
**DIRECTIVE RÉGISSANT LA CONDUITE DE L'ÉVALUATION
DE LA SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS PRODUITS À L'AIDE DE
MICROORGANISMES À ADN RECOMBINÉ**

CAC/GL 46-2003

SECTION 1 – CHAMP D'APPLICATION

1. Cette directive s'appuie sur les *Principes de l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes* et traite des aspects de sécurité sanitaire et des aspects nutritionnels liés aux aliments produits par action de microorganismes à ADN recombiné.¹ Les microorganismes à ADN recombiné utilisés pour produire ces aliments sont en général dérivés de procédés de biotechnologies modernes à partir de souches dont l'utilisation s'est avérée sûre et déterminante dans la production alimentaire. Cependant, lorsqu'il s'agit de souches receveuses dont les antécédents ne font pas état d'une utilisation sûre, leur sécurité devra être démontrée.² Ces aliments et ingrédients alimentaires peuvent contenir des microorganismes à ADN recombiné vivants ou non viables ou peuvent être fabriqués par fermentation à l'aide de microorganismes à ADN recombiné desquels ces derniers sont ensuite éliminés.

2. Compte tenu de la possibilité que les questions énumérées ci-après soient examinées par d'autres organismes ou d'autres instruments, le présent document ne traite pas de ce qui suit:

- la sécurité des microorganismes utilisés en agriculture (pour la protection des végétaux, à titre de biofertilisants, dans les aliments pour animaux ou dans les aliments dérivés d'animaux ayant consommé ces aliments pour animaux, etc.);
- les risques associés aux rejets dans l'environnement de microorganismes à ADN recombiné utilisés en production alimentaire;
- la sécurité des substances produites par les microorganismes utilisés comme additifs ou auxiliaires technologiques, y compris les enzymes destinés à être utilisés dans la production alimentaire;³
- les présumés avantages spécifiques pour la santé ou les effets probiotiques éventuellement attribuables à l'utilisation de microorganismes dans les aliments; ou
- les questions associées à la sécurité des travailleurs du secteur de la production alimentaire qui manipulent des microorganismes à ADN recombiné.

3. De nombreux microorganismes utilisés dans la production alimentaire ont un long historique d'une utilisation sans risque antérieure aux évaluations scientifiques. Peu de microorganismes ont fait l'objet d'une évaluation scientifique permettant de caractériser de manière complète tous les risques potentiels liés aux aliments produits à l'aide de ces microorganismes, y compris, dans certains cas, la consommation de microorganismes vivants. En outre, les Principes d'analyse des risques du Codex, particulièrement ceux pour l'évaluation des risques, sont tout d'abord destinés à être appliqués à des entités chimiques comme les additifs alimentaires et les résidus de pesticides ou à des contaminants chimiques ou microbiens spécifiques qui présentent des dangers et des risques identifiables. Ces principes n'étaient pas au départ destinés à s'appliquer aux utilisations délibérées de microorganismes dans la transformation des aliments ou dans les aliments transformés par fermentation microbienne. Les évaluations de la sécurité sanitaire effectuées à ce jour ont ciblé principalement l'absence des propriétés associées à la pathogénicité de ces organismes et l'absence d'effets néfastes attribués à l'ingestion de ces organismes plutôt que l'évaluation des résultats d'études prescrites. De plus, beaucoup d'aliments contiennent des substances qui seraient probablement classées comme dangereuses, si elles avaient été soumises aux approches classiques d'évaluation de la sécurité sanitaire. Par conséquent, il convient d'adopter une approche plus ciblée pour évaluer la sécurité sanitaire d'un aliment entier.

¹ Les microorganismes impliqués dans ces applications sont les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. (Les utilisations visées sont, sans s'y limiter, la production de yaourt, de fromage, de saucisson sec, de natto, de kimchi, de pain, de bière et de vin.)

² La définition des critères servant à déterminer la sécurité des microorganismes utilisés dans la production d'aliments en l'absence d'antécédents démontrant une utilisation sûre, sort du cadre du champ d'application du présent document.

³ Le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) révisé actuellement les Directives sur les spécifications et considérations générales pour les préparations enzymatiques utilisées dans la transformation des produits alimentaires. Ces directives ont été utilisées pour évaluer les préparations enzymatiques dérivées de microorganismes génétiquement modifiés.

4. Les informations dont il faut tenir compte pour développer une telle approche sont les suivantes:
- A) les diverses utilisations de microorganismes dans la production alimentaire;
 - B) la prise en compte des types de modifications génétiques susceptibles d'avoir été provoquées dans ces organismes;
 - C) les différentes méthodologies disponibles pour évaluer leur sécurité;
 - D) les questions spécifiques associées à l'utilisation de microorganismes à ADN recombiné utilisés dans la production alimentaire, y compris leur stabilité génétique, le potentiel de transfert de gènes, la colonisation du tractus gastro-intestinal et la persistance⁴ subséquente, les interactions que le microorganisme à ADN recombiné peut avoir avec la flore gastro-intestinale ou l'hôte mammifère, et enfin, tout impact du microorganisme à ADN recombiné sur le système immunitaire.
5. Cette approche est basée sur le principe que la sécurité sanitaire des aliments, produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné, est évaluée par rapport aux produits traditionnels de référence qui ont un historique d'une utilisation sans risque, non seulement pour l'aliment produit à l'aide du microorganisme à ADN recombiné, mais également pour le microorganisme lui-même. Cette approche tient compte à la fois des effets attendus et des effets non intentionnels. Plutôt que de chercher à identifier tous les dangers associés à un aliment donné ou au microorganisme, le but est de déceler des dangers nouveaux ou changés par rapport au produit traditionnel de référence.
6. Cette approche d'évaluation de la sécurité sanitaire s'inscrit dans le cadre d'évaluation des risques tel qu'il est décrit à la Section 3 des *Principes d'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes*. Si un danger nutritionnel ou autre problème de sécurité sanitaire des aliments, nouveau ou changé, est identifié par l'évaluation de la sécurité sanitaire, le risque associé à celui-ci devrait d'abord être examiné pour mesurer son impact sur la santé humaine. Après l'évaluation de la sécurité sanitaire et, si nécessaire, l'évaluation d'autres risques, l'aliment ou une partie de cet aliment, tel qu'un microorganisme utilisé dans sa production, devrait être soumis aux considérations de gestion des risques en accord avec les *Principes d'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes* avant que sa distribution commerciale ne soit envisagée.
7. Les mesures de gestion de risques telles que la surveillance après la mise sur le marché des effets sur la santé du consommateur, peuvent faciliter le processus d'évaluation des risques. Celles-ci sont examinées au paragraphe 20 des *Principes pour l'analyse des risques liés aux aliments dérivés des biotechnologies modernes*.
8. Cette directive décrit les approches recommandées pour évaluer la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné, en les comparant à un produit traditionnel de référence. L'évaluation de la sécurité sera axée sur la sécurité sanitaire des microorganismes à ADN recombiné utilisés dans la production alimentaire, et si cela est approprié, sur celle des métabolites produits par l'action des microorganismes à ADN recombiné sur les aliments. Cette Directive identifie les données et informations qui sont en général utilisables pour réaliser de telles évaluations. Lorsqu'une comparaison est effectuée entre un microorganisme à ADN recombiné ou un aliment produit à l'aide d'un microorganisme à ADN recombiné et les produits traditionnels de référence respectifs, toutes les différences identifiées devraient être prises en compte, qu'elles résultent d'effets attendus ou involontaires. Il doit être dûment tenu compte des interactions du microorganisme avec la matrice alimentaire ou la microflore et de la sécurité sanitaire de toute nouvelle protéine exprimée et de tout métabolite secondaire produit. Bien que cette directive soit destinée aux aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné ou de leurs composants, l'approche décrite pourrait s'appliquer de manière générale aux aliments produits à l'aide de microorganismes qui ont été modifiés par d'autres techniques.

SECTION 2 – DÉFINITIONS

9. Les définitions ci-dessous s'appliquent à la présente Directive:

« **Microorganisme à ADN recombiné** » – signifie des bactéries, des levures ou des champignons filamenteux dont le matériel génétique a été modifié au moyen de techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques, y compris la recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'introduction directe d'acides nucléiques dans les cellules ou les organites.

⁴ La persistance sous-entend la survie de microorganismes dans le tractus gastro-intestinal sur une période d'au moins deux fois plus longue que la durée du transit intestinal (International Life Science Institute, *The safety assessment of viable genetically modified microorganisms used as food*, 1999, Bruxelles; Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies – *Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de microorganismes génétiquement modifiés*, 24 au 28 septembre 2001, Genève, Suisse).

« *Produit traditionnel de référence* »⁵ - signifie:

- un microorganisme/une souche dont les antécédents font état d'une utilisation sûre au niveau de la production et/ou de la transformation d'aliments et apparenté à la souche d'ADN recombiné. Le microorganisme peut être vivant dans l'aliment, ou peut être éliminé lors de la transformation ou bien encore rendu non viable au cours de la transformation; ou
- un aliment produit à l'aide de microorganismes utilisés dans la production alimentaire classique pour lesquels existe une expérience de sécurité basée sur une utilisation courante en production alimentaire.

SECTION 3 - INTRODUCTION À L'ÉVALUATION DE LA SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

10. La plupart des aliments produits par multiplication délibérée de microorganismes remontent à l'Antiquité et leur consommation a été démontrée comme étant sûre bien avant l'émergence de méthodes scientifiques pour évaluer leur sécurité. Les microorganismes possèdent des propriétés particulières, telles que des taux de croissance élevés, qui favorisent les modifications génétiques par l'intermédiaire de techniques conventionnelles ou de biotechnologies modernes qui peuvent être mises en oeuvre dans des délais courts. Les microorganismes utilisés dans la production alimentaire à partir de techniques génétiques conventionnelles n'ont pas fait l'objet d'évaluations chimiques, toxicologiques, épidémiologiques ou médicales systématiques et approfondies avant la commercialisation de ces aliments. A la place les microbiologistes, mycologues et technologues de l'industrie alimentaire ont plutôt évalué de nouvelles souches de bactéries, de levures et de champignons filamenteux, pour leurs caractéristiques phénotypiques jugées utiles dans le domaine de la production alimentaire.

11. Les évaluations de la sécurité sanitaire des microorganismes à ADN recombiné devraient apporter des informations sur les points suivants: l'utilisation de microorganismes apparentés dans les aliments, l'absence de propriétés connues comme caractéristiques des pathogènes, dans les microorganismes à ADN recombiné ou les souches receveuses utilisées pour la construction des microorganismes à ADN recombiné, ainsi que les effets néfastes connus au niveau des organismes receveurs ou apparentés. En outre, lorsque le microorganisme à ADN recombiné affecte directement l'aliment ou qu'il y demeure présent, tout effet sur la sécurité sanitaire de l'aliment devrait être examiné.

12. Le recours à des modèles animaux pour évaluer les effets toxicologiques joue un rôle important dans l'évaluation de nombreuses substances, tels que les pesticides. Toutefois, dans la plupart des cas, la substance qui doit être évaluée est déjà caractérisée de manière adéquate, d'un degré de pureté connu, sans valeur nutritionnelle particulière et une exposition humaine à cette substance faible. Par conséquent, il est relativement aisé d'introduire de tels composés dans l'alimentation des animaux à des doses plusieurs fois supérieures au niveau d'exposition humaine prévu, de manière à identifier tout effet néfaste potentiel significatif pour la santé humaine. Il sera ainsi possible, dans la plupart des cas, d'évaluer les niveaux d'exposition auxquels aucun effet néfaste n'est observable et fixer des niveaux admissibles d'ingestion en appliquant des coefficients de sécurité appropriés.

13. Les études effectuées sur les animaux ne peuvent pas s'appliquer d'emblée à l'évaluation des risques que présentent les aliments entiers, ceux-ci étant faits d'un mélange complexe de composés et souvent caractérisés par une grande variation de composition et de valeur nutritionnelle. En raison de leur volume et de leur effet au niveau de la satiété, ces aliments ne peuvent en général être donnés aux animaux qu'à des quantités plusieurs fois plus faibles que celles susceptibles d'être présentes dans le régime alimentaire humain. En outre, la valeur nutritionnelle et l'équilibre des régimes alimentaires utilisés sont des éléments importants que doivent prendre en considération les études sur les animaux de manière à prévenir l'induction d'effets néfastes étrangers au matériau lui-même. Par conséquent, la détection de tout effet néfaste potentiel et son imputabilité à une caractéristique particulière de l'aliment est extrêmement difficile. Si la caractérisation de l'aliment démontre que les données disponibles sont insuffisantes pour permettre d'effectuer une évaluation exhaustive de la sécurité sanitaire, des études expérimentales chez l'animal, conçues de manière adéquate, pourront être exigées pour les aliments entiers. Un autre point à prendre en compte, pour décider de la nécessité d'effectuer des études sur les animaux, est de 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.

14. Les études effectuées sur les animaux et servant aux évaluations toxicologiques ne peuvent pas non plus s'appliquer automatiquement à l'évaluation des risques potentiels que présente l'ingestion de microorganismes utilisés dans la production alimentaire. Les microorganismes sont des entités vivantes, composés de structure complexe formée de beaucoup de substances biochimiques. Par conséquent, ils ne peuvent être comparés à des substances pures. Dans le cas de certains aliments transformés, les microorganismes peuvent survivre à la transformation et à l'ingestion du produit alimentaire et peuvent entrer en compétition avec d'autres microorganismes, voire même s'implanter dans le

⁵ Il est reconnu que, dans un avenir prévisible, les microorganismes dérivés des biotechnologies modernes ne seront pas utilisés comme produits traditionnels de référence.

milieu intestinal sur des périodes de temps considérables. Des études animales appropriées devraient être utilisées pour évaluer la sécurité sanitaire de microorganismes à ADN recombiné, lorsque les antécédents du donneur, ou du gène ou du produit génique n'ont pas montré que leur utilisation était sûre, compte tenu des informations disponibles concernant le donneur et la caractérisation du matériel génétiquement modifié et du produit génique. En outre, des études animales conçues de manière adéquate pourront être utilisées pour évaluer la valeur nutritionnelle de l'aliment ou la biodisponibilité de la nouvelle substance exprimée dans l'aliment.

15. 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 produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné requiert une approche plus ciblée. C'est l'objectif visé par l'élaboration d'une approche pluridisciplinaire en matière d'évaluation de la sécurité sanitaire qui tient compte de l'effet prévu, de la nature de la modification ainsi que des changements involontaires identifiables, qui peuvent survenir dans le microorganisme ou de son action sur l'aliment, selon le concept d'*équivalence substantielle*.⁶

16. Alors que l'évaluation de la sécurité sanitaire portera principalement sur le microorganisme à ADN recombiné, les informations supplémentaires relatives à son interaction avec la matrice alimentaire devront être prises en compte lors de l'application du concept d'équivalence substantielle qui constitue une étape primordiale de l'évaluation de la sécurité sanitaire. Cependant, le concept d'équivalence substantielle ne constitue pas en soi une évaluation de la sécurité sanitaire, mais bel et bien le point de départ structurel de l'évaluation de la sécurité sanitaire liée à la fois à un microorganisme à ADN recombiné par rapport au produit traditionnel de référence et à l'aliment produit à l'aide du microorganisme à ADN recombiné par rapport au produit traditionnel de référence. Ce concept permet d'identifier pour évaluer les similitudes et les différences entre le microorganisme à ADN recombiné utilisé au cours de la transformation alimentaire ainsi que l'aliment produit à l'aide de microorganismes à ADN recombiné et les produits traditionnels de référence respectifs tels que définis au paragraphe 9. Il facilite l'identification des problèmes potentiels de sécurité sanitaire et de nutrition et il est considéré comme la stratégie la plus appropriée pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné. Effectuée de cette façon, l'évaluation des risques ne peut garantir la sécurité sanitaire absolue du produit. Elle vise plutôt à évaluer la sécurité de toute différence observée, afin de pouvoir comparer la sécurité sanitaire du microorganisme à ADN recombiné et l'aliment produit à l'aide du microorganisme à ADN recombiné à celle de leurs produits traditionnels de référence respectifs.

EFFETS NON INTENTIONNELS

17. En cherchant à conférer un caractère donné (effet intentionnel) à un microorganisme par addition, substitution, élimination ou réarrangement des séquences de l'ADN donné, y compris celles utilisées à des fins de transfert ou de maintien de l'ADN dans un organisme receveur, il se peut dans certains cas que des caractères supplémentaires soient acquis ou que des caractères existants disparaissent ou soient modifiés. Les possibilités que de tels effets non intentionnels se produisent ne se limitent pas aux techniques de manipulation *in vitro* des acides nucléiques. Il s'agit plutôt d'un phénomène général inhérent qui peut se produire lors du développement de souches à l'aide de techniques et procédures génétiques traditionnelles ou à la suite de l'exposition de microorganismes à des pressions de sélection provoquées ou accidentelles. Les effets non intentionnels peuvent être délétères, bénéfiques ou neutres quant à la compétition avec les autres microorganismes, l'adaptation écologique du microorganisme, les effets du microorganisme sur la santé humaine après ingestion ou la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide du microorganisme. Les effets non intentionnels peuvent également se produire au sein des microorganismes à ADN recombiné lors de la modification intentionnelle ou de la recombinaison des séquences de l'ADN ou de toute autre évènement naturel survenant dans le microorganisme à ADN recombiné. L'évaluation de la sécurité sanitaire devrait inclure les données et les informations pour réduire la possibilité qu'un aliment dérivé d'un microorganisme à ADN recombiné ait un effet néfaste imprévu sur la santé humaine.

18. Des effets non intentionnels peuvent également se produire à la suite de l'insertion de séquences ADN étrangères à un microorganisme dans le génome microbien. Elles pourront être comparées à celles observées lors de l'activité d'éléments génétiques transposables se produisant naturellement. L'insertion d'ADN peut modifier l'expression des gènes du génome chez le receveur. L'insertion d'ADN provenant de sources hétérologues dans un gène peut également provoquer la synthèse d'une protéine chimérique, également désignée sous l'appellation de protéine fusion. En outre, il faut tenir compte de l'instabilité génétique et de ses répercussions.

19. Des effets non intentionnels peuvent également entraîner la formation de nouveaux profils métaboliques ou la modification des profils existants. À titre d'exemple, l'expression d'enzymes à de fortes concentrations ou l'expression

⁶ Le concept d'*équivalence substantielle* tel que décrit par la Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies - Aspects de la sécurité des végétaux génétiquement modifiés, 29 mai – 2 juin 2000, Genève (Suisse) et la section 4.3 du document de la Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies - Évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de microorganismes génétiquement modifiés, 24 -28 septembre 2001, Genève (Suisse).

d'une enzyme nouvelle pour l'organisme peut provoquer des réactions biochimiques secondaires et modifier la régulation des voies métaboliques ou les concentrations de métabolites.

20. Les effets non intentionnels imputables à la modification génétique peuvent être répartis en deux groupes: ceux dits prévisibles et ceux dits « inattendus ». Beaucoup d'effets non intentionnels sont dans la plupart des cas prévisibles, car ils sont liés à la connaissance du caractère ajouté, aux conséquences métaboliques ou au site d'insertion. Il devrait être de plus en plus facile de prévoir les effets non intentionnels d'une modification donnée, compte tenu de l'accroissement de nos connaissances en matière de génomes microbiens et de physiologie microbienne ainsi que de la spécificité accrue de la fonction du matériel génétique introduit par l'entremise des techniques d'ADN recombiné par rapport aux autres formes de manipulation génétique. Des techniques de biologie et de biochimie moléculaires peuvent également être utilisées pour analyser les changements qui interviennent au niveau de la transcription et de la traduction génétiques et qui peuvent conduire à des effets non intentionnels.

21. L'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné fait appel à des méthodes précises pour identifier et détecter ces effets non intentionnels ainsi qu'à certaines procédures pour évaluer leur pertinence biologique et les impacts potentiels sur la sécurité sanitaire des aliments. Étant donné qu'aucun test individuel ne permet de détecter l'ensemble des effets non intentionnels ou d'identifier avec certitude les effets qui sont pertinents en matière de santé humaine, des données et informations variées sont requises pour évaluer ces effets non intentionnels. Ces données et informations, prises dans leur globalité, devraient confirmer qu'il est peu probable que l'aliment ait des effets néfastes sur la santé humaine. L'évaluation des effets non intentionnels doit tenir compte des caractéristiques biochimiques et physiologiques du microorganisme qui sont habituellement sélectionnées à des fins d'amélioration des souches utilisées pour la production de boissons et d'aliments vendus dans le commerce. Ce processus de détermination constitue le premier tri des microorganismes qui présentent des caractères non intentionnels. Les microorganismes à ADN recombiné qui franchissent cette première sélection seront ensuite soumis à une évaluation de la sécurité sanitaire, telle que décrite dans la section 4.

CADRE DE L'ÉVALUATION DE LA SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

22. L'évaluation de la sécurité sanitaire d'un aliment produit à l'aide d'un microorganisme à ADN recombiné repose sur l'évaluation de la sécurité sanitaire que présente l'utilisation dudit microorganisme en fonction d'un processus par étape au cours duquel les facteurs pertinents suivants sont examinés:

- A) La description du microorganisme à ADN recombiné;
- B) la description du microorganisme receveur et son utilisation dans la production alimentaire;
- C) la description du (ou des) organisme(s) donneur(s);
- D) la description de la (ou des) modification(s) génétique(s), y compris le vecteur et la construction;
- E) la caractérisation de la (ou des) modification(s) génétique(s);
- F) l'évaluation de la sécurité sanitaire:
 - a. des substances exprimées: évaluation de la toxicité potentielle et autres caractéristiques associées à la pathogénicité;
 - b. analyse de la composition des composants clés;
 - c. évaluation des métabolites;
 - d. effets sur le processus d'élaboration des aliments;
 - e. évaluation des réactions immunologiques;
 - f. évaluation de la viabilité et de la persistance de microorganismes dans le tractus gastro-intestinal humain;
 - g. résistance aux antibiotiques et transfert de gènes; et,
 - h. modification nutritionnelle.

23. Dans certains cas, les caractéristiques des microorganismes et/ou des aliments produits/transformés à l'aide de ces microorganismes rendront nécessaire la génération de données et d'informations supplémentaires, afin de répondre aux questions propres aux microorganismes et/ou produits alimentaires étudiés.

24. Les expériences prévues pour obtenir des données utiles aux évaluations de la sécurité sanitaire devraient être conçues et effectuées en fonction de concepts et de principes scientifiques objectifs ainsi que, lorsque cela est approprié, de bonnes pratiques de laboratoire. Les autorités chargées de la réglementation devraient avoir accès sur demande aux données essentielles. Les données devraient être obtenues par l'entremise de méthodes scientifiques objectives et analysées par le biais de techniques statistiques appropriées. La sensibilité de chaque méthode d'analyse devrait être consignée.

25. Toute évaluation de la sécurité sanitaire a pour but de démontrer, à la lumière des plus récentes connaissances scientifiques disponibles, que l'aliment n'aura pas d'effets néfastes lorsqu'il est préparé ou consommé conformément à l'utilisation prévue, pas plus que l'organisme lui-même n'aura d'effets néfastes lorsque des organismes vivants demeurent présents au sein de cet aliment. Les évaluations de la sécurité devraient cibler les aspects sanitaires qui touchent l'ensemble de la population, y compris les personnes immunodéprimées, les enfants et les personnes âgées. L'objectif souhaité de ce type d'évaluation devrait être de déterminer si les nouveaux aliments et/ou microorganismes sont aussi sûrs que le produit traditionnel de référence en tenant compte de l'impact sur le régime alimentaire de tous les changements sur l'équilibre ou la valeur nutritionnels. Lorsqu'il est probable que le microorganisme soit vivant au moment de l'ingestion, la sécurité de celui-ci devrait être comparée à celle du produit traditionnel de référence en tenant compte de la persistance du microorganisme à ADN recombiné dans le tractus gastro-intestinal et, le cas échéant, des interactions de celui-ci avec la flore gastro-intestinale des mammifères (en particulier des humains) et des impacts du microorganisme sur le système immunitaire. Par nature, l'objectif du processus d'évaluation de la sécurité sanitaire est de définir le produit à l'étude de manière à ce que les gestionnaires des risques puissent déterminer si des mesures doivent être appliquées pour protéger la santé des consommateurs et, dans l'affirmative, prendre à cet égard des décisions claires et appropriées.

SECTION 4 - CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

DESCRIPTION DU MICROORGANISME À ADN RECOMBINÉ

26. Il convient de fournir une description de la souche de bactéries, de levures ou de champignons ainsi que de l'aliment soumis à une évaluation de la sécurité sanitaire. Cette description devrait être suffisante pour aider à comprendre la nature de l'organisme ou de l'aliment produit en utilisant l'organisme faisant l'objet d'une évaluation de la sécurité sanitaire. Les microorganismes à ADN recombiné utilisés dans la production alimentaire ou contenus dans des aliments devraient être déposés comme cultures souches avec une identification appropriée grâce à des méthodes moléculaires, si possible dans des collections de culture établies. Cela pourrait faciliter l'examen de l'évaluation initiale de la sécurité. De telles cultures souches devraient être mises à la disposition des autorités réglementaires sur demande.

DESCRIPTION DU MICROORGANISME RECEVEUR ET SON UTILISATION DANS LA PRODUCTION ALIMENTAIRE

27. Il convient de fournir une description exhaustive du microorganisme receveur ou du microorganisme qui sera modifié. Les microorganismes receveurs devraient présenter un historique d'une utilisation sûre pour la production d'aliments ou que sa consommation alimentaire est sûre. Les organismes qui produisent des toxines, des antibiotiques ou autres substances qui ne devraient pas être présentes dans les aliments, ou qui comportent des éléments génétiques susceptibles de favoriser l'instabilité génétique, la résistance aux antibiotiques ou qui sont susceptibles de contenir des gènes porteurs de fonctions génératrices de pathogénicité (c'est-à-dire des gènes également réputés être des vecteurs pathogènes ou portant des facteurs de virulence) ne devraient pas être utilisés comme receveurs. Les données et informations requises devraient inclure, mais sans s'y limiter, les éléments suivants:

- A) identité: le nom scientifique, le nom usuel ou tout autre(s) nom(s) servant à désigner le microorganisme, la désignation de la souche, les informations relatives à la souche et à sa source, ou les numéros d'enregistrement ainsi que toute autre information provenant d'une collection de culture reconnue à partir de laquelle l'organisme ou ses antécédents peuvent être obtenus, et le cas échéant, les informations confirmant sa situation taxonomique;
- B) l'historique de son utilisation et de sa culture, les informations connues sur le développement de souches (y compris l'isolement des mutations ou des souches antérieures utilisées pour la construction de la souche); plus particulièrement l'identification des caractères susceptibles d'avoir des effets néfastes sur la santé humaine;
- C) les informations relatives au génotype et au phénotype du microorganisme receveur en rapport avec sa sécurité, y compris toutes toxines connues, antibiotiques, facteurs de résistance aux antibiotiques et autres facteurs reliés à la pathogénicité ou aux effets immunologiques, et les informations relatives à la stabilité génétique du microorganisme;
- D) des antécédents démontrant une utilisation sûre pour la production alimentaire ou une consommation sûre lorsqu'il est présent dans les aliments; et
- E) les informations relatives aux paramètres de production pertinents utilisés pour la culture du microorganisme receveur.

28. Les informations pertinentes concernant le génotype et le phénotype devraient être fournies non seulement pour le microorganisme receveur, mais aussi pour les espèces apparentées et pour tout autre(s) élément(s) génétique(s) extrachromosomique(s) qui contribue(nt) aux fonctions de la souche receveuse, surtout lorsque des espèces apparentées sont utilisées dans les aliments ou lorsqu'elles ont des effets pathogènes sur les humains ou sur les animaux. Il convient

de tenir compte des informations relatives à la stabilité génétique du microorganisme receveur, y compris, le cas échéant, la présence d'éléments mobiles d'ADN, c'est-à-dire de séquences d'insertion, de transposons, de plasmides et de prophages.

29. Les antécédents en matière d'utilisation peuvent contenir certaines informations sur la manière dont le microorganisme receveur est habituellement cultivé, sur son transport et son stockage, sur les mesures d'assurance qualité habituellement appliquées, y compris celles servant à vérifier l'identité de la souche et les critères de production pour les microorganismes et les aliments, ainsi que des informations qui indiquent si ces organismes demeurent vivants au sein de l'aliment transformé ou s'ils sont éliminés ou rendus non viables à la suite de leur élaboration.

DESCRIPTION DU OU DES ORGANISME(S) DONNEUR(S)

30. Des informations devraient être fournies sur le (ou les) organisme(s) donneur(s) ainsi que, si cela est applicable, sur tout autre(s) organisme(s) intermédiaire(s), et lorsque cela est pertinent, sur les organismes apparentés. Il importe plus particulièrement de déterminer si le (ou les) organisme(s) donneur(s) ou intermédiaire(s), ou toute autre espèce étroitement apparentée présente de manière naturelle des caractères pathogènes ou de production de toxines, ou toute autre caractéristique pouvant affecter la santé humaine. La description du (ou des) organisme(s) donneur(s) ou intermédiaire(s) devrait inclure les éléments suivants:

- A) identité: le nom scientifique, le nom usuel ou tout autre nom servant à désigner le microorganisme, la désignation de la souche, les informations relatives à la souche et à sa source, ou les numéros d'enregistrement ainsi que toute autre information provenant d'une collection de culture reconnue à partir de laquelle l'organisme et ses antécédents pourraient être obtenus, et le cas échéant, les informations confirmant sa situation taxonomique;
- B) les informations relatives à l'organisme ou aux organismes apparentés qui relèvent de la sécurité sanitaire de l'aliment;
- C) les informations relatives au génotype et au phénotype du microorganisme en rapport avec sa sécurité, y compris toute toxine connue et autres facteurs reliés à la pathogénicité ou aux effets immunologiques;
- D) les informations relatives aux utilisations antérieures et actuelles, s'il en est, dans la chaîne alimentaire et aux voies d'exposition autres que l'utilisation alimentaire prévue (par exemple, sa présence éventuelle en tant que contaminants).

DESCRIPTION DE LA (OU DES) MODIFICATION(S) GÉNÉTIQUE(S), Y COMPRIS DU VECTEUR ET DE LA CONSTRUCTION GÉNÉTIQUES

31. Il convient de fournir suffisamment d'informations sur la (ou les) modification(s) génétique(s), afin de permettre l'identification de tout matériel génétique qui sera éventuellement introduit ou modifié dans le microorganisme receveur. Il convient également de fournir les informations nécessaires à l'analyse des données à l'appui de la caractérisation de l'ADN ajouté, inséré, modifié ou éliminé au sein du génome microbien.

32. La description du procédé de construction de la souche devrait inclure les éléments suivants:

- A) les informations relatives à la (ou aux) méthode(s) utilisée(s) pour la modification génétique;
- B) les informations relatives à l'ADN utilisé pour modifier le microorganisme, y compris la source (par exemple, végétale, microbienne, virale ou synthétique), l'identité et la fonction prévue du microorganisme à ADN recombiné, le nombre de copies pour les plasmides; et
- C) les organismes receveurs intermédiaires y compris les organismes (par exemple, autres bactéries ou champignons) utilisés pour produire ou transformer l'ADN avant l'introduction au sein de l'organisme receveur final.

33. Il convient de fournir des informations sur l'ADN ajouté, inséré, éliminé ou modifié, notamment:

- A) la caractérisation de tous les éléments génétiques, y compris les gènes marqueurs, les vecteurs et les éléments régulateurs ou autres qui modifient la fonction de l'ADN;
- B) la taille et l'identité;
- C) la localisation et orientation de la séquence dans le vecteur/construction finale; et
- D) la fonction.

CARACTÉRISATION DE LA OU DES MODIFICATIONS GÉNÉTIQUES

34. Afin de mieux faire comprendre l'impact des modifications génétiques sur la composition et la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné, il convient d'effectuer une caractérisation moléculaire et biochimique exhaustive de la modification génétique. L'ADN qui doit être inséré devrait être limité de préférence aux séquences nécessaires pour remplir les fonctions voulues, afin de faciliter l'évaluation de la sécurité sanitaire.

35. Il convient de fournir des informations sur les modifications de l'ADN au sein du microorganisme à ADN recombiné. Ces informations devraient être les suivantes:

- A) la caractérisation et la description des matériels génétiques ajoutés, insérés, éliminés ou autrement modifiés, y compris les plasmides ou autres vecteurs d'ADN utilisés pour le transfert des séquences génétiques ciblées. Cela devrait inclure l'analyse du potentiel de mobilisation de tout plasmide ou autre élément génétique utilisé, la localisation du matériel génétique ajouté, inséré, éliminé ou autrement modifié (localisation chromosomique ou extrachromosomique); le nombre de copies du plasmide si le matériel inséré est situé sur un plasmide multicopie;
- B) le nombre de sites d'insertion;
- C) l'organisation du matériel génétique modifié à chaque site d'insertion, y compris le nombre de copies et les séquences du matériel inséré, modifié ou supprimé, des plasmides ou autres vecteurs d'ADN utilisés pour transférer les séquences génétiques ciblées, et les séquences avoisinantes. Ces informations permettront d'identifier toute substance exprimée résultant du matériel inséré, modifié ou supprimé;
- D) l'identification de tout cadre de lecture ouvert dans la séquence d'ADN insérée ou créée par les modifications de l'ADN contigu sur le chromosome ou le plasmide, y compris ceux qui pourraient entraîner l'émergence des protéines fusion; et
- E) une référence particulière à toute(s) séquence(s) connue(s) susceptible(s) de coder ou d'influencer l'expression des fonctions potentiellement dangereuses.

36. Il convient également de fournir des informations sur toutes les substances exprimées au sein d'un microorganisme à ADN recombiné. Lorsque cela est approprié, ces informations seront les suivantes:

- A) le(s) produit(s) du gène (par exemple, une protéine ou un ARN non traduit) ou toute autre information telle que l'analyse des transcripts ou produits d'expression, afin d'identifier les nouvelles substances susceptibles d'être présentes dans l'aliment;
- B) la fonction du (ou des) produit(s) du gène;
- C) la description phénotypique du ou des nouveaux caractères;
- D) le niveau et le site d'expression (intracellulaire, périplasmique – dans les organites pour les bactéries Gram négatif – sécrété pour les microorganismes eucaryotes) du (ou des) produit(s) du gène exprimé(s) et, s'il y a lieu, les concentrations de ses métabolites au sein de l'organisme;
- E) la quantité du (ou des) produit(s) du (ou des) gène(s) inséré(s) si la fonction de la (ou des) séquence(s) exprimée(s) ou gène(s) exprimé(s) consiste à modifier le niveau d'un ARN messager ou d'une protéine endogène spécifique; et
- F) l'absence d'un produit de gène ou, de métabolites de dégradation du produit de gène, si cela est applicable à la (ou aux) fonction(s) attendue(s) de la (ou des) modification(s) génétique(s).

37. En outre, il convient de fournir les informations qui permettront:

- A) de démontrer si la réorganisation du matériel génétique modifié a été préservée⁷ ou si des réarrangements significatifs se sont produits après l'introduction dans la cellule et la multiplication de la souche recombinante aux seules fins des utilisations prévues en matière de production alimentaire, y compris ceux qui peuvent survenir durant le stockage conformément aux techniques actuelles;
- B) de démontrer si les modifications délibérées apportées à la séquence d'acides aminés de la protéine exprimée ont une incidence sur la modification post-traductionnelle ou sur les sites qui jouent un rôle fondamental au niveau de sa structure ou de sa fonction;

⁷ Les génomes microbiens sont plus fluides que ceux d'eucaryotes supérieurs, c'est-à-dire que les organismes se développent plus rapidement, s'adaptent aux changements environnementaux et sont plus aptes à subir des modifications. Les réarrangements chromosomiques sont répandus. La plasticité génétique générale des microorganismes peut avoir une incidence sur l'ADN recombiné des microorganismes et doit être prise en compte lors de l'évaluation de la stabilité des microorganismes à ADN recombiné.

- C) de démontrer si l'effet prévu de la modification s'est concrétisé et que tous les caractères exprimés sont exprimés et hérités de manière stable tout au long des cycles de multiplication requis pour la ou les utilisations prévues dans le domaine de la production alimentaire et sont conformes aux lois de l'hérédité. Il peut être nécessaire d'étudier l'hérédité de l'ADN inséré ou modifié ou l'expression de l'ARN correspondant si les caractéristiques phénotypiques ne peuvent pas être mesurées directement⁸ ;
- D) de démontrer si le ou les nouveaux caractères s'expriment de la manière prévue et qu'ils ciblent les sites cellulaires appropriés ou sont sécrétés à des niveaux et de manière conformes aux séquences régulatrices associées qui gouvernent l'expression du gène correspondant;
- E) d'indiquer si oui ou non des éléments permettent de supposer qu'un ou plusieurs gènes du microorganisme receveur ont été affectés par les modifications ou par le processus d'échange génétique; et
- F) de confirmer l'identité et le profil d'expression de toute nouvelle protéine fusion.

ÉVALUATION DE LA SÉCURITÉ SANITAIRE

38. L'évaluation de la sécurité sanitaire du microorganisme modifié devrait être effectuée au cas par cas, selon la nature et l'ampleur des changements introduits. Les études toxicologiques conventionnelles peuvent ne pas être nécessaires lorsque la substance ou une substance étroitement apparentée a, compte tenu de sa fonction et de l'exposition, été consommée de manière sûre dans un aliment. Les effets des microorganismes à ADN recombiné sur la matrice alimentaire devraient être pris en compte. Si la caractérisation de l'aliment démontre que les données disponibles sont insuffisantes pour permettre d'effectuer une évaluation exhaustive de la sécurité, des études expérimentales chez l'animal ou *in vitro* avec le microorganisme à ADN recombiné et/ou l'aliment produit à l'aide de celui-ci, conçues de façon appropriée, pourraient s'avérer nécessaires.

Substances exprimées: évaluation de la toxicité potentielle et autres caractéristiques relatives à la pathogénicité

39. Quand il s'agit d'introduire une nouvelle substance au sein d'un aliment ou du processus de transformation alimentaire, il faut recourir aux études toxicologiques conventionnelles ou autres études applicables concernant cette substance. Cela peut impliquer l'isolement de la nouvelle substance à partir du microorganisme à ADN recombiné, du produit alimentaire si la substance est sécrétée, voire même la synthèse ou la production de la substance à partir d'une autre source si nécessaire. Dans ce dernier cas, il conviendra de démontrer que la substance est équivalente à celle produite par le microorganisme à ADN recombiné sur le plan structurel, fonctionnel et biochimique. Il convient aussi de fournir des informations sur l'exposition prévue des consommateurs à cette substance, l'ingestion potentielle et l'impact éventuel de la substance sur le régime alimentaire.

40. L'évaluation de la sécurité sanitaire de la substance exprimée devrait tenir compte de sa fonction et de sa concentration au sein de l'aliment. La quantité de microorganismes vivants qui demeurent présents dans l'aliment devrait également être déterminée et comparée au produit traditionnel de référence. Les mesures quantitatives devraient être analysées à l'aide des techniques statistiques appropriées. L'évaluation devra également tenir compte de l'exposition par le régime alimentaire courante et des effets potentiels sur les sous-groupes de la population.

- En ce qui concerne les protéines, l'évaluation de la toxicité potentielle devrait tenir compte de la structure et de la fonction de la protéine et être axée sur les similitudes entre les séquences d'acides aminés de la protéine d'une part, et des toxines protéiques et des composés antinutritionnels (par exemple, les inhibiteurs de protéase et les sidérophores) connus d'autre part, ainsi que sur leur stabilité à la chaleur ou au processus de transformation et à la dégradation, dans des modèles gastriques et intestinaux de simulation représentatifs des conditions gastriques et intestinales. Lorsque la consommation d'une protéine présente dans un aliment n'a jamais été démontrée comme étant sûre et que cette protéine ne présente pas une similitude étroite avec des protéines dont la consommation s'est révélée sûre, il convient d'effectuer des études pertinentes de toxicité par voie orale⁹ en tenant compte de sa fonction biologique dans les microorganismes, si celle-ci est connue.
- La toxicité éventuelle des substances non protéiques, qui n'ont pas déjà été consommées de manière sûre, devrait être évaluée au cas par cas en fonction de l'identité, de la concentration et de la fonction biologique de la substance, ainsi que selon le régime alimentaire. Parmi les différentes études qu'il conviendrait d'effectuer, notons les évaluations relatives au métabolisme, à la toxicocinétique, à la toxicité chronique et à la cancérogénicité, aux effets sur la fonction reproductrice et à la tératogénicité.

⁸ Les souches modifiées devraient être maintenues de façon à permettre la vérification de la stabilité génétique.

⁹ Des directives pour les études de toxicité par voie orale ont été élaborées dans différentes instances internationales, par exemple, les directives de l'OCDE pour les essais des substances chimiques.

41. Il conviendrait de démontrer que les nouvelles propriétés exprimées ou les propriétés modifiées ne sont apparentées à aucune caractéristique des organismes donneurs susceptibles d'avoir des effets néfastes sur la santé. Des informations devraient être fournies pour s'assurer que les gènes codant des toxines connues ou des facteurs antinutritionnels que l'on sait présents dans les organismes donneurs ne sont pas transférés aux microorganismes à ADN recombiné qui, en général, n'expriment pas de telles caractéristiques toxiques ou antinutritionnelles.

- Des études *in vivo* ou *in vitro* supplémentaires pourraient être requises, au cas par cas, pour évaluer la toxicité des substances exprimées, en tenant compte de l'accumulation potentielle de l'une ou l'autre de ces substances, des métabolites toxiques ou des antibiotiques qui pourraient résulter de la modification génétique.

Analyses de la composition des éléments clés

42. Les analyses des concentrations des éléments clés¹⁰ contenus dans les aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné devraient être comparées à des analyses équivalentes effectuées sur un produit traditionnel de référence produits dans des conditions similaires. La significativité statistique de toute différence observée devrait être évaluée en fonction de la fourchette naturelle de variation associée à ce paramètre afin d'en déterminer l'importance biologique. Le ou les référentiels utilisés dans le cadre de cette évaluation devrait idéalement être un aliment produit à partir d'une lignée parentale la plus proche de l'isogénie. Effectuée si nécessaire conjointement avec une évaluation de l'exposition, cette comparaison vise à démontrer que les substances susceptibles d'avoir une incidence sur la sécurité sanitaire de l'aliment n'ont pas été modifiées de telle sorte qu'il pourrait avoir des effets néfastes sur la santé humaine.

Évaluation des métabolites

43. Certains microorganismes à ADN recombiné peuvent être modifiés de manière à obtenir de nouvelles concentrations ou des concentrations modifiées des différents métabolites présents dans les aliments produits à l'aide de ces microorganismes. En présence de concentrations modifiées de métabolites dans les aliments, il importe de tenir compte des impacts potentiels sur la santé humaine associés à l'utilisation de procédures conventionnelles lors de l'établissement de la sécurité des métabolites (par exemple, les procédures pour évaluer la sécurité pour l'homme des produits chimiques utilisés dans les aliments).

44. Les nouvelles concentrations ou les concentrations modifiées de métabolites produits par le microorganisme à ADN recombiné peuvent modifier la population de microorganismes en culture mixte et éventuellement accroître les probabilités de développement d'organismes dangereux ou d'accumulation de substances nocives. Les effets potentiels de la modification génétique d'un microorganisme sur les autres microorganismes devraient être évalués lors de l'utilisation d'une culture mixte de microorganismes dans la production alimentaire, notamment dans le cas de production de fromage naturel, de miso, de sauce au soja, etc.

Les effets de la transformation des aliments

45. Il importe également de tenir compte des effets potentiels de la transformation des aliments, y compris de la préparation à domicile, sur les aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné. À titre d'exemple, des changements pourraient survenir au niveau de la stabilité thermique d'une substance toxique endogène ou de la biodisponibilité d'un nutriment important à la suite de la transformation. Des informations devraient, par conséquent, être fournies sur les conditions de production d'un aliment. Par exemple, dans le cas du yaourt, des informations devraient être fournies sur la croissance de l'organisme et sur les conditions de culture.

Évaluation des effets immunologiques

46. Le potentiel allergène de toute protéine résultant de l'insertion d'un gène et présente dans l'aliment devrait être évalué. Il convient d'analyser les probabilités que des personnes soient d'ores et déjà sensibles à la protéine et d'évaluer si une protéine nouvellement introduite dans la chaîne alimentaire provoquera ou non des réactions allergiques. Une présentation détaillée des questions, qui devraient être prises en compte, est donnée dans l'appendice de cette directive.

¹⁰ Les nutriments ou anti-nutriments clés sont parmi les constituants d'un aliment donné, ceux qui sont susceptibles d'avoir un impact considérable sur l'ensemble du régime alimentaire. Ils peuvent être des constituants nutritionnels majeurs (lipides, protéines, glucides), des inhibiteurs d'enzymes agissant à titre d'anti-nutriments, ou des composés mineurs (minéraux, vitamines). Les principaux facteurs toxiques sont les composés toxicologiquement importants que l'on sait produits par le microorganisme, tels que les composés dont le potentiel toxique et la concentration peuvent avoir une incidence sur la santé. Les microorganismes traditionnellement utilisés dans le cadre de la transformation d'aliments ne sont pas réputés produire de tels composés dans des conditions normales de production.

47. Il faut partir du principe que les gènes dérivés de sources allergéniques connues codent pour un allergène, et qu'il faut donc les éviter, à moins qu'il ne soit prouvé scientifiquement que ce n'est pas le cas. Le transfert de gènes provenant d'organismes connus pour induire l'entéropathie de sensibilité au gluten chez les sujets sensibles devrait être découragé, à moins que ne soit documenté le fait que le gène en question ne code pas pour un allergène ou pour une protéine impliquée dans l'entéropathie de sensibilité au gluten.

48. Les microorganismes à ADN recombiné qui demeurent vivants dans les aliments peuvent interagir avec le système immunitaire au niveau du tractus gastro-intestinal. Ces interactions seront analysées de manière plus approfondie en fonction de la nature des différences entre le microorganisme à ADN recombiné et le produit traditionnel de référence.

Évaluation de la viabilité et de la persistance des microorganismes dans le tractus gastro-intestinal humain

49. Pour certains aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné, l'ingestion de ces microorganismes et leur persistance¹¹ peuvent avoir un impact sur le tractus intestinal humain. La présence de produits traditionnels de référence dans les aliments et la nature des effets intentionnels et non intentionnels des modifications génétiques dicteront la nécessité de recourir à des essais plus approfondis sur ces microorganismes. Si la transformation du produit alimentaire final élimine les microorganismes vivants (par exemple, par traitement thermique lors de la cuisson du pain) ou si l'accumulation de produits finaux toxiques pour le microorganisme (tel que l'alcool ou des acides) empêche la viabilité, il ne sera pas nécessaire d'étudier la viabilité et la persistance des microorganismes au sein du système alimentaire.

50. En ce qui concerne les applications pour lesquelles les microorganismes à ADN recombiné utilisés au cours de la production alimentaire demeurent vivants dans le produit alimentaire final, (par exemple les organismes présents dans certains produits laitiers), il serait souhaitable de démontrer la viabilité (ou la durée de résidence) du microorganisme seul et dans la matrice alimentaire respective dans le système digestif et l'impact sur la microflore intestinale par des systèmes appropriés. La nature des effets souhaités ou non intentionnels et l'importance des différences par rapport au produit de référence détermineront l'ampleur de ces essais.

RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET TRANSFERT DE GÈNES

51. En général, les souches traditionnelles de microorganismes développées à des fins de transformation des aliments n'ont pas fait l'objet d'une évaluation de leur résistance aux antibiotiques. Plusieurs microorganismes utilisés en production alimentaire possèdent une résistance intrinsèque à des antibiotiques précis. De telles propriétés n'excluent pas que ces souches puissent être utilisées comme receveuses lors de la construction de microorganismes à ADN recombiné. Toutefois, les souches dans lesquelles la résistance aux antibiotiques est codée par des éléments géniques transmissibles ne devraient pas être utilisées lorsque ces souches et ces éléments géniques sont présents dans l'aliment final. Toute indication de la présence de plasmides, de transposons et d'intégrons contenant de tels gènes de résistance aux antibiotiques devrait être prise en compte de manière spécifique.

52. Pour la sélection de microorganismes à ADN recombiné, il convient d'utiliser d'autres technologies dont la sécurité sanitaire a été démontrée et qui ne reposent pas sur les gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques de microorganismes vivants et présents dans les aliments. En général, l'utilisation de marqueurs de résistance aux antibiotiques à des fins de construction de souches intermédiaires ne devrait pas présenter de dangers sérieux susceptibles d'empêcher l'utilisation des souches idéales pour la production d'aliments, à la condition toutefois que les gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques aient été éliminés de la construction finale.

53. Le transfert de plasmides et de gènes entre la microflore intestinale résidente et les microorganismes à ADN recombiné ingérés peut survenir. Il faut également tenir compte de la possibilité que se produise le transfert de gènes de microorganismes à ADN recombiné et des produits alimentaires dérivés de microorganismes à ADN recombiné aux microorganismes présents dans l'intestin ou dans les cellules humaines, ainsi que des répercussions d'un tel transfert. Il est peu probable que l'ADN transféré se maintienne en l'absence de pression de sélection. Toutefois, on ne peut pas totalement écarter la possibilité que de tels événements se produisent.

54. Afin de minimiser les risques de transfert génétique, les étapes suivantes devraient être envisagées:

A) l'intégration chromosomique du matériel génétique inséré est préférable à l'intégration au sein d'un plasmide;

¹¹ La colonisation permanente à long terme de microorganismes ingérés est une occurrence rare. Certains micro-organismes administrés par voie orale ont été retrouvés dans les matières fécales ou dans la muqueuse du côlon plusieurs semaines après interruption de l'alimentation. Que le microorganisme génétiquement modifié soit ou non établi dans le tractus gastro-intestinal, il reste possible qu'il puisse influencer la microflore ou l'hôte mammifère. (Consultation mixte FAO/OMS sur les aliments dérivés des biotechnologies – *Évaluation de la sécurité des aliments dérivés de microorganismes génétiquement modifiés*, 24-28 septembre, 2001, Genève (Suisse).

- B) lorsque le microorganisme à ADN recombiné demeure viable dans le tractus gastro-intestinal, il faudrait éviter d'utiliser dans l'hybridation génétique des gènes susceptibles d'offrir un avantage sélectif aux organismes receveurs auxquels le matériel génétique est transféré involontairement; et
- C) il convient d'éviter d'utiliser les séquences qui facilitent l'intégration dans d'autres génomes lors de la construction du matériel génétique introduit.

MODIFICATION NUTRITIONNELLE

55. L'évaluation de changements éventuels de la composition des principales substances nutritives, qui devrait être réalisée pour chaque aliment produit à l'aide de microorganismes à ADN recombiné, a déjà été abordée dans la section « *Analyses de la composition des éléments clés* ». Si de telles modifications ont été mises en œuvre, l'aliment devrait faire l'objet d'essais supplémentaires afin d'évaluer les répercussions de ces modifications et de déterminer si l'apport nutritionnel sera affecté ou non par l'introduction de ces aliments dans la chaîne alimentaire.

56. Les informations relatives aux modèles connus de l'utilisation et de la consommation d'un aliment et de ses dérivés devraient servir à évaluer l'ingestion potentielle de l'aliment produit à l'aide d'un microorganisme à ADN recombiné. L'ingestion prévue de cet aliment devrait à son tour être utilisée pour évaluer les implications sur le plan nutritionnel du nouveau profil nutritionnel à des niveaux de consommation moyen et maximal. Une estimation fondée sur le taux de consommation probable le plus élevé permettra de détecter tout effet nutritionnel néfaste potentiel. Il convient de porter une attention particulière aux caractéristiques physiologiques et aux exigences métaboliques particulières de certains groupes de populations tels que les enfants en bas âge, les enfants, les femmes enceintes et les femmes allaitantes, les personnes âgées et les personnes souffrant de maladies chroniques ou ayant un système immunitaire affaibli. Des évaluations nutritionnelles supplémentaires pourraient être nécessaires selon les résultats des analyses des impacts nutritionnels et les besoins alimentaires de groupes de populations particuliers. Il importe également de déterminer l'ampleur de la biodisponibilité de la substance nutritive modifiée et de sa stabilité au fil du temps ainsi qu'au cours de la transformation et du stockage.

57. L'utilisation de biotechnologies modernes pour modifier les concentrations de nutriments dans les aliments produits à l'aide de microorganismes pourrait entraîner de vastes changements au sein du profil nutritionnel. La modification délibérée du microorganisme pourrait modifier le profil nutritionnel global du produit et, par conséquent, affecter l'état nutritionnel des personnes qui consomment cet aliment. L'impact des modifications susceptibles d'affecter le profil nutritionnel global du produit devrait être déterminé.

58. Lorsque la modification donne naissance à un produit alimentaire dont la composition diffère considérablement de celle du produit traditionnel de référence, il conviendra d'utiliser d'autres aliments ou composants alimentaires traditionnels (c'est-à-dire des aliments dont la composition nutritionnelle se rapproche davantage de celle de l'aliment produit à l'aide d'un microorganisme à ADN recombiné) à titre de référentiels appropriés pour évaluer l'impact nutritionnel de l'aliment.

59. Certains aliments peuvent devoir être soumis à des essais supplémentaires. À titre d'exemple, des études d'alimentation sur les animaux peuvent être justifiées dans le cas d'aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné si l'on anticipe des changements au niveau de la biodisponibilité des substances nutritives ou si la composition des produits obtenus n'est pas comparable à celle des produits traditionnels. En outre, les aliments conçus à des fins diététiques pourront faire l'objet d'une évaluation qui dépasse le champ d'application de la présente directive, notamment des études nutritionnelles, toxicologiques ou autres spécifiques et appropriées. Si la caractérisation de l'aliment démontre que les données disponibles sont insuffisantes pour permettre d'effectuer une évaluation exhaustive de la sécurité, des études expérimentales chez l'animal, conçues de manière adéquate, pourront être exigées pour les aliments entiers.

RÉVISION DES ÉVALUATIONS DE LA SÉCURITÉ

60. L'objectif d'une évaluation de la sécurité sanitaire est de déterminer si l'aliment produit à l'aide d'un microorganisme à ADN recombiné est aussi sûr que le produit traditionnel de référence prenant en compte l'impact sanitaire de tous les changements dans le contenu ou la valeur nutritionnelle. Toutefois, l'évaluation de la sécurité sanitaire devra être révisée à la lumière des nouvelles informations scientifiques qui remettent en question les résultats de l'évaluation initiale de la sécurité.

APPENDICE : ÉVALUATION DE L'ALLERGÉNICITÉ POTENTIELLE

SECTION 1 – INTRODUCTION

1. Toute nouvelle protéine exprimée¹² produite par des microorganismes à ADN recombiné, qui pourrait être présente dans l'aliment final, devrait être évaluée sur le plan de son potentiel à générer des réactions allergiques. Ceci devrait conduire à examiner, si une protéine nouvellement exprimée correspond à l'une de celles auxquelles certaines personnes sont déjà sensibles, et si une protéine nouvelle dans l'apport alimentaire est susceptible d'induire des réactions allergiques chez certaines personnes.
2. Il n'existe pas pour le moment de méthodes définitives qui permettent de prédire la relation d'une réaction allergique chez l'homme avec une protéine nouvellement exprimée. En conséquence, pour évaluer l'allergénicité potentielle des protéines nouvellement exprimées, il est recommandé d'utiliser une approche au cas par cas, progressive et intégrée. Cette approche prend en compte les preuves provenant de différents types d'informations et de données, car aucun critère n'est à lui seul suffisamment prédictif.
3. Le résultat de l'évaluation est une conclusion quant à la probabilité que la protéine soit un allergène alimentaire.

SECTION 2 – STRATÉGIE D'ÉVALUATION

4. Les étapes initiales de l'évaluation de l'allergénicité possible de toute protéine nouvellement exprimée consistent à déterminer: l'origine de la protéine introduite, toute similarité significative entre la séquence d'acides aminés de la protéine et celle des allergènes connus, et ses propriétés structurales, y compris, sans s'y limiter, sa sensibilité à la dégradation enzymatique, et sa stabilité à la chaleur et /ou aux traitements enzymatique et acide.
5. Comme aucun test unique ne peut prédire la probabilité d'une réponse IgE humaine, suite à une exposition par voie orale, la première étape pour caractériser des protéines nouvellement exprimées devrait être la comparaison de la séquence d'acides aminés et certaines caractéristiques physicochimiques de la nouvelle protéine exprimée avec celles d'allergènes connus en suivant une méthode reposant sur le poids de la preuve. Cela nécessitera la purification de toutes protéines nouvellement exprimées produites par des microorganismes à ADN recombiné ou la synthèse ou la production de la substance à partir d'une autre source, auquel cas le matériel testé devrait être démontré comme équivalent sur le plan structurel, fonctionnel et biochimique à celui produit par des microorganismes à ADN recombiné. Une attention particulière devrait être portée sur le choix de l'hôte d'expression, puisque des modifications post-traductionnelles permises par des hôtes différents (c'est-à-dire les systèmes eucaryotiques *versus* les systèmes procaryotiques) peuvent avoir un impact sur le potentiel allergénique de la protéine.
6. Il est important d'établir si la source est connue pour provoquer des réactions allergiques. Les gènes dérivés de sources allergéniques connues devraient être présumés codants pour un allergène, à moins que des preuves scientifiques ne démontrent le contraire.

SECTION 3 – ÉVALUATION INITIALE

SECTION 3.1 – SOURCE DE LA PROTÉINE

7. En tant qu'élément des données étayant la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné, l'information devrait décrire tout cas d'allergénicité associé à l'organisme donneur. Les sources allergisantes de gènes seraient définies comme les organismes pour lesquels il existe une preuve raisonnable qu'ils causent des réactions allergiques médiées par les IgE suite à des expositions par la voie orale, respiratoire ou cutanée. La connaissance de la source de la protéine introduite permet l'identification des outils et des données pertinents à considérer pour l'évaluation de l'allergénicité. Ceux-ci comprennent: la disponibilité de sérums à des fins de criblage; le type, la gravité et la fréquence des réactions allergiques documentées; et les caractéristiques structurales et la séquence des acides aminés; les propriétés immunologiques et physicochimiques (lorsque disponibles) des protéines allergéniques connues provenant de cette source.

SECTION 3.2 – HOMOLOGIE DE LA SÉQUENCE D'ACIDES AMINÉS

8. L'objectif de la comparaison des homologies de séquence est d'évaluer à quel point la structure d'une protéine nouvellement exprimée est similaire à celle d'un allergène connu. Cette information peut indiquer si cette protéine a un

¹² Cette stratégie d'évaluation n'est pas applicable pour évaluer si les nouvelles protéines exprimées sont capables d'induire une sensibilité au gluten ou d'autres entéropathies. La question des entéropathies est traitée dans l'*Évaluation des effets immunologiques*, paragraphe 47, de la Directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné. De plus, la stratégie ne n'est pas applicable à l'évaluation des aliments quand l'expression des produits géniques est réduite à des fins hypoallergéniques.

potentiel allergénique. Les recherches de l'homologie de séquence visant à comparer la structure de toute protéine nouvellement exprimée avec tous les allergènes connus devraient être effectuées. Les recherches devraient être menées en utilisant différents algorithmes, tels que FASTA ou BLASTP, afin de prédire toute similarité structurelle générale. Des stratégies, telles que des recherches par étapes de segments d'acides aminés contigus identiques peuvent être effectuées pour déterminer les séquences qui peuvent constituer des épitopes linéaires. La taille des segments d'acides aminés contigus recherchés devrait être fondée sur une base scientifique justifiée en vue de minimiser la possibilité d'obtention de faux négatifs ou de faux positifs⁷. Des procédures d'évaluation et de recherche validées devraient être utilisées, afin d'obtenir des résultats biologiquement pertinents.

9. La réactivité croisée des IgE entre une protéine nouvellement exprimée et un allergène connu devrait être considérée comme possible quand il y a plus de 35 pour cent d'identité pour un segment de 80 acides aminés ou plus (FAO/OMS 2001) ou selon un autre critère scientifiquement justifié. Toutes les informations résultant de la comparaison de l'homologie de séquence entre la protéine nouvellement exprimée et les allergènes connus devraient être rapportées pour permettre une évaluation scientifiquement fondée au cas par cas.

10. Les recherches d'homologie de séquence ont certaines limites. En particulier, les comparaisons se limitent aux séquences d'allergènes connus se trouvant dans les banques de données accessibles au public et la littérature scientifique. Il y a également des limites dans la capacité de ces comparaisons à détecter des épitopes non contigus, capables de se fixer eux-mêmes spécifiquement aux anticorps IgE.

11. Un résultat négatif d'homologie de séquence indique que la protéine nouvellement exprimée n'est pas un allergène connu et qu'elle n'est pas susceptible d'avoir une réactivité croisée avec des allergènes connus. Un résultat indiquant l'absence d'une homologie de séquence significative devrait être pris en compte avec l'ensemble des autres données découlant de cette stratégie lorsqu'on évalue le potentiel allergénique de protéines nouvellement exprimées. Des études approfondies devraient être menées lorsque cela s'avère nécessaire (voir aussi les sections 4 et 5). Un résultat positif d'homologie de séquence indique que la protéine nouvellement exprimée est susceptible d'être allergénique. Si le produit devait être considéré plus avant, il devrait être évalué au moyen de sérum provenant des personnes sensibles à la source allergénique identifiée.

SECTION 3.3 – RÉSISTANCE À LA PEPSINE

12. La résistance à la digestion par la pepsine a été observée pour différents allergènes alimentaires; il existe donc une corrélation entre la résistance à la digestion par la pepsine et le potentiel allergénique.⁸ Par conséquent, la résistance d'une protéine à la dégradation en présence de pepsine sous les conditions appropriées indique qu'il faut mener une analyse plus poussée pour déterminer si la protéine nouvellement exprimée est allergénique. L'établissement d'un protocole de dégradation de la pepsine cohérent et bien validé pourrait améliorer l'utilité de cette méthode. Cependant, il devrait être tenu compte du fait que l'absence de résistance à la pepsine n'exclut pas que la protéine nouvellement exprimée puisse être un allergène avéré.

13. Bien que le protocole de résistance à la pepsine soit fortement recommandé, il est reconnu que d'autres protocoles de sensibilité aux enzymes existent. Ces autres protocoles peuvent être utilisés lorsque les justifications adéquates sont apportées.⁹

SECTION 4 – DÉPISTAGE DE SÉRUMS SPÉCIFIQUES

14. Pour ces protéines provenant d'une source allergénique connue, ou qui ont une homologie de séquence avec un allergène connu, des tests immunologiques devraient être effectués lorsque les sérums existent. Les sérums de personnes qui ont une allergie cliniquement reconnue à la source de protéine peuvent être utilisés pour tester la fixation spécifique de la protéine aux anticorps de la catégorie IgE dans des essais *in vitro*. La question critique pour de tels essais sera la disponibilité de sérums humains provenant d'un nombre suffisant de personnes.¹⁰ De plus, la qualité des sérums et la procédure d'essai doivent être normalisées pour donner un résultat de test valide. Pour les protéines provenant de sources non connues pour être allergénique et qui ne présentent pas d'homologie de séquence avec un

⁷ On reconnaît que la consultation FAO/OMS 2001 a suggéré de faire passer de 8 à 6 acides aminés, les recherches de segments identiques. Plus la séquence de peptides utilisée dans la comparaison progressive est petite, plus il est vraisemblable d'obtenir des faux positifs et, inversement, plus la séquence de peptides utilisée est grande, plus il est vraisemblable d'obtenir des faux négatifs, ce qui réduit l'utilité de la comparaison.

⁸ La méthode décrite dans *United States Pharmacopoeia* (1995) a servi à établir cette corrélation (Astwood et coll. 1996).

⁹ Consultation mixte FAO/OMS d'experts (2001).

¹⁰ Selon le rapport de la Consultation mixte FAO/OMS d'experts sur l'évaluation de l'allergénicité des aliments dérivés des biotechnologies (22-25 janvier 2001, Rome, Italie), un minimum de 8 sérums pertinents est requis pour atteindre une certitude de 99 pour cent que la nouvelle protéine n'est pas un allergène dans le cas d'un allergène majeur. De même, un minimum de 24 sérums pertinents est requis pour atteindre le même niveau de certitude dans le cas d'un allergène mineur. Il est reconnu que ces quantités de sérums peuvent ne pas être disponibles pour des questions de mise à l'essai.

allergène connu, un criblage ciblé de sérum, peut être considéré, lorsque ces tests tels que décrits au paragraphe 17 sont disponibles.

15. Dans le cas d'une protéine nouvellement exprimée dérivée d'une source allergénique connue, un résultat négatif lors d'essais immunologiques *in vitro* ne doit pas être considéré comme suffisant, mais devrait inciter à mener des essais supplémentaires, tels que le recours possible à des tests cutanés et à des protocoles¹¹ *ex vivo*. Un résultat positif à de tels tests indiquerait un potentiel allergène.

SECTION 5 –AUTRES CONSIDÉRATIONS

16. L'exposition absolue à la protéine nouvellement exprimée et les effets des procédés de transformation alimentaires pertinents conduiront à une conclusion générale sur le potentiel de risque pour la santé humaine. À cet égard, la nature du produit alimentaire destiné à la consommation devra être pris en considération lors de la détermination des types de transformations qui seraient utilisés et leurs effets sur la présence de la protéine dans le produit alimentaire final.

17. Comme les connaissances scientifiques et la technologie évoluent, d'autres méthodes et outils peuvent être examinés pour évaluer le potentiel d'allergénicité des protéines nouvellement exprimées dans le cadre de la stratégie d'évaluation. Ces méthodes devraient être scientifiquement solides et comprendre un criblage ciblé de sérum (c'est-à-dire l'évaluation de fixation sur IgE dans le sérum des individus avec des réponses allergiques validées cliniquement pour des catégories d'aliments largement apparentés); la constitution de banques de sérum internationales; l'utilisation de modèles animaux; et l'examen de protéines nouvellement exprimées pour les épitopes des cellules T et les motifs structurels associés aux allergènes.

¹¹ Consultation mixte FAO/OMS d'experts (2001) pour une description de *ex vivo*.