

Direction de l'évaluation des risques

**Comité d'experts spécialisé
« Évaluation des risques biologiques dans les aliments »**

Procès-verbal de la réunion du 09 juillet 2019

Considérant le décret n° 2012-745 du 9 mai 2012 relatif à la déclaration publique d'intérêts et à la transparence en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, ce procès-verbal retranscrit de manière synthétique les débats d'un collectif d'experts qui conduisent à l'adoption de conclusions. Ces conclusions fondent un avis de l'Anses sur une question de santé publique et de sécurité sanitaire, préalablement à une décision administrative.

Les avis de l'Anses sont publiés sur son site internet (www.anses.fr).

Étaient présent(e)s :

- Membres du comité d'experts spécialisé
- Mmes DUBOIS-BRISSEONNET, JOURDAN-DA SILVA, MARTIN-LATIL, MATHIEU, MEMBRÉ, THOMAS, VILLENA
- MM. AUVRAY, DURET, FEDERIGHI, FRAVALO, GAUTIER, GUYOT, LAILLER
- Coordination scientifique de l'Anses

Étaient excusé(e)s, parmi les membres du collectif d'experts :

- Mmes CHUBILLEAU, GOUALI, RAMA RAO, SCHORR-GALINDO, TALON
- MM. CARLIN, DANTIGNY, OSWALD

Présidence

M. FRAVALO assure la présidence de la séance pour la journée.

1. ORDRE DU JOUR

Les expertises ayant fait l'objet d'une finalisation et d'une adoption des conclusions sont les suivantes :

1. Demande d'appui relatif à la filière de production des préparations en poudre pour nourrissons (Saisine 2018-SA-0264)
2. Demande d'avis relatif à des propositions pour améliorer l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes génétiquement modifiées, au regard notamment du développement de plantes génétiquement modifiées contenant des événements de transformation empilés (Saisine 2013-SA-0035)

2. GESTION DES RISQUES DE CONFLIT D'INTERETS

L'analyse des liens d'intérêt effectuée par la coordination scientifique avant la réunion a mis en évidence un potentiel conflit d'intérêt pour S. Guyot concernant certaines questions de la saisine



2018-SA-0264 (questions liées à la validation de l'efficacité des procédés de décontamination ou de nettoyage et de désinfection). S. Guyot n'a pas participé aux débats sur ce dossier et est sorti de la salle.

Le président précise que l'analyse des liens déclarés n'a pas mis en évidence de risque de conflit au regard du second point de l'ordre du jour (Saisine 2013-SA-0035).

Aucun autre conflit d'intérêt n'est déclaré par les experts présents.

3. SYNTHESE DES DEBATS, DETAIL ET EXPLICATION DES VOTES, Y COMPRIS LES POSITIONS DIVERGENTES

3.1. Demande d'appui relatif à la filière de production des préparations en poudre pour nourrissons (saisine 2018-SA-0264)

Le président vérifie que le quorum est atteint avec 13 experts présents sur 21 ne présentant pas de risque de conflit d'intérêts. S. Guyot est sorti de la salle pour ce point.

3.1.1. Contexte

À la suite de la détection, en décembre 2017, de salmonelles dans différents lots de préparations en poudre pour nourrissons, la Direction générale de l'alimentation (DGAL) a diligenté un plan de contrôle de tous les établissements français fabriquant, mélangeant ou conditionnant ces produits. Les informations recueillies à cette occasion montrent que les formulations et les procédés de fabrication de ces produits ont évolué au cours des dernières années.

L'Anses a été saisie pour réaliser une actualisation de l'expertise rendue par l'Afssa en 2008 (Contamination microbienne des préparations lactées en poudre destinées aux nourrissons et personnes âgées, Afssa, 2008), en particulier sur l'analyse des dangers et l'évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise mises en œuvre par les exploitants. L'avis de l'Anses servira de base à la rédaction d'une instruction technique qui détaillera les points de vigilance à examiner lors des inspections.

En appui de la saisine, quatre plans de maîtrise sanitaire (PMS) représentatifs de la diversité des procédés de fabrication et des productions ont été transmis par la DGAL.

3.1.2. Organisation de l'expertise

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « Poudres infantiles », créé par décision du 20 février 2019.

Les travaux ont été présentés au CES BIORISK tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 17 avril 2019 et 9 juillet 2019, ainsi qu'au groupe de travail pérenne « Évaluation des guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP » (GT GBPH). Les travaux ont été adoptés par le CES BIORISK le 9 juillet 2019.

3.1.3. Synthèse des discussions en séance

CES de mars 2019

Le contexte de la saisine et la composition du groupe de travail sont présentés.

CES d'avril 2019

Les questions instruites et la méthode d'expertise du GT sont présentés.

CES de mai 2019

L'état d'avancement des travaux est présenté. Les points suivants sont abordés au cours de la présentation :



- Le plan du rapport ;
- Les conclusions de l'analyse des PMS de quatre usines de production de préparation en poudre pour nourrissons ;
- Les questions complémentaires posées aux industriels dans le cadre d'auditions.

CES de juin 2019

Les points clés du rapport du GT sont présentés. Les principaux commentaires sont les suivants :

- Les définitions utilisées : mieux préciser qu'il s'agit de celles du GT car elles ne sont pas toujours équivalentes aux définitions issues de normes et autres documents existants (ex : glossaire du GT GBPH) ;
- La partie HACCP : il convient de bien préciser/rappeler dans la partie HACCP, que seules les étapes ultérieures à la pasteurisation sont considérées ;
- La logique du zonage et la qualification des zones (« haute hygiène » ; « moyenne hygiène », etc.) ;
- Les aspects analytiques.

Le rapport sera modifié en tenant compte de ces commentaires.

CES de juillet 2019

Des modifications de forme sont intégrées dans le document de Synthèse et Conclusions du CES BIORISK et le rapport du GT « poudres infantiles » relatifs aux préparations en poudre pour nourrissons. La section « Réponses aux questions posées et conclusions » est reprise ci-dessous.

Réponses aux questions posées

Analyse des dangers du procédé

1. **Quels sont les principaux dangers microbiologiques associés aux préparations en poudre pour nourrissons au sens du règlement (UE) n°609/2013, et cela quels que soient leurs ingrédients principaux (lait, riz, lécithine de soja, ...) ?**

Salmonella spp et *Cronobacter* spp sont les principaux dangers dont la maîtrise est jugée essentielle pour la sécurité des préparations en poudre pour nourrissons.

La liste de dangers devrait être reconsidérée par les producteurs de préparation en poudre pour nourrissons à chaque évolution de formulation ou de procédé et au regard de nouvelles données épidémiologiques.

2. **À la lecture des quatre plans de maîtrise sanitaire adressés, quelles sont les principales mesures de maîtrise des dangers identifiés à la question 1 (bonnes pratiques d'hygiène, points de vigilance, programmes prérequis opérationnels, mesures associées aux points critiques, etc.) ? Quelles sont les conditions de leur efficacité ?**

Compte tenu de l'absence de traitement d'assainissement final, la maîtrise de ces dangers repose sur l'application rigoureuse et systématique de mesures générales de maîtrise telles que :

- les spécifications microbiologiques des ingrédients ajoutés après le séchage ;
- la prévention des transferts de contaminants de la poudre vers l'environnement des équipements et réciproquement ;
- le nettoyage et, si de l'eau est utilisée p. ex. pour la désinfection, le séchage de l'environnement et des équipements.

Une attention particulière devrait être portée à bannir la présence d'eau et les points d'accumulation potentiels dans la zone à très haute hygiène.



Ces mesures de maîtrise, qui sont toutes d'une égale importance, semblent connues des entreprises ayant communiqué leur PMS. En revanche, les PMS ne décrivent pas de façon complète les actions de nettoyage, de désinfection et de séchage, le suivi de la gestion des nuisibles, la qualification des fournisseurs, le plan d'analyses microbiologiques et les procédures détaillées de ces dernières, l'analyse des tendances.

En outre, des insuffisances ou même l'absence d'information dans les PMS concernent la surveillance de l'hygrométrie et de la pression d'air dans les zones à très haute hygiène, la conception hygiénique des locaux et des équipements, la filtration de l'air, la surveillance de la santé du personnel et la formation de ce dernier aux activités en zones sensibles, l'hygiène du conditionnement des poudres, le prélèvement des échantillons dans l'environnement de fabrication et les conséquences en cas de non-conformité des résultats des analyses de l'environnement.

3. Les dossiers joints illustrent la diversité des procédés et des stratégies des entreprises.
Quelle(s) évolution(s) des procédés de fabrication et des pratiques (p. ex. augmentation du débit de séchage, modification des formulations, p. ex. réduction de la fréquence des nettoyages, réduction du nombre de prélèvements soumis à analyses) devraient conduire à reconsidérer l'efficacité des mesures de maîtrise identifiées précédemment ? Ce bilan sera effectué sur la base des quatre PMS et des auditions réalisées sans viser l'exhaustivité.

Les PMS communiqués au groupe de travail donnent très peu d'indications sur l'évolution des procédés et/ou des formulations des produits, pas plus que sur les stratégies des entreprises. De manière générale, toute modification du procédé et/ou des formulations du produit devrait conduire à reconsidérer l'analyse des dangers.

Évaluation des stratégies d'autocontrôles

4. Le rapport de l'Afssa de 2008¹ insiste sur « la nécessité de surveiller avec rigueur l'hygiène de l'environnement de fabrication ». Comment concevoir un plan de contrôle de l'environnement efficace ? Comment apprécier l'efficacité d'un plan de contrôle de l'environnement préexistant ?

En préambule, il est important de rappeler qu'il appartient à chaque usine de mettre au point sa propre démarche, car aucune recommandation générale, applicable en toutes circonstances, ne peut raisonnablement être établie. Les recommandations données ci-après devraient être modulées en fonction de l'usine et de la ligne de production.

À noter encore que l'on ne sait pas mesurer correctement la contamination réelle des surfaces. Les méthodes disponibles ne permettent que de déterminer la charge bactérienne qui leur est « accessible ». En effet, on ne sait pas détacher 100 % des bactéries, et on ne sait pas dénombrer 100 % des bactéries détachées. Donc, les méthodes disponibles renseignent moins sur la réussite du nettoyage et de la désinfection que sur leur défaillance (quand la charge bactérienne est suffisamment grande pour être détectable et/ou quantifiable).

Tout d'abord, sur les sites de production de préparations en poudre pour nourrissons, il apparaît essentiel de mettre en place et de respecter un zonage hygiénique d'intensité croissante pour tenir compte de la vulnérabilité du produit à la contamination environnementale (p. ex. zone de très haute hygiène, zone de haute hygiène, zone d'hygiène intermédiaire, et enfin zone d'hygiène de base). Au sein de chacune de ces zones, il convient de distinguer les surfaces en contact direct avec le produit, les surfaces proches, et les surfaces plus éloignées (par ex. les murs, les sols, le plafond). La stratégie d'échantillonnage dans l'usine sera zone et surface dépendante. Au plus

¹ AFSSA. 2008. Contamination microbienne des préparations lactées en poudre destinées aux nourrissons et personnes âgées. Maisons-Alfort: Agence française de sécurité sanitaire des aliments.



près du produit, l'échantillonnage vise normalement le repérage des *Enterobacteriaceae*, en effet il y a très peu de chance d'y détecter *Salmonella* et *Cronobacter* (cf. section 3.5.1 du rapport pour plus de détails). La méthode de prélèvement doit également être adaptée à la zone et la surface (cf. section 3.6.1 du rapport).

La stratégie d'échantillonnage à des fins d'analyse sera fonction de l'objectif de cet échantillonnage (cf. section 3.5.1 du rapport) : détecter une contamination, établir un niveau de référence, évaluer si ce niveau est dépassé ou pas, rechercher une source de contamination. Afin d'établir un « niveau de référence », il est suggéré de suivre très régulièrement la contamination surfacique lorsqu'il est considéré de façon responsable que l'usine fonctionne dans les conditions hygiéniques optimales.

La recherche systématique de la cause d'un dépassement du niveau de référence ou de la présence d'un pathogène dans l'environnement de l'usine, ou a fortiori dans le produit fini, est nécessaire (cf. outils proposés en section 3.5.2 du rapport). Des actions correctives devraient être alors mises en place et en relation, un plan d'échantillonnage renforcé activé (cf. exemple proposé en section 3.5.1 du rapport). Le retour « à la normale » se fera une fois le niveau de référence à nouveau respecté, sous réserve que les opérations d'hygiène soient conduites de façon reproductible.

5. En cas de contamination récurrente de l'environnement au-delà d'un seuil prédéfini, quelles mesures de contrôle renforcées et quelles mesures correctives faut-il appliquer ? Comment valider l'efficacité de ces mesures ? Est-il possible d'apprécier l'impact de la durée de cette phase sur la fiabilité de la validation ?

La contamination récurrente de l'environnement au-delà d'un seuil prédéfini doit entraîner un plan de contrôle renforcé de l'environnement et des produits finis. Il est recommandé de disposer dans le PMS d'un arbre décisionnel pour gérer les non-conformités rencontrées à la fois dans les produits finis et dans l'environnement.

La gestion des non-conformités sur le site de production devrait comporter au moins :

- l'application d'une procédure de nettoyage-désinfection « corrective » de tous les matériels et surfaces de la zone concernée, avec éventuellement une modification du plan de nettoyage et désinfection (par ex. produits détergents plus efficaces, temps d'action augmentés, démontage et nettoyage de certains éléments) ;
- si, à titre exceptionnel, un nettoyage humide est effectué en zone sèche, un soin particulier doit être apporté au séchage ;
- un plan de contrôle renforcé de l'environnement et des produits finis produits après la découverte de l'incident, ainsi que - dans la mesure du possible - un contrôle rétrospectif des produits finis ;
- une analyse des causes ;
- les modalités de blocage, de rappel et de retraits des lots ou parties de lot ;
- les modalités de sortie d'un plan de contrôle renforcé.

Les modalités de contrôle renforcé pour l'environnement sont impossibles à définir de façon unique et applicables par toutes les usines. Ces modalités (par ex. augmentation de fréquence, augmentation du nombre de sites prélevés, utilisation d'autres techniques d'analyse ou de prélèvement telles que grattage, surface de prélèvement augmentée pour chaque prélèvement, utilisations d'adhésifs) devraient être définies pour chaque usine.

L'analyse des causes est essentielle car elle conditionne la sortie de phase de contrôle renforcé. La cause devrait donc être rapidement recherchée afin de limiter le plus possible cette phase :

- par des inspections visuelles de toutes les zones de l'usine, y compris les abords (zone d'hygiène de base) pour détecter les points d'accumulation (trous, carrelage cassés, résine



détériorée, moisissures, humidité). Ces inspections visuelles sont cruciales même en l'absence de détection d'indicateurs ou de pathogènes ; notamment, les défauts d'infrastructure, de matériels ou d'hygiène doivent être résolus dès la première identification, sans cela un plan de contrôle renforcé et/ou un arrêt de la production devrait être décidé ;

- par une vérification du respect de toutes les procédures et instructions ;
- par l'identification d'événements inhabituels survenus dans le passé (par ex. pluies abondantes, effraction des locaux, présence de nuisibles, visites, audits, livraison de produits contaminés, pannes, grèves, épidémie parmi le personnel, nouveau personnel, nouveaux ingrédients ou contenants, commande exceptionnelle, changement de laboratoire, etc.) ;
- par la vérification de la santé du personnel dans le respect du droit du travail.

Les causes principales de contamination devraient avoir normalement été identifiées par l'analyse des dangers. Dans le cas contraire, différents outils peuvent venir compléter la démarche HACCP et être utilisés notamment l'analyse des défaillances (cartographie des transferts de contamination et diagramme de causalité, section 3.5.2 du rapport) lorsque les premières investigations n'ont rien détecté. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire peut se révéler utile pour identifier les sources de contamination. Le contrôle renforcé doit être poursuivi tant que la cause d'une contamination supérieure au niveau de référence dans l'environnement de l'usine ou de la présence d'un pathogène n'est pas identifiée et maîtrisée. L'efficacité des mesures mises en place est jaugée au moyen du suivi des indicateurs (*Enterobacteriaceae*).

Quand la cause est identifiée, corrigée ou maîtrisée (au besoin par la mise en place de nouvelles mesures de maîtrises validées), le plan de contrôle renforcé peut être suspendu. L'incident doit être l'occasion de retours d'expériences, de formations et sensibilisation du personnel aux PRP (par ex. respect des zones, nettoyage et désinfection et séchage des surfaces). Ces incidents doivent être enregistrés dans le plan de maîtrise sanitaire : fiche de non-conformité précisant la date de détection, la cause identifiée, l'entrée et la sortie du plan de contrôle renforcé, les actions correctives ou corrections (consigne, retrait ou rappel total ou partiel de lots), la validation d'éventuelles nouvelles mesures de maîtrise, etc.

6. Parmi l'ensemble des mesures de contrôle de l'efficacité du nettoyage, comment apprécier l'intérêt des inspections visuelles, tant sur la propreté des locaux à l'issue du nettoyage que dans l'appréciation du séchage après un lavage à l'eau ? Comment les articuler avec les autres formes de vérification ?

L'inspection visuelle est essentielle. Elle permet de repérer par exemple l'accumulation de dépôts indésirables devenus visibles, donc inacceptables, des flaques d'eau, des fuites, etc. Toutefois, elle ne donne aucune indication sur la charge microbiologique des surfaces et ne permet pas de repérer l'humidité qui subsiste sur les parois internes ou externes des équipements ou sur les sols.

Il convient de réaliser que, dans les équipements de conception ancienne (ne respectant pas les règles de la conception hygiénique²), existent des recoins où l'eau peut s'accumuler, et donc être longue à s'évaporer). Une inspection visuelle ne peut en aucun cas aider à déterminer si la zone sèche est de nouveau sèche après un grand lavage.

7. En complément des éléments relatifs aux indicateurs d'hygiène des procédés dans le rapport de 2008 susvisé, est-il possible d'établir un lien de probabilité entre une contamination récurrente dans l'environnement et une contamination des produits ?

De façon générale, il n'est pas possible d'établir un lien de probabilité entre une contamination récurrente dans l'environnement et une contamination des produits qui s'appliquerait à l'ensemble

² La conception hygiénique est une obligation en vertu de la Directive 2006/42/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 mai 2006 relative aux machines et modifiant la directive 95/16/CE, Annexe 1, Section 2.1. *Machines destinées à l'industrie alimentaire et machines destinées à l'industrie cosmétique ou pharmaceutique*.



des usines. En revanche, une étude plus fine, au cas par cas (sur ligne de production spécifique) pourrait s'envisager. Dans ce cas, les outils proposés en section 3.5.2 du rapport seraient utiles pour poser le modèle conceptuel préalable à la quantification. Ce travail spécifique demande des données, de l'expertise et du temps.

De telles études pourraient également permettre de mieux exploiter l'indicateur d'hygiène *Enterobacteriaceae* et d'étudier par exemple le lien, s'il existe, entre les entérobactéries dans l'environnement et *Salmonella* ou *Cronobacter* dans le produit fini. Ces études pourraient être envisagées de façon quantitative, par site, par zone voire même par surface au sein de chaque zone.

8. En annexe de votre réponse à la saisine relative au plan d'échantillonnage proposé par Lactalis, figurait un programme utilisable avec le logiciel R pour évaluer la performance d'un tel plan. Or, l'utilisation de ce logiciel demande un niveau d'expertise significatif. Pourriez-vous remplir le tableau annexé pour guider les inspecteurs lors de la gestion des non-conformités dans les produits ?

Les calculs relatifs au plan d'échantillonnage ont été revus et améliorés par rapport à ceux proposés dans le rapport de l'Afssa en 2008. La nouvelle méthode a été détaillée dans la section 3.4 du rapport, associée à un exemple basé sur des valeurs réalistes de contamination. L'Anses va organiser, selon des modalités à préciser, une mise à disposition ciblée d'un programme R associé à une application Shiny accessible en ligne.

Plan de surveillance des poudres produites en France

9. La production française de lait en poudre infantile a été d'environ 145 000 tonnes en 2016. Combien d'échantillons seraient nécessaires pour être capable de détecter un taux de contamination plus faible d'un facteur 10 que celui couramment observé pour d'autres denrées, soit un taux de contamination de 1 pour 1 000 lots de 5 à 100 tonnes ? Même question si on estime le taux de contamination à 1 pour 10 000 lots ?

Nous nous plaçons dans le cadre d'un plan national dont l'objectif est de repérer le statut des lots de production. Quel que soit le pourcentage de lots contaminés (1 sur 1000 ou 1 sur 10 000), pour connaître le statut d'un lot, il convient :

- d'analyser chaque lot ;
- de construire un plan d'échantillonnage permettant de connaître le statut de chaque lot (conforme ou non-conforme).

Le nombre de prises d'essai à analyser est détaillé dans la section 3.4.3. Pour chaque lot, il dépend de la densité de contamination et du degré d'hétérogénéité de cette dernière.

10. Le règlement (CE) n°2073/2005 impose d'analyser 30 échantillons de 25 g par lot. Quelle serait la différence de performance entre des plans consistant à prélever :

- **25 g dans 30 boîtes différentes d'un même lot,**
- **6 x 25 g soit 150 g dans 5 boîtes d'un même lot,**
- **30 x 25 g soit 750 g dans une seule boîte du lot ? »**

À condition que l'échantillonnage soit aléatoire et que la répartition de la contamination soit parfaitement homogène, les trois plans sont équivalents sous réserve que toutes les prises d'essai soient individuellement analysées. Pour le cas où la répartition de la contamination n'est pas homogène, la réponse à cette question dépend de la répartition des bactéries.



3.1.4. Conclusion de l'expertise collective

Salmonella spp. et *Cronobacter* spp. sont les principaux dangers microbiologiques dont la maîtrise est jugée essentielle pour la sécurité des préparations en poudre pour nourrissons. La liste de dangers devrait être reconSIDérée par les producteurs de préparation en poudre pour nourrissons à chaque évolution de formulation ou de procédé et au regard de nouvelles données épidémiologiques.

La sécurité des préparations en poudre pour nourrissons est principalement assurée par la mise en œuvre des bonnes pratiques d'hygiène et de l'application des principes HACCP. Les plans d'échantillonnage pour l'analyse microbiologique qui ciblent le produit fini n'ont pas pour vocation de pallier les défaillances dans l'application des PRP et du système HACCP. Le contrôle par échantillonnage du produit fini n'est pas en soi une mesure de maîtrise. En effet, pour des raisons statistiques, quand la contamination microbienne est faible (ce qui est bien entendu souvent le cas), il faut prélever et analyser un nombre irréaliste de prises d'essai pour obtenir une information pertinente. Cependant, à l'inverse, lorsque l'on détecte *Salmonella* spp. ou *Cronobacter* spp. dans un lot, des actions doivent être mises en place et adaptées au risque encouru par la population destinataire du produit, c'est pourquoi les plans d'échantillonnage restent nécessaires.

L'information recueillie lors de l'échantillonnage du produit fini d'un lot donné n'apporte qu'une information sur ce lot. Il serait plus intéressant d'analyser globalement les données issues de l'échantillonnage à l'échelle de la ligne de production, voire même de l'usine sur une période longue (une année par ex.). Les critères microbiologiques de sécurité qui définissent l'acceptabilité d'un lot de denrées alimentaires pourraient être judicieusement remplacés par la mise en place d'un objectif de performance (ou PO - *Performance Objective*, niveau maximal de contamination microbiologique acceptable à un stade antérieur à la consommation du produit p. ex. au stade de la sortie usine).

En revanche, la détection et le dénombrement des bactéries pathogènes ou des indicateurs d'hygiène dans des prélèvements environnementaux réalisés selon un plan d'échantillonnage judicieux, associé à l'application et au respect du zonage de l'usine, contribuent de manière significative à une gestion préventive du risque sanitaire. Les analyses microbiologiques environnementales sont essentielles. Elles permettent :

- de détecter une contamination de l'environnement par un pathogène,
- d'établir un niveau de référence des critères d'hygiène acceptable en-dessous duquel l'environnement est considéré comme maîtrisé, et au-delà duquel des actions correctives sont nécessaires,
- d'évaluer si ce niveau de référence est dépassé ou non,
- de rechercher les sources de contamination par un pathogène, quand il y a eu par ex. des échantillons positifs dans le produit fini, afin d'appliquer les actions correctives adéquates.

Une stratégie d'échantillonnage (fréquence, nombre de prises d'essai, lieux de prélèvements) ne peut être recommandée de façon générale car spécifique de chaque usine et ligne de production. Quelques exemples sont donnés par le groupe de travail à visée d'illustration.

En cas de détection d'une bactérie pathogène dans l'environnement ou dans le produit fini, une recherche de cause est essentielle. Le recours à une cartographie des flux et transferts dans l'usine (produits, personnel, aérosol), adossée à la construction de diagrammes de causalité est proposée pour faciliter la recherche de l'origine de la contamination et à mettre en place les actions correctives appropriées. Cette cartographie qui vise à repérer les flux de matière ou d'air au sein de l'usine pouvant entraîner une contamination du produit fini peut être bâtie en réaction (quand le pathogène a été repéré), mais le groupe de travail recommande de la bâtrir de façon préventive en dehors des périodes de crise. Les méthodes de biologie moléculaire de type séquençage du génome entier sont également des outils intéressants pour l'identification des sources de contamination au sein d'ateliers de production.



Une analyse systématique des données d'autocontrôles microbiologiques relatifs aux indicateurs d'hygiène (*Enterobacteriaceae*) est recommandée pour établir un niveau de référence et repérer, par suivi des courbes de tendance, la moindre dérive susceptible d'entraîner un risque accru pour le consommateur. Les données de dénombrement des indicateurs d'hygiène sont également utiles pour construire la cartographie des flux. Leur présence en quantité plus ou moins élevée en différents lieux de l'environnement, voire dans le produit fini, renseigne sur la vraisemblance d'un transfert.

La partie analytique du plan d'échantillonnage n'est pas à négliger : les modalités d'échantillonnage, de prélèvements et de mise en analyse impactent les résultats du plan, en particulier une bonne connaissance des limites des techniques actuelles utilisées dans la recherche de *Salmonella* et *Cronobacter* dans les préparations en poudre pour nourrissons et un suivi des travaux de recherche dans ce domaine sont souhaitables. La traçabilité des informations relative aux modalités d'échantillonnage, de prélèvements et de mise en analyse devrait être assurée, qu'il s'agisse d'échantillons de l'environnement ou de produits finis.

Les principales mesures de maîtrise semblent connues des entreprises ayant communiqué leur PMS. Cependant, à la lecture des PMS, les mesures classées en points faibles ou à approfondir devraient faire l'objet d'une attention particulière lors des inspections. L'analyse et la maîtrise des dangers liés aux préparations en poudre pour nourrissons pourrait être facilitée par la rédaction d'un Guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP (GBPH). Le groupe de travail encourage vivement les opérateurs à rédiger un tel document.

En parallèle, il est important de rappeler la nécessité de respecter les mesures d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons (AFSSA 2005)³.

Des pistes de recherche ont été identifiées. En particulier, il serait nécessaire de :

- produire les connaissances sur les méthodes de prélèvement et de mise en analyse des *Salmonella* et *Cronobacter* provenant d'un environnement sec afin de mieux quantifier le niveau de contamination dans l'usine ou dans le produit fini ;
- produire les connaissances et développer les modèles de transferts adéquats dans l'objectif d'établir un lien quantitatif entre les probabilités d'une contamination récurrente dans l'environnement et d'une contamination de produit fini.

Enfin, les différentes auditions et discussions avec les experts ont pointé un besoin de formation. Celle-ci, organisée de façon régulière, permettrait aux acteurs de terrain (inspecteurs vétérinaires et opérateurs dans les usines) et aux autorités compétentes d'uniformiser leurs connaissances, de relativiser le pouvoir du « tout échantillonnage » et de s'approprier de nouveaux outils de la gestion du risque tel que l'objectif de performance.

Le président propose une étape formelle de validation avec délibération et vote. Il rappelle que chaque expert donne son avis et peut exprimer une position divergente ou une abstention.

Les experts adoptent à l'unanimité les conclusions de l'expertise en réponse à la demande d'appui relatif à la filière de production des préparations en poudre pour nourrissons.

³ AFSSA. 2005. Recommandations d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons – Hygiene recommendations for the preparation, handling and storage of feeding bottles. Edité par C Bultel et D Turck. Maisons-Alfort (France): Agence française de sécurité sanitaire des aliments.



3.2. Demande d'avis relatif à des propositions pour améliorer l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes génétiquement modifiées, au regard notamment du développement de plantes génétiquement modifiées contenant des événements de transformation empilés (saisine 2013-SA-0035)

Le président vérifie que le quorum est atteint avec 14 experts sur 22 ne présentant pas de risque de conflit d'intérêts.

3.2.1. Contexte

L'Anses s'est autosaisie le 15 février 2013 afin de proposer des améliorations concernant l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes génétiquement modifiées (PGM), au regard notamment du développement de PGM contenant des événements de transformation empilés. En effet, très peu de temps après la création des premières PGM à événement de transformation simple, les industriels ont développé des PGM contenant plusieurs événements de transformation en réalisant des croisements conventionnels entre plusieurs PGM à événement de transformation simple. Confronté depuis le début des années 2000 à l'évaluation du risque sanitaire lié à l'utilisation de ces PGM en alimentation humaine et animale, dans un contexte d'évolution constante de la réglementation et des recommandations de l'EFSA, le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » a élaboré une démarche pour évaluer ces PGM, qu'il a souhaité formaliser dans un avis.

Au cours de ce travail de réflexion, les experts du Groupe de Travail pérenne « Biotechnologie » se sont interrogés sur l'éventualité que des interactions aient lieu entre les événements empilés, sur le plan moléculaire, protéique ou métabolique, ainsi que sur les moyens qui permettraient de mettre en évidence ces interactions et d'en évaluer les effets sur la santé après consommation par l'Homme ou l'animal. Ces travaux ont abouti à des propositions pour améliorer l'évaluation de la sécurité sanitaire des PGM, à événement de transformation simple ou contenant des événements de transformation empilés. Ces propositions, qui tiennent compte des limites des méthodes utilisées à l'heure actuelle et des possibilités offertes par l'évolution des connaissances et des techniques, sont également formalisées dans cet avis.

3.2.2. Organisation de l'expertise

Une première étape de l'expertise collective a été réalisée par le GT « Biotechnologie », réuni le 21 juillet 2016, sur la base d'un travail initial en sous-groupes, auquel tous les experts ont contribué entre novembre 2014 et février 2016, puis d'un rapport de synthèse élaboré à partir des propositions de chaque sous-groupe. Ce rapport a été présenté et discuté lors des réunions du GT « Biotechnologie » des 19 mai, 16 juin et 21 juillet 2016. Un travail a ensuite été réalisé en interne à l'Anses, à la Direction de l'évaluation des risques, au sein de l'Unité d'évaluation des risques liés aux aliments, afin de proposer une version du document enrichie d'éléments discutés au cours de différentes réunions du GT « Biotechnologie » et qui n'avaient pas été intégrés dans le rapport de synthèse initial. Une deuxième étape de l'expertise collective a été réalisée au cours des réunions du GT « Biotechnologie » des 17 janvier et 21 février 2019, au cours desquelles ce document a été présenté, discuté puis validé à l'unanimité.

Les travaux portant sur la méthode d'expertise, ils ont ensuite été présentés au CES « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (BIORISK), auquel le GT « Biotechnologie » est rattaché, lors des réunions des 27 juin et 9 juillet 2019.

3.2.3. Synthèse des discussions

Les discussions ont principalement porté sur les sujets suivants :

- démarche pour évaluer les PGM contenant des événements de transformation empilés : le GT « Biotechnologie » a défini une méthode d'évaluation pas à pas, qui répond à la double



nécessité de mettre en place une analyse cohérente des dossiers, actuellement construits sur la base d'argumentaires hétérogènes faute d'exigences spécifiques avant l'entrée en vigueur du règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, et de définir les principaux sujets de préoccupation toxicologique concernant ces PGM ;

- caractérisation moléculaire des PGM : le GT « Biotechnologie » considère qu'elle devrait être réalisée à l'aide des techniques de « séquençage de nouvelle génération » (NGS), qu'il s'agisse de PGM à évènement de transformation simple ou de PGM contenant des évènements de transformation empilés. Cette analyse peut être réalisée par deux approches : soit un séquençage complet du génome, soit une analyse ciblée sur les zones d'intérêt ;
- évaluation comparative des PGM : le GT « Biotechnologie » estime qu'il n'est pas possible, dans l'immédiat, de s'affranchir de l'utilisation des comparateurs (témoin et variétés de référence) sur chacun des sites d'essais, car les effets de l'environnement et du fonds génétique dans lequel l'évènement de transformation a été placé sont souvent très supérieurs à ceux liés à la modification génétique. Par ailleurs, le GT « Biotechnologie » estime que dans certains cas, la sensibilité des méthodes d'analyse des documents consensus de l'OCDE devrait être améliorée et la liste des composés complétée. De plus, pour certaines espèces qui font l'objet du développement de PGM, il n'existe pas encore de document consensus de l'OCDE. Des compléments à ce niveau sont donc nécessaires. Enfin, les approches « omiques » (transcriptomique, protéomique et métabolomique) sont souvent évoquées comme des moyens d'accéder à une connaissance plus complète des effets de la transformation génétique sur la composition de la PGM. Le GT « Biotechnologie » considère ces techniques comme prometteuses, mais avant qu'elles ne puissent être utilisées en routine, un important travail de normalisation des méthodes et de développement d'outils informatiques et de tests statistiques adaptés aux analyses « omiques » reste à réaliser ;
- évaluation de la toxicité potentielle des PGM : l'étude de la PGM ou de produits issus de la PGM par administration orale pendant 90 jours chez les rongeurs est la seule étude à visée toxicologique réalisée sur l'aliment en tant que tel. Elle est intégrative, puisqu'elle prend en compte la PGM dans son ensemble, au-delà de la présence des protéines nouvellement exprimées. Le GT « Biotechnologie » considère qu'il s'agit d'une étude pertinente pour détecter des effets involontaires et non prévisibles qui pourraient résulter de la modification génétique et qu'il est donc nécessaire de disposer d'une telle étude pour chaque PGM à évènement de transformation simple.

Concernant les PGM contenant des évènements de transformation empilés, le GT « Biotechnologie » estime qu'une étude par administration orale pendant 90 jours chez les rongeurs n'est pas nécessaire si (i) les PGM parentales ont reçu un avis favorable de l'Afssa ou de l'Anses, à l'issue d'une évaluation complète (caractérisation moléculaire, évaluation comparative de la composition et des caractéristiques agronomiques et phénotypiques, toxicologie (incluant une étude de toxicité par administration répétée pendant 90 jours chez le rongeur), allergénicité et évaluation nutritionnelle), (ii) l'évaluation comparative de la PGM contenant les évènements de transformation empilés permet de démontrer l'équivalence de cette PGM avec des variétés non génétiquement modifiées et (iii) en plus de la caractérisation moléculaire et de l'évaluation comparative de la PGM contenant des évènements de transformation empilés, le dossier présente un argumentaire consolidé, incluant les données de la littérature et tout autre élément dont le pétitionnaire dispose, à l'appui de l'absence d'interaction entre les évènements empilés pouvant avoir un impact négatif sur la santé humaine ou animale.

Le GT « Biotechnologie » souhaite également développer une méthode qui permettrait d'analyser conjointement plusieurs paramètres, tels que l'ensemble des paramètres rénaux ou hépatiques. En effet, à l'heure actuelle, chaque paramètre mesuré dans l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours est analysé séparément des autres et dans ces conditions, il n'est pas toujours évident de déterminer la signification biologique d'effets observés sur quelques paramètres. Le travail



porterait sur la définition des groupes de paramètres à analyser conjointement et des tailles d'effet, et il s'appuierait sur les outils statistiques disponibles (analyses multivariées (PLS, ACP, MANOVA, etc.)). Par ailleurs, pour les variables mesurées longitudinalement (comme le poids par exemple), le GT « Biotechnologie » souhaite que dorénavant, les pétitionnaires utilisent un modèle mixte approprié ;

- évaluation de l'allergénicité potentielle de la PGM : le GT « Biotechnologie » est en accord avec la méthodologie actuellement utilisée (règlement d'exécution (UE) n° 503/2013) pour évaluer l'allergénicité potentielle de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s). En revanche, le problème de l'évaluation des propriétés d'adjuvant de cette (ces) protéine(s) reste entier, dans la mesure où les directives actuelles (recherche d'identités de séquence avec des toxines connues) demeurent insuffisantes. Par ailleurs, le GT « Biotechnologie » considère qu'à terme, l'analyse des allergènes pourrait faire partie de l'évaluation comparative des PGM, lorsque des approches « omiques » seront disponibles pour une utilisation en routine. Dans l'intervalle, les connaissances sur l'allergénicité des protéines du soja, du maïs, du colza, de la pomme de terre et du cotonnier, ainsi que sur les propriétés classiquement associées à l'allergénicité (résistance à la dénaturation thermique et à la protéolyse digestive) permettent au GT « Biotechnologie » de proposer une liste d'allergènes qui pourraient être utilisés comme marqueurs d'une modification de l'allergénicité de la PGM ou de ses produits dérivés liée à la modification génétique ;
- évaluation nutritionnelle de la PGM : le GT « Biotechnologie » estime que l'étude d'alimentarité pourrait être enrichie d'investigations complémentaires, dans le même esprit que celles décrites dans la ligne directrice VICH GL43 (2008)⁴ pour les produits pharmaceutiques à usage vétérinaire. La démarche proposée consiste à réaliser des prélèvements de sang et de tissus au cours de l'étude et à les conserver dans des fixateurs, puis à faire réaliser des autopsies par un vétérinaire anatomopathologiste. En cas d'observations douteuses lors des autopsies, des analyses histologiques seraient réalisées sur les tissus prélevés et les échantillons de sang feraient l'objet d'une analyse hématobiochimique complète.

3.2.4. Conclusion de l'expertise collective

Les principales propositions d'amélioration de l'évaluation de la sécurité sanitaire des PGM sont les suivantes :

- caractérisation moléculaire : abandonner les analyses de type « Southern blot » au profit des techniques de « séquençage de nouvelle génération » (NGS).
- évaluation comparative : contribuer aux travaux de l'OCDE concernant la mise à jour des documents consensus existants (liste des composés analysés et méthodes de mesure) et le développement de documents consensus pour les espèces qui font l'objet du développement de PGM et pour lesquelles il n'en existe pas encore.
- évaluation de la toxicité potentielle : (i) améliorer les référentiels actuels (réglementation et documents guides de l'EFSA) concernant l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours, en donnant plus de détails sur la manière de la réaliser (à l'instar de ce qui a été fait pour les essais au champ) et sur la marche à suivre dans le cas des PGM à événements de transformation empilés, (ii) développer un outil permettant de tester des groupes de paramètres reliés à différentes fonctions (rénale, hépatique, etc.), plutôt que de tester chaque paramètre indépendamment, comme c'est le cas aujourd'hui et (iii) demander que les

⁴ European Medicines Agency, Veterinary Medicines and Inspections. 2008. VICH Topic GL43. "Guideline on Target Animal Safety for Veterinary Pharmaceutical Products." EMEA/CVMP/VICH/393388/2006. Londres (Grande-Bretagne).



pétitionnaires utilisent un modèle mixte approprié pour les variables mesurées longitudinalement (Anses, 2011)⁵.

- évaluation de l'allergénicité potentielle : (i) contribuer à développer une méthodologie harmonisée pour évaluer les propriétés d'adjuant des protéines nouvellement exprimées dans les PGM et (ii) développer des outils permettant de quantifier les allergènes proposés comme marqueurs d'une modification de l'allergénicité de la PGM ou de ses produits dérivés liée à la modification génétique.
- évaluation nutritionnelle : pousser davantage les investigations dans les études d'alimentarité sur poulet, en réalisant des prélèvements de sang et de tissus, ainsi que des autopsies systématiques dont les résultats détermineront la réalisation ou non d'analyses histologiques et hématobiochimiques sur les échantillons de sang et de tissus.

Le président propose une étape formelle de validation avec délibération et vote. Il rappelle que chaque expert donne son avis et peut exprimer une position divergente ou une abstention.

Les experts endosseront à l'unanimité les conclusions de l'expertise du groupe de travail relative à des propositions pour améliorer l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes génétiquement modifiées, au regard notamment du développement de plantes génétiquement modifiées contenant des événements de transformation empilés

⁵ Anses. 2011. Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM. Avis de l'Anses, rapport d'expertise collective, 95 pages.