponses reçues en 2014, le GT « Biotechnologie » maintient sa conclusion émise dans l'avis du 24 octobre 2013.

III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI

Selon le pétitionnaire, *Aspergillus niger* est utilisé depuis de nombreuses années pour la production d'acides organiques et d'enzymes destinées à l'alimentation humaine. La contamination des denrées par *Aspergillus niger* et l'historique d'utilisation industrielle ont confirmé la non-pathogénicité du microorganisme proposé dans les conditions d'utilisation (Schuster *et al.*, 2002). Les études de toxicologie et les analyses réalisées pour les autorisations d'emploi des enzymes alimentaires antérieures n'ont pas mis en évidence la présence de toxines connues.

Le pétitionnaire indique que la souche parentale et la souche intermédiaire d'*Aspergillus niger* ont été utilisées pour plusieurs productions. La souche de production GEP44 a été classée le 23 octobre 2003 par la CGG⁵ dans le groupe I, classe 1, confinement L1 pour la production de l'endoprotéase proline spécifique.

La souche de production est éliminée lors des étapes de purification du NI. Des analyses du Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) (2003) n'ont pas détecté de mycotoxines dans les conditions de la fermentation réalisée pour la production du NI dans le milieu de fermentation et dans l'ultra-filtrat enzymatique. Dans des conditions de culture permettant une expression maximale de métabolites secondaires, la souche de production GEP44 synthétise plusieurs métabolites inconnus et aucune mycotoxine connue usuellement analysée.

*Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Biotechnologie » rappelait que la production de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires (nigragilline, nigerazine B, malformines, naphtho-gamma-pyrones, acide oxalique) par une souche d'Aspergillus niger est souche dépendante et conditions de fermentation dépendantes (Van Dijk *et al.*, 2003 ; Blumenthal, 2004 ; Olempska-Beer *et al.*, 2006 ; Frisvad *et al.*, 2011). Il attirait l'attention sur une évolution des conditions de production de l'enzyme et sur la nécessité de mise en place d'analyses fréquentes des mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.*

En 2013, le pétitionnaire apporte des éléments de revue sur la production de mycotoxines par *Aspergillus niger*. Les analyses réalisées (30 au total) sont très complètes mais les bulletins ne permettent pas de savoir si elles sont conduites sur un ou plusieurs lots de production et sont sans indication sur la période de temps couverte.

Dans l'avis du 24 octobre 2013, le GT « Biotechnologie » maintenait ses remarques et préconisait la mise en place d'une surveillance régulière des mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.

Dans les réponses reçues en 2014, le pétitionnaire présente son plan HACCP et son protocole de certification FSSC 22000. Une analyse des risques a été conduite en incluant les matières premières, le procédé de fabrication et l'organisme de production à savoir ici *Aspergillus niger*.

Le GT « Biotechnologie » note que le pétitionnaire prévoit de mettre en place des moyens de maîtrise des risques pour les mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.

IV. Effet de la modification génétique sur les propriétés de l'organisme hôte

La souche parentale et la souche de production GEP 44 ont été identifiées par le Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) comme *Aspergillus niger*. Le pétitionnaire indique que l'insertion de plusieurs copies du gène *gpa* d'*Aspergillus niger* ne modifie pas les caractéristiques de la souche de production.

⁵Commission de Génie Génétique

La souche de production ne contient pas de gène de résistance à un antibiotique.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du GT « Biotechnologie ».

V. Stabilité génétique de l'OGM utilisé comme source de NI

La stabilité de la souche de production GEP44 est vérifiée par le pétitionnaire et est assurée par le recours fréquent à des cultures issues de stock.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du GT « Biotechnologie ».

VI. Spécificité de l'expression du nouveau matériel génétique

La séquence du gène *gcpA* code le NI. Des analyses SDS-PAGE et des mesures d'activité enzymatique ont permis de vérifier l'identité du NI avec l'enzyme revendiquée.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du GT « Biotechnologie ».

VII. Transfert de matériel génétique à partir de l'OGM

Plusieurs copies du gène *gcpA* sont intégrées de façon stable dans le génome de la souche de production GEP44 et ne sont pas sous forme mobilisable. Le pétitionnaire souligne que la souche parentale et la souche de production (le NI produit ne lui conférant pas d'avantage pour sa survie) ont une durée de vie limitée en dehors des conditions optimales du fermenteur.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Biotechnologie » note que la description de la purification du NI ne permet pas d'identifier l'étape permettant l'élimination de l'ADN de la souche de production du NI. L'absence de cet ADN dans le NI devrait être documentée.

Le pétitionnaire rappelle que la souche de production est issue d'un autoclonage (gène d'une souche d'*Aspergillus niger* intégré dans une autre souche d'*Aspergillus niger*).

Dans l'avis du 24 octobre 2013, le GT « Biotechnologie » concluait que l'absence d'ADN de la souche de production n'était pas documentée par les nouveaux arguments présentés.

Aucun élément nouveau n'étant apporté dans les réponses reçues en 2014, le GT « Biotechnologie » maintient sa conclusion de l'avis du 24 octobre 2013.

VIII. Aptitude du micro-organisme génétiquement modifié à survivre dans l'intestin humain et à le coloniser

Les arguments du pétitionnaire sur ce sujet sont : *Aspergillus niger* est une espèce non pathogène. La souche de production GEP44, à l'instar de la souche parentale, a une durée de vie limitée en dehors des conditions optimales du fermenteur. La souche de production est éliminée du milieu après fermentation et les analyses réalisées sur le NI confirme l'absence de colonie de la souche de production. La souche de production ne contient pas de gène de résistance à un antibiotique. Le pétitionnaire conclut que la colonisation de l'intestin humain par la souche d'*Aspergillus niger* produisant le NI est considérée comme improbable.

Ces données ne soulèvent pas de remarque de la part du GT « Biotechnologie ».

IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévu du NI

Dans le dossier initial, le pétitionnaire indique que le produit est destiné à être utilisé comme ingrédient dans les compléments alimentaires comme aide à la digestion du gluten. Il indique que « ces compléments alimentaires seraient plus particulièrement destinés aux personnes intolérantes au gluten ».

Le pétitionnaire estime que 20 PPU⁶ du produit sont nécessaires pour digérer 1 g de gluten. Il indique que les personnes suivant un régime sans gluten (RSG) consomment environ entre 50 mg et 2 g de gluten de façon involontaire. Afin de digérer le gluten résiduel, le pétitionnaire estime ainsi qu'une dose de 40 PPU/j du produit est suffisante.

Dans la suite du dossier, il propose une utilisation de 40 PPU/repas, soit 120 PPU/j. Le pétitionnaire indique que cette dose est inférieure à la dose journalière acceptable (DJA) pour l'Homme, qu'il estime à 2,2 PPU/kg poids corporel/jour équivalent à 132 PPU/j chez l'adulte de 60 kg.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Nutrition humaine » notait que la population ciblée inclut des populations très variables, allant de personnes atteintes de la maladie cœliaque à des personnes évitant les aliments contenant du gluten sans aucune indication médicale. Le pétitionnaire ne traite pas du cas des enfants et ne propose pas d'âge minimal pour l'utilisation du produit. L'apport maximal de 132 PPU/j calculé par le pétitionnaire correspond à une personne adulte et ne peut être retenu pour les enfants.

Dans les éléments de réponse transmis en 2013, le pétitionnaire indique que l'enzyme est destinée à être utilisée « dans des compléments alimentaires destinés aux personnes non atteintes de la maladie cœliaque sensibles au gluten ». Pour clarifier ce positionnement, le pétitionnaire propose de recommander aux opérateurs utilisant son ingrédient d'apposer sur l'étiquetage une mention du type : « *Ce complément alimentaire est destiné aux consommateurs non cœliaques sensibles au gluten et n'est pas destiné à remplacer un régime d'éviction du gluten* ».

Le pétitionnaire affirme que les personnes atteintes de la maladie cœliaque et les personnes non atteintes de la maladie cœliaque intolérantes au gluten peuvent être clairement différenciées sur le plan clinique. Notamment les personnes atteintes de la maladie cœliaque sont porteuses des groupes HLA⁷-DQ2 ou HLA – DQ8, produisent des anticorps en réponse au gluten et présentent des lésions de l'intestin grêle. Par opposition, chez les individus « sensibles au gluten non atteints de la maladie cœliaque », des lésions du grêle et la production d'anticorps en réponse au gluten ne sont pas clairement identifiées (Biesiekierski *et al.*, 2011 ; Ludvigsson *et al.*, 2012 ; Verdu *et al.*, 2009 ; Verdu, 2011 ; Sapone *et al.*, 2012 ; Troncone et Jabri, 2011).

Le pétitionnaire indique que l'enzyme n'est pas destinée à être consommée par des enfants de moins de 3 ans et que les documents associés au produit mentionneront et recommanderont d'apposer cette restriction d'emploi. Sur la base de la DSEIO (dose sans effet indésirable observée)⁸ obtenue dans l'étude de toxicité, et en considérant un facteur de sécurité de 100 et un poids corporel de 15 kg, le pétitionnaire propose une dose maximale de consommation de 33 PPU/j chez l'enfant.

Dans l'avis du 24 octobre 2013, le CES « Nutrition humaine » notait que l'existence même d'une « sensibilité au gluten » hors maladie cœliaque est discutée. Une revue récente de la littérature conclut à la réalité de cette pathologie (Lundin et Alaedini, 2012). Dans les cas de suspicion d'une « sensibilité au gluten » (chez les sujets non atteints de la maladie cœliaque), le rôle propre du gluten n'est pas établi, car l'amélioration des symptômes lors du traitement diététique pourrait également provenir de la diminution de la consommation de glucides à courtes chaînes peu absorbés et fermentescibles (oligo-, di-, et monosaccharides fermentescibles et polyols) (Biesiekierski *et al.*, 2013).

Le CES estimait ainsi que la révision de la population cible par le pétitionnaire posait le problème de l'identité de cette nouvelle population, qui exclut les sujets atteints de la maladie cœliaque mais inclut des personnes

⁶ Prolyl peptidase unit : une « PPU » est définie comme la quantité d'enzyme libérant le p-nitroanilide à une vitesse de 1 µmol par minute à partir du substrat synthétique z-gly-Pro-pNA (carbobenzoxy-glycine-p-nitroanilide) à pH 4,6 et à 37°C

⁷ Antigènes des leucocytes humains

⁸ Ou NOAEL, no observed adverse effect level

présentant des maladies apparentées (Biesiekierski *et al.*, 2011 ; Sapone *et al.*, 2012 ; Troncone et Jabri, 2011 ; Carrocio *et al.*, 2012).

Le CES « Nutrition humaine » soulevait plusieurs remarques relatives à la mention d'étiquetage proposée par le pétitionnaire :

- Le CES émet des doutes sur l'efficacité d'une telle mention pour prévenir le risque de relâchement du régime sans gluten, prescrit en particulier pour la maladie cœliaque ;
- Néanmoins, dans le cas d'une éventuelle autorisation du produit par décision de la Commission, le CES estime que la mention devrait attirer l'attention du consommateur sur le fait que la consommation du produit ne doit pas affecter l'observance d'un régime sans gluten strict, prescrit en particulier pour la maladie cœliaque.

Le CES « Nutrition humaine » prenait acte de l'exclusion des enfants de moins de 3 ans de la population cible et estimait qu'un avertissement relatif à cette restriction d'usage devrait également constituer une condition à l'autorisation du produit.

Dans les éléments de réponse reçus en 2014, le pétitionnaire définit la population cible comme « consumers, who want to reduce gluten in their diet, to digest hidden gluten in their food », sans mention de sujets sensibles au gluten, ni du cas des sujets atteints de la maladie cœliaque. Concernant ces derniers, le pétitionnaire affirme qu'il n'y a pas de risque spécifique, mais qu'ils ne doivent pas utiliser ce produit pour s'exonérer de leur régime sans gluten, sans toutefois proposer une mention d'étiquetage pour mettre en garde sur ce point. Le pétitionnaire indique qu'une note accompagnant le produit informe le consommateur que le produit « n'est pas destiné à remplacer un régime sans gluten » et qu'il n'est pas destiné à traiter ou prévenir la maladie cœliaque ».

Le CES « Nutrition humaine » estime que la définition de la population cible reste vague.

Les mentions proposées par le pétitionnaire ne présentent aucune valeur indicative dans la mesure où, de fait, un complément alimentaire ne peut en aucun cas remplacer un régime spécifique et aucun produit alimentaire n'est autorisé à faire valoir des propriétés de traitement, ni même de prévention d'une maladie.

Le CES « Nutrition humaine » réitère qu'il est nécessaire que les sujets atteints de la maladie cœliaque soient informés que la consommation du produit ne doit pas affecter l'observance d'un régime sans gluten strict.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Nutrition humaine » relevait par ailleurs que l'utilisation du produit dans un complément alimentaire est discutable dans la mesure où le complément alimentaire ne viendrait pas compléter un régime normal (comme prévu dans la définition réglementaire du complément alimentaire) mais un régime sans gluten ou à faible teneur en gluten.

Dans les éléments de réponse transmis en 2013, le pétitionnaire réalise un parallèle avec d'autres enzymes comme les lactases, mises sur le marché depuis de nombreuses années dans des compléments alimentaires ciblant les personnes intolérantes au lactose.

Dans l'avis du 24 octobre 2013, le CES « Nutrition humaine » notait que le régime qui serait complété par le complément alimentaire, s'il est habituel pour la population cible, ne pouvait pas être considéré comme « normal », s'agissant d'un régime d'éviction des aliments contenant du gluten.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Nutrition humaine » notait que ni l'estimation de la dose de gluten résiduel dans l'alimentation consommée par des sujets intolérants au gluten (entre 0,5 et 2 g/j d'après le pétitionnaire), ni la dose d'enzyme nécessaire à la digestion d'une quantité déterminée de gluten (20 PPU d'enzyme pour 1 g de gluten) ne sont étayées par des publications scientifiques référencées. La quantité de gluten résiduel dans l'alimentation retenue pour l'évaluation (2 g) semble élevée pour des régimes d'éviction, dans lesquels

l'exposition au gluten devrait être inférieure à 50 mg/j, voire à 10 mg/j, sur la base des lésions histologiques qui peuvent être observées au niveau de la muqueuse intestinale (Collin et al., 2004 ; Catassi et al., 2007 ; Akobeng et Thomas, 2008 ; Troncone et al., 2008). Ainsi, le calcul de la dose journalière préconisée par le pétitionnaire semble davantage fondé sur le non-dépassement de la DJA que sur les propriétés du produit.

Dans les éléments de réponse transmis en 2013, le pétitionnaire souligne la grande difficulté à suivre un régime sans gluten strict. Il rapporte des données publiées estimant l'exposition au gluten chez des adultes et adolescents cœliaques suivant un régime d'éviction, allant de 17 mg à plus de 5 g de gluten par jour (Hopman et al., 2006 et 2008 ; Errichiello et al., 2010), alors que les préconisations visent un apport en dessous de 50 mg/j, voire 10 mg/j (Gibert et al., 2013). Concernant la dose d'enzyme nécessaire à la digestion du gluten, le pétitionnaire indique que la dose de 20 PPU/g de gluten a été établie sur la base de données expérimentales *in vitro* (qui font l'objet d'un projet de publication), montrant qu'une telle dose était plus efficace que des doses de 2 ou 4 ou 10 PPU/g.

Dans l'avis du 24 octobre 2013, concernant ce dernier point, le CES « Nutrition humaine » estimait que les données *in vitro* présentées sont insuffisantes pour déterminer la dose d'enzyme nécessaire à la digestion efficace d'une quantité précise de gluten dans des conditions d'utilisation de l'enzyme.

En ce qui concerne l'estimation de la dose de gluten résiduel dans l'alimentation, le CES « Nutrition humaine » notait que la difficulté d'obtenir un régime sans gluten strict chez des sujets atteints de la maladie cœliaque est effectivement rapportée dans la littérature, notamment chez les adolescents, entraînant souvent des apports supérieurs aux préconisations (Gibert et al., 2006 ; Errichiello et al., 2010 ; Greco et al., 1997).

Cependant, le CES relevait une ambiguïté dans l'argumentation puisque le pétitionnaire repositionne son produit pour des sujets non cœliaques. Dans la population ciblée à présent (c'est-à-dire les sujets non atteints de la maladie cœliaque « sensibles au gluten »), la gamme de consommation de gluten est susceptible d'être très étendue, dépassant les consommations observées au maximum chez des sujets suivant un régime sans gluten atteints de la maladie cœliaque. En effet, chez les sujets non atteints de la maladie cœliaque « sensibles au gluten », les bénéfices du régime sans gluten ne sont pas bien établis, l'accompagnement médical est bien moindre et il n'existe pas de prise en charge pour l'achat de produits sans gluten.

Dans le dossier initial, la dose de 40 PPU/j était proposée pour hydrolyser les 2 g de gluten résiduels dans l'alimentation, alors estimés comme un maximum d'apport. Plus loin dans le dossier, le pétitionnaire proposait ensuite une dose de 40 PPU/repas, soit 120 PPU/j, soulignant que cette dose ne dépassait pas la dose journalière admissible de 132 PPU/j.

Le CES « Nutrition humaine » notait ainsi :

- que les données disponibles ne permettent pas de déterminer les doses d'enzyme nécessaires à la digestion efficace de différentes quantités de gluten chez l'Homme dans les conditions d'utilisation de l'enzyme,
- que la quantité de gluten présente dans l'alimentation de la population ciblée n'est pas bien définie,
- que la dose quotidienne d'enzyme préconisée *in fine* par le pétitionnaire pour les consommateurs n'est pas clairement précisée,
- que dans tous les cas, cette dose ne devrait pas dépasser la dose journalière admissible calculée à partir de la DSEIO et d'un facteur d'incertitude de 100, soit 132 PPU/j pour un adulte de 60 kg et 33 PPU/j pour un enfant de 15 kg.

Dans les éléments de réponse transmis en 2014, le pétitionnaire affirme que la consommation de gluten par des intolérants varie entre 50 mg et 2 g par jour. Il raisonne sur une quantité moyenne de gluten de 500 mg par jour, pour les « sujets sensibles au gluten, qui suivent des régimes qui correspondent à une observance au régime sans gluten qui varie de strict à moins strict ». La dose de produit correspondant serait de 10 PPU/jour.

Le CES « Nutrition humaine » juge ces données confuses et discordantes avec les compléments d'information transmis sur la population cible.

En effet, la nouvelle dose de produit proposée est calculée sur la base d'une estimation d'exposition au gluten chez les « personnes sensibles au gluten ». Or d'une part cette population ne répond pas à une définition précise permettant de la caractériser (et donc de caractériser ses apports en gluten), et d'autre part cette population est discordante avec celle proposée dans les compléments d'information reçus (« les consommateurs souhaitant réduire le gluten de leur régime et digérer le gluten caché dans les aliments »).

Le CES « Nutrition humaine » juge donc que cette nouvelle estimation de dose n'est d'aucune utilité, et qu'elle souligne la confusion quant à la définition de la population cible.

X. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI

Dans le dossier initial, le pétitionnaire indique que la valeur nutritionnelle de l'enzyme ne diffère pas de celle des autres protéines ingérées. La consommation préconisée de 40 PPU/repas équivaldrait à environ 916 mg d'enzyme ingérés à chaque repas.

Les résultats de deux études expérimentales réalisées avec l'enzyme *in vitro* (Stepniak *et al.*, 2006; Mitea *et al.*, 2008)⁹ sont présentés. Une étude clinique à la dose de 160 PPU/j (ClinicalTrials.gov. 2011) non publiée, est mentionnée.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Nutrition humaine » estimait que les données disponibles étaient insuffisantes pour évaluer l'action et le devenir de l'enzyme dans les conditions d'emploi envisagées.

Le CES « Nutrition humaine » s'interrogeait sur l'action possible de l'enzyme sur les autres enzymes et hormones digestives.

Dans les éléments de réponse transmis en 2013, le pétitionnaire rappelle que l'objectif de son dossier est de démontrer la sécurité d'emploi du produit, et non pas son efficacité. Il envisage de déposer un dossier de demande d'allégation auprès de l'EFSA. Afin de fournir quelques éléments, il rapporte des données non publiées¹⁰ issus de deux essais cliniques (NCT00810654 et NCT01335503).

Le pétitionnaire note par ailleurs que des enzymes protéolytiques sont consommées sous forme de compléments alimentaires depuis de nombreuses années notamment aux Etats-Unis. Elles ont une activité protéolytique générale plus élevée que la présente enzyme, car elles ne sont pas spécifiques d'un type d'acide aminé. Aucun effet indésirable n'a été rapporté avec ces enzymes. Aucun effet indésirable n'a été observé avec la présente enzyme, ni dans l'étude de toxicité chez le rat, ni dans les essais cliniques réalisés.

Le pétitionnaire rappelle que la présente enzyme est active dans l'estomac, à pH bas¹¹, et qu'elle résiste à l'action de la pepsine. Le pétitionnaire estime peu probable qu'elle puisse agir de façon notable sur la pepsine, cette dernière étant présente en quantités bien plus élevées. En quittant l'estomac, l'enzyme sera inactivée en raison de l'élévation du pH et dégradée par la trypsine et d'autres enzymes intestinales.

Dans l'avis du 24 octobre 2013, le CES « Nutrition humaine » prenait acte des informations fournies pour répondre aux préoccupations relatives au devenir de l'enzyme et à son action sur d'autres enzymes digestives,

⁹Les données rapportées dans ces deux études ne permettent toutefois pas d'établir la correspondance exacte avec le produit du pétitionnaire.

¹⁰Le pétitionnaire indique que ces données n'ont pas fait l'objet de publication car seules les données non publiées peuvent être considérées comme confidentielles dans les dossiers de demande d'allégations.

¹¹ Pour rappel, l'activité de l'enzyme est maximale pour un pH compris entre 4 et 5.

qu'il juge recevables. Le CES relevait néanmoins que l'étude de toxicité chez le rat et au moins un des deux essais cliniques ont été réalisés dans des conditions expérimentales qui ne correspondent pas aux conditions d'utilisation préconisées (le gluten et l'enzyme étant administrés en dehors des repas).

Dans l'avis du 31 août 2012, les CES « Nutrition humaine » et « Biotechnologie » notaient que le principe de l'hydrolyse enzymatique du gluten afin de diminuer ses propriétés immunotoxiques constitue un domaine de recherche d'actualité qui engendre des pistes intéressantes pour les sujets atteints de maladie cœliaque. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, les CES estimaient que l'efficacité de l'enzyme n'était pas démontrée dans les conditions d'emploi envisagées. Il existe un consensus sur le fait que les propriétés des enzymes doivent être explorées sur des modèles ex vivo ou in vivo, avec les limites inhérentes à ces modèles expérimentaux, et que l'efficacité ne peut être assurée que sur la base de résultats d'études cliniques (Khosla et al., 2005 ; Matysiak-Budnik et al., 2005 ; Stepniak et Koning, 2006).

Le CES « Nutrition humaine » estimait ainsi qu'il existe un risque potentiel lié à la diminution de l'observance du régime sans gluten chez les patients atteints de maladie cœliaque. La consommation du produit pourrait en effet inciter à une augmentation de la consommation d'aliments contenant du gluten chez les patients, et, en l'absence de démonstration de l'efficacité du produit, à une augmentation de l'exposition aux peptides immunotoxiques.

Le CES « Nutrition humaine » soulignait qu'un suivi strict d'un régime sans gluten constitue à ce jour le seul traitement de la maladie cœliaque. Au-delà des manifestations cliniques de type douleurs abdominales, diarrhée ou inconfort intestinal – qui ne sont pas nécessairement observées dans les formes atypiques de la maladie cœliaque – la non-observance du régime est à l'origine de déficiences nutritionnelles, notamment en fer, calcium et en certaines vitamines, résultant d'une malabsorption intestinale (Vilppula et al., 2011). Elle est également associée à une augmentation du risque de survenue de nombreuses complications (Malamut et Cellier, 2010 ; Cosnes et Nion-Larmurier, 2011)¹², notamment à une déminéralisation osseuse pouvant conduire à une ostéopénie ou à une ostéoporose (McFarlane et al., 1996 ; Valdimarsson et al., 1996 ; Bai et al., 1997 ; Mora et al., 2001), et pourrait être associée à une augmentation du risque de maladies auto-immunes (Ventura et al., 1999 ; Cosnes et al., 2008), de troubles de la fertilité (Bast et al., 2009 ; Freeman, 2010)¹³, et de complications malignes, en particulier de lymphome (Holmes et al., 1989 ; Askling et al., 2002).

Par ailleurs, le CES « Nutrition humaine » notait que le produit est susceptible d'être consommé par des personnes qui ne présentent pas de troubles associés à la consommation de gluten mais qui choisissent de suivre un régime pauvre en gluten, sans indication médicale, parce qu'elles perçoivent le gluten comme nocif. Pour ces personnes, le bénéfice attendu du produit serait donc nul, alors que le risque d'effet indésirable ne peut pas être entièrement écarté, en raison notamment des incertitudes sur l'action possible de l'enzyme sur les autres enzymes et hormones digestives.

Dans les éléments transmis en 2013, le pétitionnaire rappelle que l'enzyme est destinée aux « personnes non cœliaques sensibles au gluten », et qu'elle n'est pas destinée à augmenter la quantité de gluten consommé. Elle est destinée à détruire le gluten consommé de façon involontaire dans le cadre d'un régime d'éviction. Le pétitionnaire estime que les sujets « non cœliaques sensibles au gluten » souffrent de troubles gastro-intestinaux causés par le gluten, et qu'ils bénéficieront ainsi de la consommation de l'enzyme.

Dans l'avis du 24 octobre 2013, le CES « Nutrition humaine » renvoyait aux remarques formulées précédemment concernant le repositionnement de la population cible.

Bien que l'objet de la présente évaluation ne portait pas sur l'efficacité de l'enzyme, dans le cas très particulier du présent dossier, le CES « Nutrition humaine » soulignait que la sécurité d'emploi du produit est liée à son

¹² pour revue

¹³ pour revue

efficacité, qui n'est pas démontrée dans le dossier du pétitionnaire. En effet, l'utilisation du produit pourrait inciter à un relâchement de l'observance du régime sans gluten et entraîner une augmentation de la consommation de gluten ; en cas d'inefficacité ou d'efficacité insuffisante de l'enzyme, il existerait alors un risque d'augmentation de l'exposition aux peptides immunotoxiques.

Le GT « Biotechnologie » demandait que le pétitionnaire spécifie l'identité de l'enzyme. Son activité revendiquée sur le gluten et les 2 études expérimentales *in vitro* (Stepniak et al., 2006 ; Mitea et al., 2008) citées dans le dossier laissent supposer que l'enzyme est une carboxypeptidase lysosomale Pro-X (E.C. 3.4.16.2) de la famille des peptidases S28 et non pas une prolyl oligopeptidase (E.C. 3.4.21.26) comme indiquée par le pétitionnaire. Cette enzyme semble être proche de celle décrite par Edens et al. (2005) qui la nomme prolyl endoprotéase, enzyme susceptible d'accepter des substrats avec une chaîne de plus de 30 acides aminés.

Le GT « Biotechnologie » estimait que l'efficacité de l'enzyme n'est pas démontrée dans les conditions d'emploi envisagées.

Dans ses éléments de réponse transmis en 2014, le pétitionnaire présente l'historique de la classification enzymatique du NI. Le pétitionnaire informe que les questions de l'efficacité de l'enzyme dans les conditions d'emploi envisagées et de la dose efficace seront traitées dans un futur dossier de demande d'allégation de santé.

Le CES « Nutrition humaine » juge légitime que le pétitionnaire renvoie l'évaluation de l'efficacité du produit à une demande ultérieure d'allégation de santé. Il souligne toutefois que dans le cas de ce dossier, la démonstration de l'innocuité du produit est étroitement liée à la démonstration de son efficacité.

Le GT « Biotechnologie » note que l'efficacité de l'enzyme sera présentée dans un dossier de demande d'allégation. Concernant l'activité enzymatique correspondant au NI, le GT « Biotechnologie » propose que la dénomination utilisée pour l'autorisation d'emploi en tant qu'auxiliaire technologique en brasserie et pour la production d'hydrolysats de protéines en France, présente dans l'annexe IC de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié soit utilisée « Protéase d'*Aspergillus niger* recombinée génétiquement GEP 44 ».

XI. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

Le pétitionnaire indique que le NI respecte les limites de contamination microbiologique appliquées aux enzymes¹⁴ utilisées comme auxiliaires technologiques¹⁵ ou additifs¹⁶.

*Dans l'avis du 31 août 2012, en raison de la production du NI par une souche d'*Aspergillus niger* et du niveau de consommation de NI recommandé par le pétitionnaire, le CES « Biotechnologie » préconisait la mise en place de surveillance régulière des mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.*

Les réponses du pétitionnaire reçues en 2013 et 2014 et du GT « Biotechnologie » formulées dans l'avis du 24 octobre 2013 et dans ce nouvel avis, sur ce point, figurent en chapitre III.

¹⁴General enzyme specifications of the food chemical codex (FCC, 7th ed, 2010-2011)

¹⁵Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

¹⁶Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) (FAO JECFA Monographs 3, compendium of food additive specifications, 2006).

XII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

Le pétitionnaire indique que des protéases sont utilisées comme auxiliaires technologiques ou dans des compléments alimentaires dans différents pays. Des protéases d'origine bactérienne ou fongique (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus melleus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoproteolyticus* et *Rhizopus niveus*) auraient été référencées dans « l'Enzyme Technical Association's list » pour les enzymes commercialisées dans les compléments alimentaires avant 1994. Des enzymes produites par des souches d'*Aspergillus niger* (Schuster *et al.*, 2002) dont la protéase produite par la souche GEP44 font partie de la liste positive de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié pour un emploi d'auxiliaires technologiques.

Les études de sécurité ont été réalisées avec une enzyme purifiée et non formulée.

Etude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat

Cette étude a été conduite conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (B.P.L.) et la recommandation OCDE 408 sur 10 animaux de chaque sexe par groupe. Une étude de toxicité aiguë pendant 14 jours chez le rat a permis de choisir les doses testées pour l'étude de toxicité subchronique. Le traitement des rats a été fait par gavage à raison de 2000, 7000 et 20000 mg/kg p.c./j, équivalent à 518, 1813 et 5180 mg de matière sèche/kg de poids corporel/j. En dehors des signes cliniques, de l'évolution pondérale et de la consommation alimentaire, des examens ophtalmologiques, hématologiques et biochimiques sanguins, et neuro-comportementaux ont été pratiqués ainsi que les examens macroscopiques et microscopiques des organes prélevés en fin d'étude (n=45). Les aspects identité et stabilité de la préparation enzymatique utilisée, contenu protéique de la suspension de gavage ont été documentés. En dehors d'une augmentation significative du poids corporel chez les femelles à la dose la plus forte par rapport au groupe témoin, et d'une réduction significative de la consommation alimentaire chez les mâles, sans retentissement sur le poids corporel, aucun autre effet délétère n'a été rapporté. Ces effets pouvant être attribués au fort apport énergétique de cette dose forte d'enzyme et non à des effets toxiques, la NOAEL est fixée à 20000 mg/kg p.c./j.

Etudes de génotoxicité

Etude de *mutagenicité* sur 4 souches de *Salmonella typhimurium* histidine dépendantes (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) et une souche d'*Escherichia coli* WP2 uvrA tryptophane dépendante selon les B.P.L. et la recommandation OCDE 471.

La préparation testée est identifiée. La présence d'histidine ou de protéines dans la préparation ayant conduit à observer une augmentation de mutations reverses en même temps qu'une augmentation légère du tapis bactérien, un second essai a été mis en œuvre selon la technique du « treat and plate » adaptée à cette situation et permettant d'exclure les faux positifs. Les concentrations testées, avec ou sans activation métabolique, allaient de 62 à 5000 µg de matière sèche par plaque. Une absence de mutation reverse est observée avec la préparation jusqu'à 5000 µg/plaque en présence ou absence d'activation métabolique versus témoins négatif et positif.

Test d'*aberration chromosomique* sur cellules de mammifères (lymphocytes périphériques humains) selon les B.P.L. et la recommandation OCDE 473.

La concentration maximale retenue lors d'un essai préliminaire est de 5000 µg/mL. La préparation est testée par méthode directe après 4, 24 ou 48 heures de contact avec ou sans activation métabolique avec 4 heures de contact. Aucun effet clastogène n'est observé avec la préparation testée.

Marge de sécurité

La NOAEL correspond à la dose la plus forte testée dans l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat soit 20 g/kg p.c./jour ou 220 PPU/ kg p.c./jour ou 5040 mg TOS/ kg p.c./jour. En utilisant le facteur de sécurité de 100, la dose journalière acceptable serait de 2,2 PPU/kg p.c./jour équivalent à la dose journalière de 132 PPU pour un adulte de 60 kg.

Allergénicité

Au plan de l'allergénicité, le pétitionnaire a fourni les résultats de recherche sur les banques de données Allermatch (www.Allermatch.org) basées principalement sur les données de WHO-IUIS et SwissProt, prenant en compte la comparaison des séquences des acides aminés de l'enzyme avec celles d'allergènes connus. La démarche répond aux directives de la FAO/OMS (FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 2001) en utilisant deux critères d'appariement :

- Plus de 35 % d'identité dans la séquence d'acides aminés de la protéine exprimée en utilisant une fenêtre de 80 acides aminés,
- Une identité de 6 ou plus acides aminés contigus.

Il est conclu à l'absence de potentiel allergénique de la préparation enzymatique.

Le GT « Biotechnologie » indique que les protéases sont naturellement présentes dans tous les organismes vivants (bactéries, champignons, plantes, animaux, humains) et sont impliquées dans de multiples réactions physiologiques. Les prolyl-oligopeptidases, un sous-groupe de protéases, sont présentes dans divers végétaux comme les épinards (Kuwabara, 1992), les carottes (Yoshimoto *et al.*, 1987), le riz (Tripathi et Sowdhamini, 2006), les papayes, dans les champignons (*Agaricus bisporus*)(Sattar *et al.*, 1990), mais aussi dans de nombreux tissus animaux comme les muscles (vache, porc, poulet, poissons) entrant dans l'alimentation de l'Homme. Ces enzymes sont également retrouvées dans l'estomac et l'intestin de l'Homme.

Le GT « Biotechnologie » note que les études de sécurité réalisées montrent la non-génotoxicité de la préparation enzymatique et l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat permet de fixer une NOAEL à la dose la plus forte testée, dose qui n'entraîne pas d'effet délétère.

Le GT « Biotechnologie » souligne que l'apport maximal de 132 PPU/personne ne s'applique qu'aux adultes et non pas aux enfants dans le cas où ils seraient concernés par l'emploi de ce NI.

Conclusion du GT « Biotechnologie »

Au vu des résultats fournis par le pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » n'identifie pas de risque au niveau toxicologique du nouvel ingrédient dans les conditions de production présentées. Il rappelle qu'en raison de l'identité de la souche de production, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires, le pétitionnaire indique mettre en place une surveillance de ces substances dans la production du NI. Le GT « Biotechnologie » propose que « protéase » soit utilisée pour nommer l'activité enzymatique du NI telle que dans son inscription à la liste positive des auxiliaires technologiques en France (arrêté du 19 octobre 2006 modifié).

Conclusion du CES « Nutrition humaine »

Le CES « Nutrition humaine » conclut à l'insuffisance des nouveaux éléments du dossier pour identifier la population cible et *a fortiori* justifier la dose d'emploi préconisée. La population cible est définie de façon imprécise et elle est trop hétérogène pour estimer des apports en gluten et donc une dose de produit efficace.

Pour ce qui concerne les mentions destinées à préciser les conditions d'emploi qui réduiraient le risque de mésusage du produit, le CES « Nutrition humaine » estime indispensable que des mesures appropriées soient prises afin d'éviter que les sujets atteints de maladie cœliaque qui consommeraient le NI ne relâchent le suivi d'un régime strict sans gluten, et ne risquent ainsi d'aggraver leur maladie.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) adopte les conclusions des CES « Biotechnologie » et « Nutrition humaine ».

L'Anses n'a pas mis en évidence d'éléments de toxicité propre qui s'opposeraient à la mise sur le marché de ce NI et sur la base des nouveaux éléments fournis dans cette troisième saisine, note que le pétitionnaire organise une surveillance régulière des mycotoxines et autres métabolites secondaires dans la production du NI.

Néanmoins, l'Anses souhaite attirer l'attention, en l'absence d'éléments de preuve sur l'efficacité du produit :

- sur les effets sanitaires indirects que pourrait occasionner l'usage des produits utilisant cette enzyme, s'il s'accompagne d'un relâchement de l'observance du régime sans gluten strict prescrit sur avis médical. L'Anses estime indispensable que des mesures appropriées soient prises afin d'éviter que les sujets atteints de maladie coéliquaie qui consommeraient le NI ne relâchent le suivi d'un régime strict sans gluten, et ne risquent ainsi d'aggraver leur maladie,
- sur la difficulté à définir avec précision la population cible, compte tenu de l'absence de consensus de la communauté médicale sur l'existence même de la « sensibilité au gluten » hors maladie coéliquaie, en l'état actuel des connaissances.

L'Anses recommande :

- que la dose quotidienne d'enzyme préconisée *in fine* dans tous les cas, ne dépasse pas la dose journalière admissible établie à partir de l'étude de toxicité ;
- qu'une information claire soit donnée au consommateur sur le fait que la consommation du produit ne doit pas affecter l'observance d'un régime sans gluten strict, prescrit en particulier pour la maladie coéliquaie, et que le produit n'est pas destiné aux enfants de moins de 3 ans ;
- que la dénomination de l'activité enzymatique du NI soit protéase comme utilisée pour l'autorisation d'emploi en tant qu'auxiliaire technologique en brasserie et pour la production d'hydrolysats de protéines en France, présente dans l'annexe IC de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié,
- que des enquêtes s'intéressant aux pratiques des consommateurs des compléments alimentaires contenant l'enzyme soient conduites afin d'alerter sur les possibles effets sanitaires indirects.

L'Agence souligne enfin que des évaluations concomitantes de la sécurité et de l'efficacité des nouveaux aliments et ingrédients permettraient d'optimiser les expertises des dossiers soumis. En effet, dans le cas présent, l'usage de ce NI dans un complément alimentaire pose la question d'une allégation de fait.

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Novel food, prolyl oligopeptidase, prolyl endopeptidase, protéase, *Aspergillus niger*, maladie cœliaque, gluten.

BIBLIOGRAPHIE

- Akobeng AK and Thomas AG (2008). Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 1044-52.
- Askling J, Linet M, Gridley G, Halstensen TS, Ekstrom K and Ekblom A (2002). Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology* 123: 1428-35.
- Bai JC, Gonzalez D, Mautalen C, Mazure R, Pedreira S, Vazquez H, Smecuol E, Siccardi A, Cataldi M, Niveloni S, Boerr LA and Maurino E (1997). Long-term effect of gluten restriction on bone mineral density of patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 11: 157-64.
- Bast A, O'Bryan T and Bast E (2009). Celiac disease: a comprehensive review and update, series # 5 - Celiac disease and reproductive health. *Pract Gastroenterol* 13: 10-21.
- Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM, Barrett JS, Haines M, Doecke JD, Shepherd SJ, Muir JG, Gibson PR (2011). Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol*. 106:508-14
- Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR (2013). No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology*. 145:320-8
- Blumenthal CZ (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol and Pharmacol* 39: 214-228.
- Carroccio A, Mansueto P, Iacono G, Soresi M, D'Alcamo A, Cavataio F, Brusca I, Florena AM, Ambrosiano G, Seidita A, Pirrone G, Rini GB (2012). Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: exploring a new clinical entity. *Am J Gastroenterol*. 107:1898-906
- Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F, Mandolesi A, Bearzi I, Fasano A (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 85:160-6
- ClinicalTrials.gov. (2011). Registered study NCT00810654 : Effect of *Aspergillus niger* prolyl endopeptidase (AN-PEP) enzyme on the effects of gluten ingestion in patients with coeliac disease. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00810654>
- Collin P, Thorell L, Kaukinen K, Mäki M (2004). The safe threshold for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease? *Aliment Pharmacol Ther*. 19:1277-83. Review
- Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, Hugot JP, Ginies JL, Dabadie A, Mouterde O, Allez M and Nion-Larmurier I (2008). Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6: 753-8.
- Cosnes J and Nion-Larmurier I (2011). [Complications of celiac disease]. *Pathol Biol (Paris)*. May 26. [Epub ahead of print]
- Edens L, Dekker P, Van der Hoeven R, Deen F, De Roos A and Floris R (2005). Extracellular prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *J Agric Food Chem*. 53: 7950-7957.
- Errichiello S, Esposito O, Di Mase R, Camarca ME, Natale C, Limongelli MG, Marano C, Coruzzo A, Lombardo M, Strisciuglio P, Greco L (2010). Celiac disease: predictors of compliance with a gluten-free diet in adolescents and young adults. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 50:54-60

- Freeman HJ (2010). Reproductive changes associated with celiac disease. *World J Gastroenterol* 16: 5810-4.
- Frisvad J.C., Larsen T.O, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson R.A and Nielsen K.F. (2011) Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One* 6(8):e23496.doi:10.1371/journal.pone.0023496.
- Gibert A, Espadaler M, Angel Canela M, Sánchez A, Vaqué C, Rafecas M (2006). Consumption of gluten-free products: should the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 p.p.m.? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 18:1187-95
- Gibert A, Kruizinga AG, Neuhold S, Houben GF, Canela MA, Fasano A, Catassi C (2013). Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population-based probabilistic approach to risk estimation. *Am J Clin Nutr.* 97:109-16. Erratum in: *Am J Clin Nutr.* 98:511
- Greco L, Mayer M, Ciccarelli G, Troncone R, Auricchio S (1997). Compliance to a gluten-free diet in adolescents, or "what do 300 coeliac adolescents eat every day?". *Ital J Gastroenterol hepatol.* 29:305-10
- Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D and Allan RN (1989). Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet. *Gut* 30: 333-8.
- Hopman EG, le Cessie S, von Blomberg BM, Mearin ML (2006). Nutritional management of the gluten-free diet in young people with celiac disease in The Netherlands. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 43:102-8
- Hopman EG, von Blomberg ME, Batstra MR, Morreau H, Dekker FW, Koning F, Lamers CB, Mearin ML (2008). Gluten tolerance in adult patients with celiac disease 20 years after diagnosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 20:423-9
- Khosla C, Gray GM and Sollid LM (2005). Putative efficacy and dosage of prolyl endopeptidase for digesting and detoxifying gliadin peptides. *Gastroenterology* 129: 1362-3; author reply 1363.
- Kuwabara T (1992). Characterization of a prolyl endopeptidase from spinach thylakoids. *FEBS Lett* 300: 127-130.
- Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C (2012). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 62:43-52
- Lundin KE, Alaedini A (2012). Non-celiac gluten sensitivity. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 22:723-34. Review.
- Malamut G and Cellier C (2010). Maladie cœliaque de l'adulte. *Rev Fr Allergol* 50: 254-9.
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensusan N and Heyman M (2005). Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 129: 786-96.
- McFarlane XA, Bhalla AK and Robertson DA (1996). Effect of a gluten free diet on osteopenia in adults with newly diagnosed coeliac disease. *Gut* 39: 180-4.
- Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L and Koning F (2008). Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut* 57: 25-32.
- Mora S, Barera G, Beccio S, Menni L, Proverbio MC, Bianchi C and Chiumello G (2001). A prospective, longitudinal study of the long-term effect of treatment on bone density in children with celiac disease. *J Pediatr* 139: 516-21.
- Olempska-Beer Z.S, Merker R.I, Ditto M.D and DiNovi M.J. (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms- a review. *Regul Toxicol and Pharmacol* 45: 144-158.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A (2012). Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* 10:13. Review
- Sattar AKMA, Yamamoto N, Yoshimoto T and Tsuru D (1990). Purification and characterization of an Extracellular prolyl endopeptidase from *Agaricus bisporus*. *J. Biochem.* 107:256-261
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J. C and van Dijck P. W. M (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:426-435.
- Stepniak D and Koning F (2006). Enzymatic gluten detoxification: the proof of the pudding is in the eating! *Trends Biotechnol* 24: 433-4.
- Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L and Koning F (2006). Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G621-9.
- Tripathi LP and Sowdhamini R (2006). Cross genome comparisons of serine proteases in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* 7: 200.

- Troncone R, Auricchio R, Granata V (2008). Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 11:329-33. Review
- Troncone R, Jabri B (2011). Coeliac disease and gluten sensitivity. *J Intern Med*. 269:582-90. Review
- Valdimarsson T, Lofman O, Toss G and Strom M (1996). Reversal of osteopenia with diet in adult coeliac disease. *Gut* 38: 322-7.
- Van Dijck PWM, Selten GCM and Hempenius RA (2003). On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains. *Regul Toxicol and Pharmacol* 38: 27-35.
- Ventura A, Magazzu G and Greco L (1999). Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 117: 297-303.
- Verdu EF, Armstrong D, Murray JA (2009). Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the "no man's land" of gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol*. 104:1587-94. Review
- Verdu EF (2011). Editorial: Can gluten contribute to irritable bowel syndrome? *Am J Gastroenterol*. 106:516-8
- Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R, Luostarinen M, Laurila K, Mäki M and Collin P (2011). Clinical benefit of gluten-free diet in screen-detected older celiac disease patients. *BMC Gastroenterol* 11: 136.
- Yoshimoto T, Abdus Sattar AKM, Hirose W and Tsuru D (1987). Studies on prolyl endopeptidase from carrot (*Daucus carota*): purification and enzymatic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular* 916: 29-37.