

Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire - souches nouvelles ou modifiées - application différente de souches déjà utilisées -

Les micro-organismes sont couramment utilisés dans le secteur agro-alimentaire, aussi bien dans le domaine de l'alimentation humaine qu'animale. L'utilisation de ces micro-organismes peut avoir différents objectifs : conservation et/ou développement de propriétés organoleptiques de l'aliment, production de métabolites d'intérêt industriel, apport de bactéries potentiellement bénéfique sur la santé ou ayant un intérêt zootechnique.

Trois catégories d'aliments ou d'ingrédients alimentaires peuvent ainsi être distinguées :

- 1- les aliments contenant des micro-organismes vivants, ajoutés intentionnellement. On distingue dans cette catégorie, les produits fermentés, dont l'effet recherché est d'ordre technologique (fromage, boisson fermentée, pain...), des produits supplémentés, dont l'effet recherché est d'ordre physiologique (probiotiques en alimentation humaine et animale) ;
- 2- les molécules issues de micro-organismes, mais dont l'absence de ces derniers dans le produit final est garantie (enzyme, acides aminés, polysaccharides et oligosaccharides, arômes naturels, vitamines,...) ;
- 3- les produits contenant des micro-organismes ajoutés, non vivants.

Les domaines d'utilisation de ces micro-organismes ne sont pas tous couverts sur le plan réglementaire (au niveau national ou européen). Par ailleurs, les textes en vigueur ne présentent pas toujours des recommandations permettant d'évaluer l'innocuité des micro-organismes. Cette situation a conduit à une hétérogénéité des études produites par les pétitionnaires d'une part, et des demandes des experts évaluant ces dossiers d'autre part.

Ce document constitue ainsi une démarche commune pour la caractérisation et l'évaluation de l'innocuité, pour le consommateur final (c'est à dire l'homme), des micro-organismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire (alimentation humaine et animale), sans pour autant se substituer aux domaines particuliers d'ores et déjà couverts par des textes réglementaires : organismes génétiquement modifiés couverts par la directive 90/219/CE, nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires couverts par le règlement 258/97/CE, alimentation animale, à l'exclusion des agents d'ensilage qui font actuellement l'objet d'une réflexion au niveau communautaire, couverte par la directive 87/153/CE.

La démarche proposée est un préalable à l'utilisation de souches pures ou mélange de souches pures (nouvelles ou modifiées) ou à l'application différente de souches déjà utilisées. Elle pourra assister d'une part les demandeurs d'autorisation d'emploi de micro-organismes, d'autre part ceux qui effectuent l'évaluation préalable (recevabilité administrative) du dossier et les experts évaluateurs eux-mêmes.

Les conclusions sont présentées sous la forme d'un arbre décisionnel permettant l'évaluation de l'innocuité des micro-organismes, accompagné d'un tableau explicatif (chapitre 1), et des données requises pour la présentation des dossiers (chapitre 2). Ces conclusions ont été rendues à la lumière des connaissances scientifiques et techniques actuelles des principes communs pour l'évaluation des micro-organismes d'intérêt industriel. Cependant, compte tenu de la diversité des situations, les exigences en matière de données et d'essais doivent être adaptées aux particularités des micro-organismes et aux modalités particulières de chaque utilisation.

PREAMBULE

- La mise sur le marché de produits sûrs est de la responsabilité des professionnels, comme cela est mentionné dans le code de la consommation (partie législative art. L221-1) " Les produits doivent, dans les conditions normales d'utilisation ou dans d'autres conditions raisonnablement prévisibles par le professionnel, présenter la sécurité à laquelle on peut légitimement s'attendre et ne pas porter atteinte à la santé des personnes ".

- L'identification d'un micro-organisme doit se fonder sur les connaissances scientifiques actuelles. En outre, il est nécessaire de s'assurer que, lors d'un usage alimentaire approprié, les micro-organismes considérés n'exercent aucun effet inacceptable sur l'homme, les espèces animales et l'environnement. Le comportement environnemental, pour important qu'il soit, ne relève de la compétence de l'Afssa que pour les répercussions qu'il pourrait avoir en terme de sécurité sanitaire pour le consommateur.

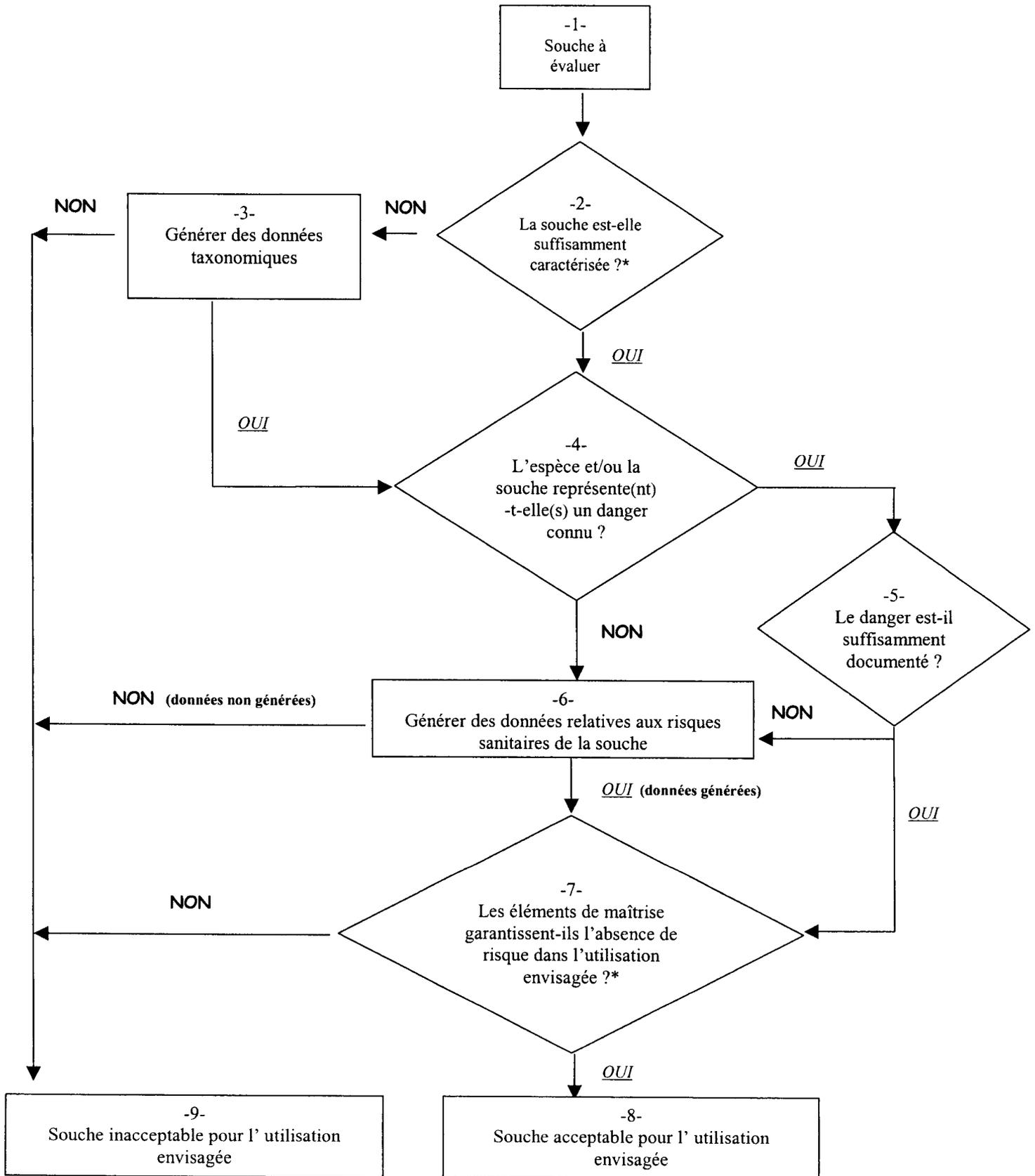
- Les risques sanitaires liés aux micro-organismes peuvent être différents pour l'homme et les animaux.

- L'évaluation de l'innocuité des produits issus de micro-organismes, réalisée selon des critères propres à chacune des catégories de ces produits, sort du cadre de ces lignes directrices (exemples : préparations enzymatiques, arômes, etc.).

- Si ces lignes directrices visent à identifier les points sensibles de l'évaluation de l'innocuité de micro-organismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire, il reste impossible d'assurer qu'un événement défavorable ne se produira jamais (germes opportunistes chez des personnes immunodéprimées, usages non conventionnels du micro-organisme, etc.).

1. SCHEMA D'EVALUATION DE L'INNOCUITE D'UNE SOUCHE MICROBIENNE UTILISEE DANS LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE

1.1. ARBRE DECISIONNEL POUR L'EVALUATION DE L'INNOCUITE D'UNE SOUCHE MICROBIENNE UTILISEE DANS LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE.



* Dans l'état actuel des connaissances

1.2. TABLEAU EXPLICATIF DE L'ARBRE DECISIONNEL

Le tableau ci-dessous explicite les différentes étapes de l'arbre décisionnel permettant l'évaluation de l'innocuité d'une souche microbienne utilisée dans le secteur agro-alimentaire.

La première colonne du tableau correspond au numéro des cases de l'arbre ; la deuxième colonne donne des explications sur la signification de chaque étape de l'évaluation ; la troisième colonne renvoie au paragraphe de la trame du dossier de présentation des données (chapitre 2).

| N° case | Commentaires | Références au chapitre 2. |
|---------|--|-------------------------------------|
| 1 | <p align="center">Souche à évaluer</p> <p>Les micro-organismes considérés peuvent être des bactéries, des champignons, des levures, des algues.</p> <p>(Une liste d'agents biologiques pathogènes est présentée par l'arrêté du 18 juillet 1994.)</p> | 2.2.1, 2.2.2., 2.2.3., 2.2.7 et 2.3 |
| 2 3 | <p align="center">La souche est-elle suffisamment caractérisée ?</p> <p>La caractérisation d'une souche vise à établir son identité et sa position taxonomique de façon aussi précise que possible. Cette caractérisation constitue un préalable indispensable pour l'utilisation envisagée d'une souche.</p> <p align="center">Générer des données taxonomiques</p> <p>Méthodes conventionnelles</p> <ul style="list-style-type: none"> - galeries d'identification biochimique, d'auxanogramme, enzymatique, caractère de résistance à divers composés ; - spécificité antigénique. <p>L'identification conventionnelle est souvent imprécise et insuffisante ; par conséquent une identification moléculaire s'impose. La caractérisation taxonomique des souches sera réalisée avec des méthodes moléculaires telles que :</p> <p>Méthodes moléculaires universelles</p> <ul style="list-style-type: none"> - séquençage du gène rrs codant l'ARNr 16S et d'autres gènes appropriés à la distinction interspécifique ; - hybridation ADN-ADN (technique lourde) : à utiliser quand la résolution du séquençage n'est pas suffisante ; - ribotypage avec un nombre d'enzyme suffisant pour caractériser une souche industrielle. <p>Méthodes moléculaires à applications spécifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - amplification génique (PCR) avec ou sans restriction - sondes pour hybridation <i>in situ</i>, dot-blot... | 2.2.4. et 2.2.5. 2.6.6. |
| 4 | <p align="center">L'espèce et/ou la souche représente(nt) -t-elle(s) un danger connu ?</p> <p>Il est impossible d'estimer le risque sanitaire sans considérer la cible.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Concernant l'espèce <p>La première approche permettant de déterminer un risque potentiel lié à un micro-organisme est un recensement bibliographique et une prise en considération des résultats de tests de toxicité connus. Un état des lieux, fondé sur l'historique de l'espèce, peut être dressé sur les points suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - l'espèce microbienne est-elle associée à une pathologie ou est-elle susceptible d'être opportuniste ? - l'espèce microbienne produit-elle des toxines ? - l'espèce microbienne persiste-t-elle ou survit-elle chez l'hôte ? - des souches de cette espèce sont-elles reconnues comme pouvant porter des caractères de résistance aux antibiotiques et/ou aux biocides, de virulence et/ou un pouvoir toxinogène ; ces caractères sont-ils transférables ou mobilisables ? - la précision de l'identification est-elle suffisante pour la discrimination avec une espèce pathogène taxonomiquement proche ? - l'espèce est-elle reconnue pour produire des substances allergisantes ? <ul style="list-style-type: none"> ▪ Concernant la souche <p>Si l'historique de la souche avant son dépôt en collection <u>peut</u> être transmis pour information, l'historique d'utilisation de celle-ci à compter de cette date de dépôt <u>doit</u> être renseigné. L'absence de gène de résistance transmissible aux antibiotiques dans l'aliment ou le produit issu de la souche utilisée devra être vérifiée.</p> | 2.2.3 et 2.2.7. 2.6.1. à 2.6.7. |

| | | |
|---|---|---------------|
| 5 | <p align="center">Le danger est-il suffisamment documenté ?</p> <p>En cas de danger potentiel insuffisamment documenté, l'étape 6 est obligatoire.</p> | |
| 6 | <p align="center">Générer des données relatives au risque sanitaire de la souche</p> <p>La virulence (dont le pouvoir toxinogène) sont parmi les principales caractéristiques, uniques ou combinées, propres aux souches microbiennes potentiellement pathogènes. L'étude sur l'allergénicité pourrait être envisagée dans certains cas¹</p> <p>Principaux tests à mettre en œuvre Ces tests peuvent être adaptés aux germes à étudier et aux données trouvées dans la littérature scientifique la plus récente. Ils pourront s'inspirer de lignes directrices reconnues au niveau national et international.</p> <p>Exemples de tests <i>in vitro</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - recherche de toxines par des techniques cellulaires et/ou immunologiques - détermination de phénomène d'adhésion et de multiplication cellulaire sur culture cellulaire - recherche de gènes connus de pathogénicité par sonde (Southern, dot-blot) ou PCR <p>Indications pour l'élaboration de tests <i>in vivo</i></p> <p>Les éléments présentés ci-dessous sont des guides pour l'élaboration de tests appropriés de virulence et de toxinogénicité <i>in vivo</i>. Le choix des paramètres expérimentaux retenus devra être argumenté dans le dossier.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les tests sont réalisés sur des animaux de laboratoire. - Les voies d'administration sont choisies pour explorer le comportement de la souche dans le tractus gastro-intestinal et dans les tissus de l'hôte. - Les animaux à jeun (12h avant et 4h après l'administration) reçoivent par voie orale (ou intra-gastrique) et parentérale (si suspicion de bactériémie possible), une unique prise à forte dose de la souche vivante (par exemple 10 fois la dose préconisée pour un produit destiné à l'alimentation). - Un groupe témoin, de composition identique, placé dans les mêmes conditions mais dans un hébergement microbiologiquement indépendant, reçoit un volume comparable ne contenant pas la souche à tester. - Les animaux sont observés sur une période de 21j. Les deux groupes sont comparés pour les critères suivants : comportement, poids corporel, morbidité, mortalité, colonisation intestinale, infection, persistance, excrétion. En fin d'observation, et en cas de mortalité et de morbidité, le moment de la survenue des symptômes et lésions potentiels est noté, des organes (rate par exemple) sont prélevés pour le dénombrement des micro-organismes ingérés. En cas de survie des animaux, sans morbidité, les lésions sont recherchées ainsi que la présence de germes dans des organes par enrichissement. <p>Si les tests de toxicité <i>in vitro</i> et/ou <i>in vivo</i> révèlent des effets défavorables, la démarche peut être poursuivie dans le but de démontrer que les risques sont maîtrisés dans l'utilisation envisagée (cf. case 6 de l'arbre).</p> | 2.6.1. |
| 7 | <p align="center">Les éléments de maîtrise garantissent-ils l'absence de risque dans l'utilisation envisagée ?</p> <p>Cas d'une souche² destinée à être consommée vivante dans la denrée alimentaire.</p> <p>L'évaluation de l'innocuité de la souche nécessite la réalisation de tests de tolérance. Les propositions présentées ci-dessous sont des guides pour l'élaboration de ces tests de tolérance. Le choix des paramètres expérimentaux retenus devra être argumenté dans le dossier.</p> | 2.6.1 à 2.6.5 |

¹ se référer à la consultation FAO/OMS de juin 2000 concernant les aliments dérivés des biotechnologies et à la réglementation "novel food"

² souche nouvelle ou modifiée, ou souche déjà autorisée pour une application différente.

| | | |
|---|---|--|
| | <p>- Les tests sont réalisés sur des animaux de laboratoire.</p> <p>- Les animaux reçoivent quotidiennement par voie orale (ou intra-gastrique) et/ou parentérale (si suspicion de septicémie possible), la denrée alimentaire contenant la souche vivante.</p> <p>- Un groupe témoin, de composition identique, placé dans les mêmes conditions mais dans un hébergement microbiologiquement indépendant, reçoit un volume comparable ne contenant pas la souche à tester.</p> <p>- Les animaux sont observés sur une période de 90j (la durée de l'administration pourra être réduite en cas de refus des animaux ou d'empêchement technique, lié au gavage intra-gastrique, par exemple). Les deux groupes sont comparés pour les critères suivants : comportement, poids corporel, morbidité, mortalité, colonisation intestinale, infection, persistance, excrétion. En fin d'observation, et en cas de mortalité et de morbidité, le moment de la survenue des symptômes et lésions potentiels est noté, les organes sont prélevés pour la numération des germes. En cas de survie sans morbidité, les lésions sont recherchées ainsi que la présence de germes par enrichissement.</p> <p>Cas d'une souche non destinée à être consommée vivante. Dans ce cas, la maîtrise du risque peut dépendre des conditions spécifiques de l'utilisation envisagée du micro-organisme.</p> | |
| 8 | <p style="text-align: center;">Souche acceptable pour utilisation envisagée</p> <p>La souche peut faire l'objet d'une mise en œuvre industrielle selon les bonnes pratiques de fabrication.</p> | |
| 9 | <p style="text-align: center;">Souche inacceptable pour utilisation envisagée</p> | |

2. DONNEES REQUISES POUR LA CONSTITUTION DES DOSSIERS

Chaque rubrique doit être renseignée dans le dossier. Quand une rubrique ne concerne pas l'application envisagée, cela doit être noté et justifié.

2.1. DEMANDEUR

2.1.1. Demandeur (nom, adresse, etc.)

2.1.2. Fabricant (nom, adresse, emplacement de l'installation)

2.2. SOURCE ET IDENTITÉ DE LA SOUCHE MICROBIENNE D'INTERET

2.2.1. Désignation de la souche par le demandeur

2.2.2. Numéro de référence de la souche dans une collection de laboratoire relevant du traité de Budapest (WFCC, ECO,...)

2.2.3. Historique de la souche (source, utilisations antérieures, méthodes d'isolement,...) ; dans le cas d'une souche mutante, indiquer toutes les différences connues entre le mutant et la souche initiale

2.2.4. Identification taxonomique précise de la souche. L'identification sera suffisamment précise pour discriminer la souche d'intérêt et une souche pathogène d'une espèce taxonomiquement proche

2.2.5. Méthodes d'identification

2.2.6. Méthodes proposées pour établir la présence de la souche

2.2.7. Historique de l'espèce (utilisations antérieures,...)

2.3. UTILISATIONS ENVISAGEES DE LA SOUCHE D'INTERET

2.3.1. Utilisations envisagées de la souche et des produits la contenant. Catégories d'utilisateurs.

2.3.2. Observations particulières

2.4. OBTENTION ET PRODUCTION DE LA SOUCHE D'INTERET

2.4.1. Mode de conservation du stock de conservation et moyens permettant d'éviter que ce stock de conservation soit altéré, contaminé ou perde ses caractéristiques (cf lignes directrices de World federation for culture collection, 1990)

2.4.2. Méthodes de pré-culture

2.4.3. Méthodes de production selon les bonnes pratiques de fabrication, avec des détails sur le niveau de confinement éventuel et les procédures utilisées pour maintenir la qualité et garantir une source uniforme de l'organisme actif

2.4.4. Formulation qualitative et quantitative de la préparation finale : constituants (ingrédients, additifs, supports, etc)

2.4.5. Méthodes utilisées pour démontrer qu'en cas de mélange complexe ou de culture en ambiance ouverte, la préparation est exempte d'agents pathogènes contaminant l'homme et les animaux

2.4.6. Procédures de gestion des déchets liés à la production (pour mémoire)

2.5. METHODE DE CONTROLE DE LA PURETE DE LA PREPARATION

2.5.1. Méthodes utilisées pour détecter et reconnaître la souche d'intérêt

2.5.2. Méthodes utilisées pour établir la pureté du stock de conservation et des lots produits ; résultats obtenus et informations sur la variabilité observée

2.5.3. Méthodes utilisées pour démontrer qu'en cas de mélange complexe ou de culture en ambiance ouverte, la préparation est exempte d'agents pathogènes contaminant l'homme et les animaux

2.6. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DU MICRO-ORGANISME : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ET/OU EXPERIMENTALES (ESPECE D'UNE PART ET SOUCHE D'AUTRE PART)

2.6.1. Effets sur l'homme et les animaux : transmissibilité, colonisation, persistance et éventuellement dose infectieuse et mode d'action, y compris des informations sur la présence, l'absence ou la production de toxines, avec, le cas échéant, des informations sur leur nature, identité, stabilité et puissance ; effets possibles sur les animaux de rente et de compagnie (et, pour mémoire, sur la faune sauvage) y compris l'infectiosité, la pathogénicité, la transmissibilité, la persistance (pour mémoire : effet phytopathogène)

2.6.2. Tout autre effet biologique sur les organismes vivants (la flore et, pour mémoire, sur l'environnement)

2.6.3. Stabilité biologique et physique, devenir dans l'environnement de l'utilisation proposée : diffusion, mobilité, multiplication et persistance (pour mémoire : idem dans l'air, l'eau et le sol)

2.6.4. Stabilité génétique dans des conditions de l'utilisation proposée (et, pour mémoire, dans l'environnement)

2.6.5. Toute pathogénicité et infectiosité opportuniste pour l'homme et les animaux, y compris les effets immunotoxiques ou immunopathologiques (par exemple : allergénicité)

2.6.6. Des souches de cette espèce sont elles reconnues comme pouvant porter des caractères de résistance aux antibiotiques et/ou aux biocides, de virulence et/ou de pouvoir toxigène ? Ces

caractères sont-ils transférables ou mobilisables ? L'absence de gène de résistance transmissible aux antibiotiques dans l'aliment ou le produit issu de la souche utilisée devra être vérifiée.

2.6.7. Effets des produits du métabolisme autres que les toxines

2.7. MESURES DE CONFINEMENT ET D'INACTIVATION (POUR MEMOIRE)

2.7.1. Méthodes et précautions à prendre en matière d'entreposage, de manutention, de transport et d'utilisation ou en cas d'incendie ou d'un autre incident envisageable

2.7.2. Toute circonstance dans laquelle l'organisme actif ne doit pas être utilisé

2.7.3. Possibilité d'inactiver le micro-organisme ou ses toxines et toute méthode pour y parvenir

2.7.4. Conséquences de la contamination de l'air, du sol et de l'eau, en particulier de l'eau potable

2.7.5. Mesures d'urgence en cas d'accident

2.7.6. Procédures pour la gestion des déchets de l'organisme actif

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Directive 87/153/CEE du 16 février 1987 portant fixation de lignes directrices pour l'évaluation des additifs dans l'alimentation des animaux. JOCE du 7 mars 1987, n° L 64.

Directive 90/219/CE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés. JOCE du 8 mai 1990, n° L 117.

Directive 90/679/CEE du Conseil du 26 novembre 1990 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. JOCE du 31 décembre 1990 n° L 374 .

Directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides. JOCE du 24 avril 1998 n° L 123

Directive 98/81/CE du Conseil du 26 octobre 1998 modifiant la directive 90/219/CEE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés du JOCE du 5 mai 1998, n° L 330/13

Recommandations de la Commission du 29 juillet 1997 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 des rapports d'évaluation initiale au titre du règlement CE n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil. JOCE du 16 septembre 1997, n°L253/1.

Arrêté du 5 sept. 1989 relatif à l'emploi de préparations enzymatiques dans la fabrication de certaines denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine. JO du 1 octobre 1989).

Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes. JO du 30 juillet 1994.

Avis du comité scientifique européen en nutrition animale « safety of use of *Bacillus* species in animal nutrition » (février 2000).

Avis du comité scientifique européen en nutrition animale « criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance » (juillet 2001).

Avis du comité scientifique européen en nutrition animale « Guidelines for the assessment of additives in feedingstuffs. Part II : enzymes and micro-organisms » (octobre 2001).

Avis du comité scientifique européen en nutrition animale « Safety assessment and regulatory aspects of micro-organisms in feed and food applications » (juin 2002).

Lignes directrices pour la présentation des données sur les enzymes alimentaires. Rapport du comité scientifique de l'alimentation humaine EUR 14481 EN, 1992.

Lignes directrices pour l'établissement et la mise en œuvre de collections de cultures de micro-organismes. World Federal For Culture Collections, 1990.

Salminen S., Wright A., Morelli L. et al. (1998) Demonstration of safety of probiotics, a review. International journal of food microbiology, 44 :93-106.