

## 6. Évaluation de la toxicité éventuelle des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné

### Introduction

L'évaluation des risques prend aussi en considération l'estimation et l'évaluation du niveau et de la fréquence de l'ingestion d'aliments issus de plantes à ADN recombiné, qui sont fonction de la fréquence et du degré d'exposition de la population aux nouvelles substances exprimées, comme les protéines, les métabolites ou les composés endogènes, dont les concentrations dans l'aliment ont été modifiées à la suite de l'insertion du nouveau gène (et/ou d'autres effets non intentionnels résultant d'une modification génétique).

On peut avoir recours à des essais toxicologiques classiques inspirés des tests initialement mis au point pour des substances chimiques (telles que les additifs alimentaires, les pesticides et les contaminants alimentaires) pour évaluer la sécurité sanitaire des substances nouvellement exprimées. On peut déterminer la concentration sans effet nocif observé (CSENO) de la nouvelle substance, puis le coefficient de sécurité attaché au niveau d'exposition prévu dans la population générale. L'application de ce coefficient de sécurité permet de dériver la dose journalière acceptable ou tolérable. Ces analyses ne seront efficaces que si elles sont conçues selon l'identité et la fonction biologique des substances considérées.

Dans la pratique, les études toxicologiques classiques sur la salubrité des aliments entiers ne sont cependant pas très significatives car les aliments sont des mélanges complexes de composés caractérisés par une large variabilité en termes de composition et de valeur nutritionnelle. Il peut donc être extrêmement difficile de détecter les éventuels effets néfastes et de conclure à un lien entre ces effets et une caractéristique de l'aliment. Ces difficultés liées à l'application des approches toxicologiques classiques ont conduit à l'élaboration du concept d'équivalence substantielle. Cette approche reconnaît que le but de l'évaluation n'est pas d'instituer une salubrité absolue, mais de chercher à savoir si les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné sont aussi sûrs que leur équivalent traditionnel de référence.

### Approche conceptuelle des études de toxicité

L'approche conceptuelle de l'évaluation de la toxicité potentielle des aliments suppose de procéder à la caractérisation biochimique du nouveau produit issu de l'élément d'ADN inséré, au moyen d'études de digestibilité *in vitro*, d'analyses visant à identifier les similitudes avec les séquences d'acides aminés de toxines connues et d'études de toxicité aiguë orale basées sur un modèle animal.

S'il ressort de ces études qu'un effet à plus long terme est probable, des tests supplémentaires de toxicité chronique et subchronique devront être effectués. Les études de digestibilité *in vitro* ont pour objectif de déterminer la résistance du nouveau produit à l'acide, en simulant les conditions des liquides gastriques et intestinaux. La séquence des six acides aminés de la partie N terminale est comparée à celle de toxines connues afin de déterminer les similitudes. Si la similitude est importante, il est possible que le nouveau produit du gène inséré soit une toxine. Le nouveau produit est alors soumis à des études de toxicité

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 34.** Les techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques permettent l'introduction d'ADN, qui peut résulter en la synthèse de nouvelles substances dans les plantes. Ces nouvelles substances peuvent être des composés classiques des plantes alimentaires, comme les protéines, les graisses, les hydrates de carbone, les vitamines, qui sont nouveaux dans le contexte de cette plante à ADN recombiné. Les nouvelles substances peuvent également comprendre de nouveaux métabolites résultant de l'activité des enzymes générées par l'expression de l'ADN introduit.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 35.** L'évaluation de la sécurité sanitaire devrait tenir compte de la nature chimique et la fonction de la nouvelle substance exprimée et mesurer la concentration de la substance dans les parties comestibles de la plante à ADN recombiné, en incluant, le cas échéant, les valeurs moyennes et ses écart-types. L'exposition par le régime alimentaire actuel et les effets éventuels sur des groupes particuliers de la population devraient aussi être considérés.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 36.** Les informations devraient être fournies pour s'assurer que les gènes d'organisme(s) donneur(s) codant pour des toxines connues ou des facteurs antinutritionnels présents dans le ou les organisme(s) donneur(s) ne sont pas transférés à des plantes à ADN recombiné qui n'expriment pas normalement ces toxines ou caractéristiques antinutritionnelles. Cette garantie est particulièrement importante dans les cas où une plante à ADN recombiné est préparée différemment du végétal donneur, étant donné que les techniques de transformation alimentaire habituellement associées à l'organisme donneur peuvent désactiver; dégrader ou éliminer les facteurs antinutritionnels ou les composés toxiques.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 37.** Pour les raisons décrites à la Section 3, des études toxicologiques classiques peuvent ne pas être considérées nécessaires lorsque la substance ou une substance apparentée très proche a, en tenant compte de sa

fonction et de son exposition, déjà été consommée dans l'alimentation sans incidents. Dans les autres cas, l'utilisation d'études toxicologiques classiques appropriées ou d'autres études de la nouvelle substance peut-être nécessaire.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 38.** Dans le cas de protéines, l'évaluation de la toxicité potentielle devrait se focaliser sur les similarités des séquences d'acides aminés entre la protéine d'une part et les protéines toxiques et les facteurs antinutritionnels (ex: inhibiteurs de protéases, lectines) connus d'autre part, ainsi que sur leur stabilité, à la chaleur, ou au processus de transformation et à la dégradation dans des modèles de simulation représentatifs des conditions gastriques et intestinales. Des études de toxicité orales appropriées<sup>15</sup> peuvent être nécessaires à mener dans le cas où la protéine présente dans l'aliment n'est pas similaire à des protéines précédemment consommées sans incidents dans les aliments, et en tenant compte de sa fonction biologique quand elle est connue.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 39.** La toxicité potentielle de substances non protéiques introduites qui n'ont pas été consommées sans incidents dans les aliments devrait être évaluée sur la base du cas par cas selon l'identité et la fonction biologique de la substance dans la plante et selon l'exposition alimentaire. Le type d'études à réaliser peut inclure des études portant sur le métabolisme, la toxicocinétique, la toxicité subchronique, la toxicité chronique, la carcinogénicité, la toxicité sur la fonction de reproduction et le développement, conformément aux approches toxicologiques traditionnelles.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 40.** Cela peut nécessiter l'isolement de la nouvelle substance à partir de la plante à ADN recombiné, ou la synthèse ou la production de cette substance à partir d'une source alternative, auquel cas il devrait être montré que le matériel étudié est équivalent sur le plan biochimique, structurel et fonctionnel à celui produit dans la plante à ADN recombiné.

<sup>15</sup> Des lignes directrices pour les études de toxicité orale ont été élaborées dans des instances internationales, par exemple, les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

subchronique pour déterminer le coefficient de sécurité de la consommation en fonction de l'exposition de la population générale.

L'approche conceptuelle de l'évaluation de la toxicité d'une substance introduite est décrite comme suit dans les paragraphes 34 à 40 de la Directive du Codex.

## Méthodes utilisées pour déterminer l'absence de toxicité

Les éléments nécessaires et les méthodes utilisées pour déterminer si la nouvelle substance est une toxine ou non sont décrites dans les paragraphes 34 à 40 de la Directive du Codex (voir plus haut). Il faut de grandes quantités de protéines purifiées exprimées par le transgène pour réaliser des études de toxicité. Comme on ne peut pas en obtenir suffisamment dans les tissus végétaux, on extrait habituellement les protéines de micro-organismes (comme *Escherichia coli*) génétiquement modifiés de façon à produire la protéine en grande quantité. Dans ce cas, l'équivalence biochimique et fonctionnelle de la version issue de la bactérie et de la version exprimée par le végétal doit être prouvée.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 10.** L'utilisation de modèles animaux pour évaluer les limites toxicologiques est un élément majeur de l'évaluation des risques associés à de nombreux composés tels que les pesticides. Toutefois, dans la plupart des cas, la substance à évaluer est bien définie, de pureté connue, sans valeur nutritive particulière, et l'exposition humaine au composé est généralement faible. Il est par conséquent relativement simple de donner de tels composés à des animaux à des doses d'ordres de grandeur plus élevés que les niveaux d'exposition attendus chez l'homme, afin de déceler les éventuels effets néfastes pour la santé humaine. De cette façon, il est possible, dans la plupart des cas, d'estimer les niveaux d'exposition pour lesquels on n'observe pas d'effets néfastes, et de fixer des niveaux d'ingestion sûrs en appliquant des facteurs de sécurité appropriés.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 11.** Les études sur animaux ne peuvent être directement appliquées à l'examen des risques associés avec des aliments entiers, qui sont des mélanges complexes de composés souvent caractérisés par une grande variation de composition et de valeur nutritionnelle. Du fait de leur volume et de leur effet sur la satiété, ils ne peuvent généralement être donnés aux animaux qu'à des doses qui ne sont que de faibles proportions des quantités qui constituent le régime alimentaire chez l'homme. En outre, la valeur nutritionnelle et l'équilibre des régimes alimentaires utilisés est un élément

important que doivent prendre en considération les études sur les animaux pour éviter l'induction d'effets néfastes sans rapport direct avec l'aliment en question. Détecter des effets néfastes éventuels et les associer définitivement à une caractéristique particulière de l'aliment peut donc être extrêmement difficile. Si la caractérisation de l'aliment indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation fine de la sécurité sanitaire, des études sur les animaux correctement conçues pourraient être demandées pour les aliments entiers. Quant à savoir s'il est nécessaire d'effectuer des études sur les animaux, il faut pour cela déterminer s'il convient ou non de soumettre des animaux d'expérience à de telles études lorsqu'il est peu probable que celles-ci aboutissent à des données pertinentes.

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 12.** Compte tenu des difficultés que représente l'application des procédures traditionnelles d'essai toxicologiques et d'évaluation des risques aux aliments entiers, l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des végétaux alimentaires, plantes à ADN recombiné incluses requiert une approche plus spécifique. D'où le développement d'une approche multidisciplinaire d'évaluation de la sécurité qui prend en compte à la fois les changements souhaités et les changements involontaires qui peuvent se produire dans la plante ou dans les aliments dérivés de celle-ci, en utilisant le concept d'*équivalence substantielle*.

On réalise habituellement des études d'alimentation sur animaux pour établir l'absence de toxicité aiguë ou subchronique. Ces études ont cependant des limites évidentes. Si elles ont été réalisées avec soin et mettent en évidence une absence d'effets sur des paramètres physiologiques déterminés, elles sont certes utiles mais elles ne donnent pas une assurance complète de la sécurité sanitaire car les extrapolations de résultats des animaux à l'homme, sont généralement sujettes à caution. Ces résultats devraient être considérés comme une "confirmation" et une «garantie d'innocuité» et ils sont un élément supplémentaire de l'évaluation globale de la sécurité sanitaire, dans les cas où ils sont garantis.

Les paragraphes 10 à 12 de la Directive du Codex décrivent les avantages et les limites des études sur animaux dont il faut tenir compte lorsque l'on évalue la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné.

Les études sur animaux qui portent sur des aliments entiers plutôt que sur des composants isolés peuvent être appropriées en cas de modifications significatives de la composition de l'aliment dérivé de plantes à ADN recombiné; voir le paragraphe 53 de la Directive du Codex.

Les problèmes éthiques liés aux études sur animaux et la nécessité de ces études doivent être une préoccupation constante pour éviter aux animaux des souffrances inutiles. La Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies, qui a eu lieu en 2000 (*Aspects de la salubrité des aliments d'origine végétale génétiquement modifiés*, Section 4.2, paragraphe 4.2.2) présente une analyse utile de la nécessité de ces études (Encart 6.1).

On considère en général que les études subchroniques chez les rongeurs doivent être menées sur une durée de 90 jours au minimum pour démontrer

**DIRECTIVE DU CODEX PARAGRAPHE 53.** Certains aliments peuvent nécessiter des tests complémentaires. Par exemple, des études d'alimentarité sur animaux peuvent être justifiées pour les aliments dérivés de plantes à ADN recombiné, si des changements sur la biodisponibilité des nutriments sont attendus ou si leur composition n'est pas comparable à celle d'aliments traditionnels. Les aliments conçus pour améliorer la santé peuvent nécessiter des études nutritionnelles spécifiques, toxicologiques, ou tout autre étude qui soit appropriée. Si la caractérisation de l'aliment indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation complète de son innocuité, des études sur animaux correctement conçues peuvent être demandées sur les aliments entiers.

## Encart 6.1. Nécessité d'études chez l'animal (FAO/OMS, 2000)

Si la caractérisation de l'aliment indique que les données disponibles sont insuffisantes pour une évaluation approfondie de la salubrité, il peut être nécessaire de réaliser des études chez l'animal. C'est notamment le cas si l'aliment est censé apporter une contribution alimentaire significative, s'il n'existe pas d'antécédents de consommation du nouveau produit génique ou si la modification affecte plusieurs voies métaboliques.

Quand l'aliment génétiquement modifié diffère de sa contrepartie traditionnelle par la

présence d'un ou de quelques nouveaux gènes et de leurs produits, il est possible d'isoler et d'étudier ceux-ci d'une manière comparable aux tests de toxicité classiques des additifs alimentaires.

Cependant, il est essentiel de s'assurer que le matériel testé est équivalent sur le plan biochimique et fonctionnel, à celui produit dans l'aliment génétiquement modifié. De cette manière, la sensibilité des tests de toxicité est supérieure à celle que l'on obtiendrait si l'on donnait directement aux animaux les produits des plantes génétiquement modifiées et on évite certains artefacts susceptibles de se produire quand on effectue les tests sur des aliments entiers. Mais cette stratégie ne s'applique que si l'analyse détaillée préalable ne révèle pas d'autres modifications significatives que celles attendues. Dans le cas contraire, il est souvent nécessaire de tester l'aliment entier et les études chez l'animal doivent alors porter sur l'aliment tel qu'il est consommé par l'homme. Le type d'étude à mettre en œuvre est à décider au cas par cas. Outre la recherche d'éventuels effets toxicologiques, les études chez l'animal peuvent aussi être nécessaires si la modification génétique affecte directement ou indirectement la concentration ou la biodisponibilité des nutriments.

Quand on estime que des études toxicologiques sont indispensables pour évaluer la salubrité de la consommation à long terme d'un aliment, on considère la plupart du temps qu'une étude subchronique d'une durée de 90 jours est le minimum nécessaire

pour démontrer la salubrité de cette consommation. Le cas échéant, on réalisera au préalable une étude pilote de courte durée afin de s'assurer que le régime est bien accepté par les animaux d'expérience et que les taux d'incorporation de l'article à tester sont appropriés, par exemple que le régime témoin, contenant l'élément de référence à un taux équivalent, ne produit pas d'effets dus aux toxiques naturels présents à une concentration normale dans les aliments traditionnels considérés comme salubres. La dose maximum à utiliser pour une étude chez l'animal est la dose la plus élevée que l'on puisse employer sans entraîner de déséquilibre nutritionnel, tandis que la dose minimale doit être comparable à l'apport prévu chez l'homme.

Il faudrait décider au cas par cas de la nécessité d'effectuer des tests toxicologiques

supplémentaires en tenant compte des résultats de l'étude sur 90 jours et d'autres études. Par exemple, si on observe des modifications tissulaires à type de prolifération durant l'étude sur 90 jours, il sera sans doute souhaitable de réaliser une étude de toxicité à plus long terme.

Les tests toxicologiques classiques ont une valeur limitée pour l'évaluation des aliments entiers, notamment des AGM. En se basant sur la quantité maximale d'aliment entier qui peut être utilisée dans des régimes expérimentaux selon les indications ci-dessus, on peut calculer une marge de sécurité tenant compte de l'absence ou de la nature des effets indésirables et de l'exposition humaine vraisemblable. Pour améliorer les protocoles expérimentaux, on proposera une alimentation animale adéquate sur le plan nutritionnel et on évitera de tester les aliments ou produits d'une manière inappropriée.

L'utilisation de biomarqueurs à effets précoces pourrait accroître la valeur diagnostique et la sensibilité des tests de toxicité effectués sur les aliments (Schilter *et al.*, 1996). Mais cette approche comporte un risque de confusion entre effets adaptatifs et effets toxiques.

16 Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies, Topic 6: *Safety testing of food additives and contaminants and the long-term evaluation of foods produced by biotechnology* 29 mai–2 juin 2000.

## Encart 6.2. Études toxicologiques sur les aliments issus de la biotechnologie (FAO/OMS, 2000)

Lorsqu'un produit alimentaire issu de la biotechnologie diffère de sa contrepartie traditionnelle par un petit nombre de caractéristiques bien définies, le processus d'évaluation de la sécurité sanitaire peut être ciblé sur ces caractéristiques qui détermineront les tests à effectuer. L'étude toxicologique se focalisera sur ces quelques caractéristiques bien définies. Il est parfois possible d'isoler et d'étudier les différences d'un ou de quelques nouveaux gènes et de leurs produits d'une manière comparable aux tests de toxicité classiques des additifs alimentaires. Pour les tests de toxicité conventionnels de ces nouveaux gènes et de leurs produits, les études de toxicité subaiguë sur 14 jours constituent la norme (OCDE, 1995: Ligne directrice 407). Une substance dont on doit tester la toxicité est généralement administrée à des rats dans le cadre d'une étude standard de toxicité subaiguë sur 14 jours, à une dose reflétant une très large marge de sécurité. La CSENO est la dose maximale qui peut être incorporée à un régime alimentaire expérimental sans que des effets indésirables soient obser-

vés, et on peut en dériver un coefficient de sécurité pour l'exposition humaine au produit considéré. Le processus d'évaluation devrait être complété par des études sur l'homme lorsque les études *in vivo* sur animaux ne mettent en évidence aucun effet inattendu ou irréversible<sup>16</sup>.

Ces études devraient être réalisées en plusieurs étapes pour examiner la tolérance jusqu'à des doses maximales d'ingestion potentielle, de manière à avoir des études cliniques contrôlées de confirmation avant de mettre le produit sur le marché. Les études sur l'homme devraient être effectuées le plus tôt possible, dans le respect des considérations d'éthique, afin de réaliser des études sur animaux mieux ciblées, plutôt que de large portée et sans intérêt pour la question examinée. Les observations obtenues dans le cadre d'études sur l'homme et sur les animaux peuvent révéler que l'aliment est sans danger par rapport à l'utilisation prévue, ou mettre en évidence des effets inattendus qui devront faire l'objet d'une enquête plus approfondie pour confirmer l'innocuité de l'aliment.



**Encart 6.3. Aspects techniques des études de toxicité subchronique (FDA, 2003)\***

Les études de toxicité subchronique sur des rongeurs sont généralement conduites sur 90 jours (3 mois) à 12 mois. Ces études sont habituellement réalisées pour : prévoir les doses appropriées de la substance d'essai pour les études de toxicité chronique futures; déterminer les CSENO pour certains résultats toxicologiques recherchés ou concevoir des études à long-terme sur des rongeurs ou d'autres animaux, axées en particulier sur les organes cibles identifiés. Ces études ne permettent pas de déterminer la cancérogénicité potentielle d'une substance testée.

Il est essentiel que toutes les études de laboratoire non cliniques soit conduites conformément aux lignes directrices internationalement reconnues<sup>17</sup> et aux Bonnes pratiques de laboratoire (BPL)<sup>18</sup>. Les autres facteurs à prendre en considération sont examinées ci-après.

**Animaux de laboratoire.**

Les soins, l'entretien et les conditions d'hébergement des animaux de laboratoire doivent être conformes aux directives du *Guide for the care and use of laboratory animals*.<sup>19</sup>

Les espèces, les souches et le sexe doivent être choisis en fonction de la sensibilité générale des animaux de laboratoire. La réactivité de certains organes et tissus des animaux d'expérience à la substance toxique testée entre également en ligne de compte lors de la sélection des espèces, souches et sous-souches de rongeurs pour les études de toxicité. On choisira des souches autogames, exogames ou hybrides de rongeurs selon les aspects scientifiques sur lesquels portent les essais. En outre, les animaux de laboratoire devraient provenir de colonies bien caractérisées et en bonne santé, car, d'après des informations récentes, la capacité de survie de certaines souches de rats en captivité serait limitée, et il convient de sélectionner des animaux sur lesquels l'expérience puisse être prolongée pendant toute la durée recommandée.

Les résultats des tests peuvent varier en fonction de l'âge des animaux utilisés, aussi est-il recommandé d'effectuer les tests sur des animaux jeunes et de commencer à administrer les doses immédiatement après le sevrage, après une période d'acclimatation d'au moins 5 jours. Pour les rongeurs, l'âge maximal est de 6 à 8 semaines.

Un nombre égal de mâles et de femelles de chaque espèce et souche devraient être utilisés pour l'étude. Dans le cas d'études de toxicité subchronique, chaque groupe traité et chaque groupe témoin devrait être constitué d'au moins 20 rongeurs de chaque sexe. Ces recommandations sont destinées à garantir qu'un nombre suffisant d'animaux survivront jusqu'à la fin de l'étude pour permettre une évaluation significative des effets toxicologiques.

Il est conseillé de n'avoir qu'un animal par cage, pour les raisons indiquées ci-après.

S'il y a plusieurs animaux dans une cage, il est impossible de déterminer avec précision l'assimilation alimentaire (rapport entre la quantité d'aliments consommés et le gain de poids).

Il est impossible de déterminer si une perte de poids est due à une altération du goût de l'aliment ou à la toxicité de la substance administrée.

Si les animaux ne sont pas dans des cages individuelles, des organes ou des tissus d'animaux moribonds ou morts peuvent être mangés par les autres animaux et perdus.

Les animaux des groupes traités et du groupe témoin doivent être soumis à un régime alimentaire isocalorique, contenant les mêmes niveaux de nutriments (notamment, fibres et micronutriments)<sup>20</sup>. Une mauvaise maîtrise des variables du régime alimentaire peut se traduire par des déséquilibres nutritionnels ou une privation calorique qui peuvent fausser l'interprétation des résultats de l'étude de toxicité et altérer le résultat et la reproductibilité des examens.

Les animaux devraient être assignés aux groupes témoin et aux groupes traités sur la base d'un échantillonnage aléatoire stratifié, de façon à minimiser le biais et à garantir la comparabilité des variables pertinentes entre les groupes traités et le groupe témoin (par exemple poids corporel moyen et gammes de poids corporel). Si l'on veut fonder la randomisation sur d'autres caractéristiques, celles-ci doivent être décrites et justifiées. Les animaux de tous les groupes doivent être intégrés dans l'étude le même jour; s'ils sont trop nombreux, leur intégration sera étalée sur plusieurs jours. Si cette dernière option est choisie, on intégrera chaque jour dans l'étude un nombre prédéterminé d'animaux du groupe témoin et des groupes à traiter de manière à préserver la comparabilité.

**Plan d'expérience**

Les animaux devraient être exposés à la substance d'essai sept jours par semaine, pendant au moins 90 jours consécutifs (3 mois).

La voie d'administration de la substance d'essai doit être choisie en fonction du mode normal d'exposition humaine. Le choix d'une autre voie doit être justifié. Les voies d'administration possibles sont les suivantes.

Si l'exposition humaine se fait en principe à travers la consommation d'aliments solides ou d'une combinaison d'aliments solides et liquides, la substance devrait être administrée dans les aliments. Il ne faut pas laisser les animaux choisir ce qu'ils mangent, ni dans le régime alimentaire base, ni dans celui qui contient la substance. Des précautions doivent être prises pour que les procédés employés lors de l'agglomération en granulés, comme le chauffage, n'altèrent pas la substance d'essai.

La substance d'essai peut être administrée dissoute dans l'eau de boisson ou encore en capsules ou par intubation orale (gavage) si l'exposition humaine résulte plus probablement de l'ingestion quotidienne d'une dose élevée unique que de l'ingestion continue de petites doses. L'administration par gavage devrait être réalisée à peu près à la même heure tous les jours, et le volume maximal de la solution que devrait contenir chaque dose devrait être déterminé en fonction de la taille de l'animal. Chez les rongeurs, ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel (0,4 ml/100g de poids corporel s'il s'agit de substances huileuses). Si la quantité administrée doit être répartie en plusieurs petites doses, la totalité doit être absorbée en 6 heures.

(suite)

<sup>17</sup> OECD Guideline for the testing of chemicals, repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, 407, Sept. 1998

<sup>18</sup> Principes de bonnes pratiques de laboratoire de l'OCDE Directive 87/18/CEE, Directive 88/320/CEE

<sup>19</sup> National Research Council Institute of Laboratory Animal Resources. 1996.

Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC, National Academy Press,

<sup>20</sup> Nutrient requirements of laboratory animals, 4th Revised Edition, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council, 1995.

## Encart 6.3. (fin)

**Groupes de doses**

On utilise au moins trois niveaux de dose de la substance d'essai par sexe (un niveau de dose par groupe), mais il est préférable d'en utiliser 4 ou 5. Un groupe témoin concurrent devrait aussi être inclus. Les niveaux de doses appropriés pour les études de toxicité subchronique peuvent être déterminés sur la base des résultats d'études de toxicité aiguë et à court terme.

**Sélection des doses de traitement**

Dans les études de toxicité, il est conseillé d'utiliser au moins trois niveaux de doses de la substance d'essai et un groupe témoin concurrent. Les trois niveaux de doses devraient être administrés conformément aux lignes directrices suivantes:

- la dose forte devrait être suffisamment élevée pour provoquer une réaction toxique chez les animaux de laboratoire;
- la dose intermédiaire devrait être assez élevée pour déclencher des effets toxiques minimes chez les animaux d'expérience (altérations des niveaux d'enzymes ou léger ralentissement de la prise de poids, etc.);
- la dose faible ne devrait pas engendrer de réponse toxique chez les animaux testés.

**Groupes témoins**

Un groupe témoin concurrent approprié d'animaux de laboratoire est nécessaire. Dans les études alimentaires, ce groupe témoin reçoit le régime de base.

L'excipient ou le véhicule de la substance d'essai sera administré aux animaux témoins à raison d'un volume égal au volume maximal de l'excipient ou du véhicule que reçoivent les animaux appartenant à tous les groupes de dose. Des informations sur la toxicité de l'excipient ou du véhicule doivent être fournies pour s'assurer qu'il sera sans incidence sur les résultats de l'étude.

**Observations et tests cliniques: observations des animaux d'expérience**

L'état des animaux doit être observé au moins une ou deux fois par jour pendant toute la durée de l'étude pour détecter des signes généraux d'effets toxicologiques ou pharmacologiques, de morbidité et de mortalité. Les observations sont généralement espacées d'au moins 6 heures. Il convient de tenir pour chaque animal une fiche, sur laquelle on notera le moment de l'apparition des éventuels effets, leurs caractéristiques et leur progression, de préférence à l'aide d'un système de notation. Les évaluations cliniques devraient

porter non seulement sur les effets pharmacologiques et toxicologiques généraux, mais aussi sur les troubles neurologiques, les changements de comportement, les dysfonctionnements du système nerveux autonome et les autres signes de toxicité sur le système nerveux. Les symptômes relevés devraient couvrir les observations suivantes (sans que cette liste soit exhaustive) : modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et de réactions neuro-végétatives. Il convient également de consigner les changements dans la posture et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de comportements stéréotypés ou bizarres. L'apparition de tumeurs devrait aussi être notée, en particulier dans les études à long terme. En cas d'apparition de symptômes toxiques et pharmacologiques au cours d'une étude, il peut être nécessaire d'effectuer des tests cliniques supplémentaires ou des examens post-mortem approfondis.

**Poids corporel et ingestion de nourriture**

Les animaux d'expérience devraient être pesés au moins une fois par semaine. La consommation de nourriture (ou d'eau si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson) devrait aussi être mesurée une fois par semaine, tout au long d'une étude de toxicité subchronique.

**Tests cliniques**

Les tests suivants doivent être réalisés: examen ophtalmologique, profils hématologiques, tests de chimie clinique, analyses d'urine, tests de neurotoxicité et études d'immunotoxicité.

**Autopsie et examen microscopique**

Tous les animaux testés devraient être soumis aux examens suivants: autopsie générale, pesage des organes, préparation des tissus pour un examen au microscope, examen microscopique, et histopathologie des organes lymphoïdes.

**\*Référence: US FDA. 2003. *Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients: Red Book 2000, Novembre 2003. IV.C.4a. Subchronic toxicity studies with rodents.* Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.**

l'innocuité de l'ingestion répétée d'aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. La Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies, tenue en 2000 (*Safety testing of food additives and contaminants and the long-term evaluation of foods produced by biotechnology*, page 4) a été l'occasion d'un débat utile sur les études de toxicité subchronique (résumé dans l'Encart 6.2).

Le document de l'United States Food and Drug Administration sur les principes toxicologiques de l'évaluation de la sécurité sanitaire des ingrédients alimentaires (US FDA, 2003) peut aussi être une référence utile pour les aspects techniques des études de toxicité subchronique (voir le résumé dans l'Encart 6.3.).

## Études de toxicité chronique

Les études de toxicité chronique comportent l'administration sur une longue période de la substance d'essai, en général dans les aliments ou dans l'eau de boisson, et parfois par gavage. Ces études ont pour objet de détecter d'éventuels effets cumulatifs sur le ou les organe(s) cibles, en se fondant sur la relation dose-réponse. L'opportunité des études de toxicité chronique à long terme devrait être évaluée au cas par cas, et uniquement lorsque les résultats des études sur 90 jours ou d'autres études d'alimentarité indiquent qu'une étude de toxicité devrait être effectuée sur une plus longue période.

## Assurance de qualité

Il est essentiel que le processus d'organisation et les conditions dans lesquelles les études de laboratoire sont planifiées, mises en œuvre, vérifiées, enregistrées et rapportées soient conformes aux principes des bonnes pratiques de laboratoire (BPL)<sup>18</sup>. Ces principes s'appliquent aux essais de substances chimiques visant à déterminer leurs propriétés et/ou leur sécurité pour la santé humaine et l'environnement. Dans les études toxicologiques, il est indispensable de s'assurer que les données utilisées pour estimer la sécurité sanitaire sont d'une qualité acceptable pour toutes les parties. Il faut également établir la relation entre les modifications des paramètres physiologiques mesurés et les niveaux de doses des composés testés auxquels les animaux sont exposés. Il est donc primordial d'avoir des données de bonne qualité qui permettent une juste interprétation de la toxicité et une estimation exacte des CSENO des composés testés. À partir de cette interprétation, le coefficient de sécurité peut être défini en estimant les niveaux maximaux auxquels la population humaine peut être exposée sans que des effets nocifs pour la santé soient observés. En outre, si l'on a observé des différences des paramètres physiologiques mesurés dans le cadre des expériences, entre les animaux traités et les animaux non traités, ces écarts doivent faire l'objet d'une analyse statistique afin d'établir leurs limites de confiance.

## Références

- Doerfler, W. 2000. *Foreign DANN in mammalian systems*. Wennheim, Germany, Wiley-VCH. 181 pp.
- FAO/OMS. 2000. *Aspects de la salubrité des aliments génétiquement modifiés d'origine végétale*. Consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur les aliments produits par biotechnologie, 29 mai–2 juin 2000, Genève, Suisse. <ftp://ftp.fao.org/docrep/nonfao/ae584f/ae584f00.pdf>
- FAO/OMS. 2000. *Tests de salubrité des additifs et contaminants alimentaires et évaluation à long terme des aliments produits par biotechnologie*. Sujet 6. Consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur les aliments produits par biotechnologie, 29 mai–2 juin 2000, Genève, Suisse. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Bio-08.pdf>
- OCDE. 1995. *Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Ligne directrice 407. Toxicité orale à dose répétée – pendant 28 jours sur les rongeurs*. Paris, Organisation de coopération et de développement économiques. <http://www.OCDE.org/dataOCDE/50/18/37478478.pdf>
- OCDE. 1998. *Série OCDE sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et la vérification du respect de ces principes Numéro 1*. ENV/MC/CHEM(98)17. Paris, Organisation de coopération et de développement économiques. [http://www.olis.OCDE.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem\(98\)17](http://www.olis.OCDE.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem(98)17)
- OCDE. 2000. *Rapport du Groupe d'étude sur la sécurité des nouveaux aliments destinés à la consommation humaine et animale*. C(2000)86/ADD1. Paris, Organisation de coopération

<sup>18</sup> Voir Note page 31.

et de développement économiques. [http://www.oalis.OEDE.org/oalis/2000doc.nsf/LinkTo/C\(2000\)86-ADD1](http://www.oalis.OEDE.org/oalis/2000doc.nsf/LinkTo/C(2000)86-ADD1)

Schilter, B., Holzhäuser, D., Cavin, C. & Huggett, A.C. 1996. An integrated in vivo and in vitro strategy to improve food safety evaluation. *Trends Food Sci. Technol.*, 7: 327–332.

US FDA. 2003. *Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients: Red book 2000, November 2003. IV.C.4a. Subchronic toxicity studies with rodents*. Washington DC, USA, United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.

US National Research Council. 1995. *Nutrient requirements of laboratory animals*, 4th Revised Edition. Washington DC, USA, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture ●