

Règlement ministériel du 1^{er} décembre 1994 modifiant l'annexe du règlement grand-ducal du 27 octobre 1988 portant fixation de lignes directrices pour l'évaluation des additifs dans l'alimentation des animaux.

*Le Ministre de l'Agriculture,
de la Viticulture
et du Développement rural,
Le Ministre de la Santé,*

Vu le règlement grand-ducal du 27 octobre 1988 portant fixation de lignes directrices pour l'évaluation des additifs dans l'alimentation des animaux;

Vu la directive no 94/40/CE de la Commission, du 22 juillet 1994, modifiant la directive 87/153/CEE du Conseil portant fixation de lignes directrices pour l'évaluation des additifs dans l'alimentation des animaux;

Arrêtent:

Art. 1^{er}. L'annexe du règlement grand-ducal du 27 octobre 1988 portant fixation de lignes directrices pour l'évaluation des additifs dans l'alimentation des animaux est remplacée par l'annexe du présent règlement.

Art. 2. Le présent règlement sera publié au Mémorial.

Luxembourg, le 1^{er} décembre 1994.

*Le Ministre de l'Agriculture,
de la Viticulture
et du Développement rural,
Marie-Josée Jacobs
Le Ministre de la Santé,
Johny Lahure*

Dir. 94/40/CE.

ANNEXE

LIGNES DIRECTRICES POUR L'ÉVALUATION DES ADDITIFS DESTINÉS À L'ALIMENTATION ANIMALE

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Les présentes lignes directrices constituent un guide destiné à établir les dossiers des substances et préparations faisant l'objet d'une demande d'autorisation d'emploi comme additifs dans les aliments des animaux. Ces dossiers doivent permettre d'évaluer les additifs dans l'état actuel des connaissances et de s'assurer qu'ils répondent aux principes fondamentaux imposés pour leur admission et faisant l'objet des dispositions de l'article 7 paragraphe 2 de la directive 70/524/CEE.

Toutes les études indiquées dans ces lignes directrices pourront être requises et, si cela est nécessaire, des compléments d'information seront demandés. En règle générale, les études visant à établir l'identité, les conditions d'emploi, les propriétés physico-chimiques, les méthodes de contrôle et l'efficacité de l'additif, ainsi que son métabolisme et ses effets biologiques et toxicologiques chez les espèces cibles devront être fournies. Lorsque l'additif est destiné à une catégorie d'animaux appartenant à une espèce définie, ces études devront être faites sur cette catégorie cible. Les études nécessaires à l'évaluation des risques pour la santé humaine et pour l'environnement dépendront essentiellement de la nature de l'additif et des circonstances de son emploi. À cet égard, aucune règle stricte ne prévaudra.

Il n'est pas toujours justifié de soumettre les additifs destinés exclusivement aux aliments pour animaux familiers à un ensemble d'épreuves de toxicité chronique, de mutagenèse et de cancérogenèse aussi exhaustif que celui exigé pour les additifs destinés à l'alimentation des animaux de rente dont les produits sont destinés à la consommation humaine. Pour déterminer la toxicité chronique, les essais effectués pendant une durée d'un an sur deux espèces cibles ou bien sur une espèce cible et le rat sont généralement suffisants. On peut généralement renoncer à effectuer des essais de mutagenèse et de cancérogenèse lorsque ni la composition chimique, ni l'expérience acquise lors de l'utilisation, ni d'autres facteurs ne permettent de déceler d'indice d'altération. Dans le cas des animaux familiers, on peut renoncer à l'analyse des résidus.

La connaissance du métabolisme de l'additif chez les animaux de rente, ainsi que celle des résidus et de leur biodisponibilité sont essentielles. Elles doivent permettre de déterminer notamment l'étendue des études toxicologiques à poursuivre sur des animaux de laboratoire en vue d'évaluer les risques éventuels pour le consommateur. Cette évaluation ne pourra en aucun cas être fondée sur des données limitées aux effets directs de l'additif sur des animaux de laboratoire. Celles-ci ne sauraient fournir des informations spécifiques sur les effets réels des résidus résultant du métabolisme chez les espèces auxquelles l'additif est destiné.

Toute demande d'admission d'un additif ou d'un nouvel usage d'un additif sera basée sur un dossier constitué de rapports détaillés, présentés dans l'ordre et selon la numérotation proposée dans les lignes directrices. L'absence dans le dossier de toute donnée prévue devra être motivée. Les publications citées en référence seront annexées. Les rapports d'expérimentation comprendront le plan, le numéro de référence et les dates de début et de fin de l'expérimentation, la description détaillée des essais, les résultats et leur analyse, ainsi que le nom, l'adresse et la signature de la personne responsable de l'étude. Chaque lot d'aliments utilisés dans les études expérimentales sur les animaux donnera lieu à une analyse de la concentration des substances actives selon une méthode reconnue comme appropriée et à un compte rendu des résultats analytiques. Ce compte rendu mentionnera, outre les doses individuelles mesurées dans chaque étude expérimentale, la date de celle-ci, le nom, l'adresse et la signature du responsable de ces contrôles. Il y aura lieu d'annexer aux rapports une attestation établie par le(s) laboratoire(s) ayant réalisé les essais, certifiant que ces essais ont été effectués selon les principes de bonnes pratiques de laboratoire conformément à la directive 87/18/CEE du Conseil, du 18 décembre 1986, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques⁽¹⁾.

La détermination des propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques sera effectuée à l'aide des méthodes fixées par la directive 67/548/CEE du Conseil, du 27 juin 1967, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses⁽²⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 93/105/CE de la Commission⁽³⁾, ou à l'aide de méthodes internationalement reconnues dans les milieux scientifiques. L'utilisation d'autres méthodes devra être justifiée.

(1) JO n° L 15 du 17. 1. 1987, p. 29.

(2) JO n° L 196 du 16. 8. 1967, p. 1.

(3) JO n° L 294 du 30. 11. 1993, p. 21.

Chaque dossier contiendra un résumé adéquat. Les dossiers des antibiotiques, des coccidiostatiques et autres substances médicamenteuses, des facteurs de croissance, des micro-organismes et/ou des préparations enzymatiques doivent, en outre, être assortis d'une monographie conforme au modèle figurant au chapitre V et permettant d'identifier et de caractériser l'additif concerné selon les dispositions de l'article 8 paragraphe 1 de la directive 70/524/CEE.

Dans les présentes lignes directrices, le terme « additif » se réfère aux substances actives ou aux préparations contenant des substances actives, dans l'état où elle seront incorporées aux prémélanges et aux aliments pour animaux. La substance active peut être une substance chimiquement spécifiée, un micro-organisme ou une préparation enzymatique.

Dans les présentes lignes directrices, l'expression « substances chimiquement spécifiées » désigne les substances pour lesquelles un nom chimique est attribué selon la nomenclature de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA).

Toute modification intervenant dans le procédé de fabrication ou la composition d'un additif, dans son domaine d'application ou ses conditions d'emploi devra être communiquée dans des délais raisonnables à la Commission par l'État membre qui lui a transmis le dossier. Ceci pourra nécessiter la présentation d'une documentation appropriée à une nouvelle évaluation. Ces exigences s'imposeront tout particulièrement dans le cas de produits obtenus à partir de micro-organismes dont le patrimoine génétique a été modifié ou qui se présentent sous forme de mutants naturels.

SOMMAIRE

- CHAPITRE I^{er} : Résumé des données du dossier
- CHAPITRE II : Identité, caractéristiques et conditions d'emploi de l'additif — Méthodes de contrôle
- CHAPITRE III : Études concernant l'efficacité de l'additif
 - 1. Études sur l'amélioration des caractéristiques des aliments pour animaux
 - 2. Études de l'influence exercée par les additifs sur la production animale
 - 3. Étude de la qualité des produits d'origine animale
- CHAPITRE IV : Études concernant la sécurité d'emploi de l'additif
 - 1. Études sur les espèces cibles
 - 1.1. Études toxicologiques de l'additif
 - 1.2. Études microbiologiques de l'additif
 - 1.3. Études du métabolisme et des résidus
 - 2. Études des résidus excrétés
 - 3. Études sur animaux de laboratoire
- CHAPITRE V : Modèle de monographie

CHAPITRE PREMIER

RÉSUMÉ DES DONNÉES DU DOSSIER

CHAPITRE II

IDENTITÉ, CARACTÉRISTIQUES ET CONDITIONS D'EMPLOI DE L'ADDITIF —
MÉTHODES DE CONTRÔLE

1. Identité de l'additif

- 1.1. Dénomination(s) commerciale(s) proposée(s).
- 1.2. Type d'additif en fonction de l'effet principal.
- 1.3. Composition qualitative et quantitative (substance active, autres composants, impuretés).
- 1.4. État physique, dimension des particules.
- 1.5. Procédé de fabrication, y compris tout traitement spécifique éventuel.

N.B. : Si la substance active est un mélange de composants actifs, chacun d'eux devant être clairement définissable, les principaux composants doivent être décrits séparément avec l'indication de leur proportion dans le mélange.

2. Spécifications concernant la substance active

- 2.1. Pour les substances chimiquement spécifiées : dénomination générique, dénomination chimique selon la nomenclature UICPA, autres dénominations et abréviations génériques internationales. Numéro CAS (Chemical Abstracts Service Number).

Pour les micro-organismes : dénomination et description taxonomique selon les codes internationaux de nomenclature. D'autres manuels de systématique internationalement reconnus peuvent aussi être utilisés⁽¹⁾.

Pour les préparations enzymatiques : dénomination selon les principales activités enzymatiques décrites par UIB/UICPA. Numéros EINECS et CAS.

- 2.2. Formule brute et formule développée, poids moléculaire. S'il s'agit de produits de fermentation, composition qualitative et quantitative des principaux composants.

Pour les micro-organismes : dénomination et lieu de la collection de culture où la souche est déposée, si possible dans une collection de la Communauté européenne, numéro de dépôt, modification génétique et toutes propriétés importantes pour son identification. En outre, origine, caractéristiques morphologiques et physiologiques appropriées, stades de développement, facteurs importants pouvant intervenir dans l'activité biologique du micro-organisme (en tant qu'additif), et autres données génétiques propres à l'identification. Nombre d'unités formant colonies (UFC) par gramme.

Pour les préparations enzymatiques : origine biologique (en cas d'origine microbienne : dénomination et lieu de la collection de culture où la souche est déposée, si possible dans une collection de la Communauté européenne, numéro de dépôt, modification génétique et toutes propriétés importantes pour son identification, y compris son identification génétique), activités à l'égard de substrats types appropriés, chimiquement purs ; autres propriétés physico-chimiques.

2.3. Degré de pureté

Composition qualitative et quantitative des impuretés.

Pour les micro-organismes : stabilité génétique et pureté des souches cultivées.

Pour les préparations enzymatiques :

- pureté, en mesurant le degré de contamination microbienne, les métaux lourds, l'absence de toxines provenant de l'organisme d'origine (par exemple : mycotoxines) démontrée par une méthode appropriée,
- absence d'activité antimicrobienne à la concentration utilisée dans l'aliment, démontrée par une méthode appropriée,
- composition du ou des composants non enzymatiques [en particulier les solides organiques totaux (SOT)⁽²⁾].

2.4. Propriétés pertinentes

Pour les substances chimiquement spécifiées : propriétés électrostatiques, point de fusion, point d'ébullition, température de décomposition, densité, tension de vapeur, solubilité dans l'eau et les solvants organiques, spectre de masse et d'absorption, et toute autre propriété physique pertinente.

⁽¹⁾ Tels que *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, *The Yeasts, a taxonomic study* de Lodder et Kreger van Rij, *Ainsworth and Bibby's Dictionary of the Fungi* de Hawksworth, Sutton et Ainsworth, ou *The Genus Aspergillus* de Raper et Fennell.

⁽²⁾ SOT (%) = 100 - (% cendres + % eau + % diluants et/ou additifs et ingrédients).

Pour les micro-organismes : propriétés pertinentes pour l'identification et pour l'utilisation prévue (par exemple : forme végétative ou sporulée, UFC par gramme).

Pour les préparations enzymatiques : valeur(s) optimale(s) de pH, température(s) optimale(s) et autres propriétés appropriées.

2.5. *Procédés de fabrication, de purification et milieux utilisés*

Variation de la composition des lots en cours de fabrication.

3. Propriétés physico-chimiques, technologiques et biologiques de l'additif

3.1. Stabilité (pour les micro-organismes : perte d'activité biologique, par exemple : viabilité), à l'égard des éléments du milieu environnant tels que lumière, température, pH, humidité et oxygène. Durée de conservation.

3.2. Stabilité (pour les micro-organismes : perte d'activité biologique, par exemple : viabilité) lors de la préparation des prémélanges et des aliments, notamment stabilité à la chaleur, à la pression et à l'humidité. Produits de décomposition éventuels.

3.3. Stabilité (pour les micro-organismes : perte d'activité biologique, par exemple : viabilité) au cours du stockage des prémélanges et des aliments dans les conditions définies. Durée de conservation.

Pour les préparations enzymatiques : informations sur la présence imprévue de produits provenant des réactions enzymatiques ou chimiques de la préparation enzymatique avec les ingrédients, ou de la dégradation de la préparation enzymatique au cours du stockage de l'aliment.

3.4. Autres propriétés physico-chimiques, technologiques ou biologiques appropriées, notamment aptitude à former des mélanges homogènes dans les prémélanges et les aliments, propriétés en matière de formation de poussière, et, pour les micro-organismes et/ou les préparations enzymatiques, estimation de la résistance à la dégradation ou de la perte d'activité biologique, dans le tractus digestif ou par des modèles de simulation *in vitro*.

3.5. Incompatibilités ou interactions physico-chimiques ou biologiques (par exemple avec des aliments, autres additifs autorisés ou des médicaments).

4. Conditions d'emploi de l'additif

4.1. Emplois prévus en alimentation animale (par exemple : espèces ou catégories d'animaux, type d'aliment pour animaux, périodes d'utilisation, temps de retrait).

4.2. *Contre-indications.*

4.3. Dosage proposé dans les prémélanges et les aliments :

- teneurs en substance active, exprimées en pourcentage pondéral pour les prémélanges et en mg/kg pour les aliments dans le cas de substances chimiquement spécifiées,
- en unités appropriées d'activité biologique, telles que UFC par gramme de produit pour les micro-organismes ou unités d'activité appropriées pour les préparations enzymatiques.

4.4. Autres emplois connus de la substance active ou de la préparation (dans les denrées alimentaires, en médecine humaine ou vétérinaire, en agriculture et dans l'industrie). Donner pour chaque emploi les dénominations commerciales, les indications et contre-indications du produit.

4.5. Si nécessaire, mesures de prévention des risques et moyens de protection lors de la fabrication et de l'utilisation.

5. Méthodes de contrôle

5.1. Description des méthodes appliquées pour établir les critères énoncés aux points 1.3, 2.3, 2.4, 2.5, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 et 4.3.

5.2. Description des méthodes d'analyse qualitative et quantitative destinées au contrôle de routine de l'additif dans les prémélanges et les aliments.

5.3. Description des méthodes d'analyse qualitative et quantitative destinées à identifier et mesurer les résidus d'additifs dans les produits animaux.

N.B. : La description de ces méthodes et leurs résultats seront accompagnés d'informations sur les taux de récupération, la spécificité, la sensibilité, les limites de détection, les interférences éventuelles, la reproductibilité et la méthode d'échantillonnage utilisée. Des étalons de la préparation et de la substance active devront être disponibles.

Pour les micro-organismes, on indiquera les méthodes de détection, de numération, d'identification et les marqueurs appropriés.

CHAPITRE III

ÉTUDES CONCERNANT L'EFFICACITÉ DE L'ADDITIF

1. Études sur l'amélioration des caractéristiques des aliments pour animaux

Ces études concernent les additifs technologiques tels que les agents anti-oxygène, conservateurs, les liants, les agents émulsifiants, stabilisants, gélifiants, etc., qui sont destinés à améliorer ou à stabiliser les caractéristiques des prémélanges et des aliments pour animaux. Certains micro-organismes et/ou préparations enzymatiques peuvent également être considérés comme additifs technologiques s'ils améliorent des caractéristiques pertinentes des aliments.

Il y aura lieu de mettre en évidence l'efficacité de l'additif à l'aide de critères appropriés dans les conditions d'emploi prévues, en comparant les aliments supplémentés avec des aliments non supplémentés et, éventuellement, des aliments contenant des additifs technologiques dont l'efficacité est connue.

Pour chaque étude, il faudra préciser la nature exacte des substances actives, des préparations, des prémélanges et des aliments examinés, le numéro de référence des lots, la concentration en substances actives dans les prémélanges et les aliments, les conditions d'essai (température, humidité, etc.), les dates et la durée des essais ainsi que les effets défavorables et autres incidents survenus au cours des essais.

2. Études de l'influence exercée par les additifs sur les productions animales

Ces études concernent les additifs zootechniques qui exercent des effets sur les productions animales. Les études indiquées ci-après, y compris la relation dose/réponse, se feront sur chaque espèce cible en comparaison avec des groupes d'animaux ne recevant pas d'aliments supplémentés et, éventuellement, des groupes d'animaux recevant des aliments contenant des additifs dont l'efficacité est connue.

Si la substance active est un mélange de composants actifs, il y a lieu de justifier la présence de chaque composant.

2.1. Pour les coccidiostatiques et autres substances médicamenteuses, il conviendra de s'attacher en premier lieu à mettre en évidence l'effet spécifique et, notamment, le pouvoir prophylactique (par exemple, morbidité, nombre d'ocystes, notation des lésions). Des informations concernant les effets sur l'efficacité alimentaire, sur la croissance des animaux ainsi que sur la quantité commercialisable et la qualité des produits animaux peuvent être jointes.

2.2. Pour les autres additifs zootechniques (incluant, le cas échéant, micro-organismes et/ou préparations enzymatiques), il conviendra de prévoir des informations concernant les effets sur l'efficacité alimentaire, la croissance de l'animal, le rendement et les caractéristiques des produits animaux, le bien-être des animaux ainsi que d'autres paramètres ayant une influence positive sur les productions animales.

2.3. Conditions expérimentales

Il faudra donner une description des essais effectués et présenter les résultats sous une forme individuelle et détaillée. Il y aura lieu d'établir un rapport sur l'analyse statistique et d'indiquer les méthodes employées. Les données suivantes devront être précisées :

- 2.3.1. l'espèce, la race ou la souche, l'âge et le sexe des animaux, leur mode d'identification ;
- 2.3.2. le nombre de groupes traités et non traités, le nombre d'animaux dans chaque groupe ; le nombre des animaux des deux sexes doit être suffisant pour permettre une analyse statistique valide ;
- 2.3.3. la concentration de la substance active (et des substances éventuellement mises en comparaison) dans les aliments, établie par une analyse de contrôle selon la méthode reconnue comme appropriée ; le numéro de référence des lots utilisés ; la composition nutritionnelle qualitative et quantitative de la ration ;
- 2.3.4. le lieu de chaque expérimentation, l'état physiologique et sanitaire des animaux ainsi que les différentes conditions d'alimentation et d'élevage selon les pratiques en usage dans la Communauté ; le contrôle des aliments et les dispositions prises en vue de prévenir une contamination des groupes non traités durant l'expérimentation (et notamment, pour les micro-organismes, la contamination croisée des aliments par ceux-ci) ;
- 2.3.5. les dates et la durée exacte des essais, les dates et la nature des examens pratiqués ;
- 2.3.6. les effets défavorables et autres incidents survenus au cours des essais et le moment de leur apparition.

3. Étude de la qualité des produits d'origine animale

Étude des qualités organoleptiques, nutritionnelles, hygiéniques et technologiques des produits provenant d'animaux ayant reçu une alimentation contenant l'additif.

ÉTUDES CONCERNANT LA SÉCURITÉ D'EMPLOI DE L'ADDITIF

Les études indiquées dans ce chapitre sont destinées à évaluer :

- la sécurité d'emploi de l'additif pour les espèces cibles,
- les risques dus à l'inhalation et au contact avec la peau, les muqueuses et les yeux chez les personnes appelées à manipuler l'additif en l'état ou incorporé aux prémélanges ou aux aliments,
- les risques pour le consommateur pouvant résulter de la consommation de denrées alimentaires contenant des résidus de l'additif ou de ses métabolites,
- les risques de contamination ou de persistance dans l'environnement dus à l'additif proprement dit ou à ses produits de dégradation excrétés par les animaux,
- les risques éventuels pour des espèces autres que les espèces cibles.

Ces études seront imposées dans leur totalité ou en partie selon la nature de l'additif et les conditions d'emploi proposées.

Comme principe général il est établi que les micro-organismes et/ou les préparations enzymatiques ne doivent pas provenir ou être constitués de micro-organismes pathogènes ou toxigènes pour les espèces cibles ou pour l'homme dans les conditions d'emploi prévues.

Pour les micro-organismes et/ou les préparations enzymatiques, des tests de sécurité appropriés doivent être effectués, sauf s'il est fourni une autre documentation satisfaisante quant à la sécurité de leur emploi. Pour les micro-organismes, il doit être pratiqué au moins une étude de tolérance chez l'espèce cible.

En principe, pour les enzymes provenant de produits comestibles animaux ou végétaux, des études toxicologiques ne sont pas obligatoires ; si, au contraire, ces produits ne sont généralement pas considérés comme faisant partie de la ration alimentaire habituelle, certains essais toxicologiques peuvent être nécessaires.

Si la substance active est chimiquement spécifiée, la connaissance de son métabolisme chez les différentes espèces cibles, ainsi que de la composition et de la biodisponibilité de ses résidus tissulaires sera déterminante pour définir l'étendue des études à entreprendre sur des animaux de laboratoire pour évaluer les risques pour le consommateur.

Par ailleurs, la connaissance de la composition et des propriétés physico-chimiques et biologiques des produits excrétés provenant de l'additif sera indispensable pour définir les limites des études destinées à évaluer les risques de contamination de l'environnement ou de persistance dans celui-ci.

1. Études sur les espèces cibles

1.1. *Études toxicologiques de l'additif*

Essais de tolérance.

Étude des effets biologiques, toxicologiques, macroscopiques et histologiques. Détermination de la marge de sécurité entre la dose maximale proposée et la dose entraînant des effets défavorables. La valeur de cette marge pourra être minimale ou approximative, s'il est prouvé que la dose entraînant des effets défavorables excède largement la dose maximale d'emploi proposée.

1.2. *Études microbiologiques de l'additif*

1.2.1. Dans le cas d'une substance active chimiquement spécifiée et possédant une activité antimicrobienne à la concentration à laquelle elle se trouve dans l'aliment, il faudra fournir des études du spectre d'activité antibactérienne de l'additif par évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur différentes espèces bactériennes pathogènes et non pathogènes, Gram négatives et Gram positives.

1.2.2. Études de la résistance croisée aux antibiotiques thérapeutiques par évaluation de la concentration minimale inhibitrice sur des mutants produits *in vitro* présentant une résistance chromosomique à l'additif. Dans le cas de micro-organismes résistants à des antibiotiques thérapeutiques, il faudra démontrer l'origine génétique de cette résistance.

1.2.3. Études visant à déterminer si l'additif peut sélectionner des facteurs de résistance. Ces études doivent être effectuées dans des conditions proches du terrain sur les espèces animales auxquelles l'additif est destiné en premier lieu. Il convient d'examiner ensuite si les facteurs « R » qui auront été éventuellement trouvés sont porteurs d'une résistance multiple et s'ils sont transférables.

1.2.4. Études visant à évaluer l'effet de l'additif sur :

- la microflore du tube digestif,
- la colonisation du tube digestif, s'il s'agit d'un micro-organisme ou d'un mélange de plusieurs souches de micro-organismes,
- la dissémination ou l'excrétion de micro-organismes pathogènes, si la substance active chimiquement spécifiée montre une activité antimicrobienne.

1.2.5. Dans le cas où la substance active montre une activité antimicrobienne, il faudra fournir des études de terrain visant à contrôler la proportion de bactéries résistantes à l'additif. Ces études doivent être effectuées à des intervalles assez longs, avant, pendant et après (un mois) l'utilisation de l'additif.

1.2.6. Si la substance active est un micro-organisme, il conviendra d'étudier s'il est résistant aux antibiotiques.

1.2.7. Si la substance active (par exemple : préparations enzymatiques) est produite par un micro-organisme, il faudra déterminer la concentration en micro-organismes producteurs viables.

1.2.8. Si l'additif contient ou consiste en un organisme génétiquement modifié au sens des paragraphes 1 et 2 de l'article 2 de la directive 90/220/CEE, il faudra fournir les informations suivantes :

- une copie de tout (tous) consentement(s) écrit(s) des autorités compétentes pour la dissémination volontaire des organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, à des fins de recherche et de développement, conformément à l'article 6 paragraphe 4 de la directive 90/220/CEE et le résumé de la notification visé à l'article 9 de ladite directive, établi conformément au modèle annexé à la décision 91/596/CEE⁽¹⁾ du Conseil,
- le dossier technique complet contenant : les informations requises à l'annexe II de la directive 90/220/CEE, élargies, si besoin est, pour tenir compte des différents lieux d'utilisation de l'additif ; les informations sur les données et les résultats obtenus dans le contexte des disséminations aux fins de recherche et de développement concernant les écosystèmes pouvant être affectés par l'utilisation de l'additif ; l'évaluation des risques pour la santé humaine, la santé animale et l'environnement en liaison avec le ou les organismes génétiquement modifiés (OGM) contenus dans le produit et les informations obtenues au stade de la recherche et du développement en ce qui concerne l'incidence de la dissémination sur la santé humaine et l'environnement,
- les conditions de la mise sur le marché de l'additif, notamment les conditions d'utilisation et de maniement spécifiques et une proposition d'étiquetage et d'emballage devant comprendre au moins les informations visées à l'annexe III de la directive 90/220/CEE.

Si, sur la base d'une dissémination notifiée conformément à la partie B de la directive 90/220/CEE ou à l'appui de raisons scientifiques effectives et motivées, la personne chargée du dossier estime que la mise sur le marché ou l'utilisation de l'additif ne présente pas de risque pour la santé humaine, la santé animale et l'environnement, elle peut proposer qu'il ne soit pas tenu compte d'une ou plusieurs des conditions de l'annexe III B.

Toute information sur des données ou résultats relatifs à des disséminations du même OGM ou de la même combinaison d'OGM précédemment notifiées ou en cours de notification et/ou réalisées par la personne chargée du dossier à l'intérieur ou à l'extérieur de la Communauté doit être communiquée.

D'autres données ou résultats provenant de notifications précédemment soumises par d'autres personnes peuvent également être cités, à condition que ces dernières y aient consenti par écrit.

1.3. *Études du métabolisme et des résidus⁽²⁾ ⁽³⁾ (dans le cas des substances actives chimiquement spécifiées)*

1.3.1. Étude du métabolisme :

- bilan métabolique : taux et importance de l'absorption et de l'élimination de la substance active,
- identification des principaux métabolites et des voies métaboliques,
- distribution et excrétion (biliaire, urinaire, fécale) des métabolites,
- influence éventuelle de la microflore de l'intestin et du rumen, du cycle entérohépatique et de la caecotrophie sur le métabolisme.

1.3.2. Étude analytique des résidus : composition qualitative et quantitative des résidus (substance active, métabolites) dans les différents produits comestibles provenant de l'animal, après équilibre métabolique et dans les conditions pratiques d'emploi de l'additif.

⁽¹⁾ JO n° L 322 du 23. 11. 1991, p. 1.

⁽²⁾ Les études visées aux points 1.3.1, 1.3.3 et 1.3.4 seront faites à l'aide de molécules marquées ou selon d'autres méthodes appropriées ; le choix de la méthode utilisée doit être justifié dans chaque cas. Le marquage devra être approprié à l'objectif recherché.

⁽³⁾ Lorsqu'il s'agit d'une substance active produite par fermentation, ces études devront s'étendre aux substances apparentées à la substance active, issues du procédé de production.

- 1.3.3. Étude cinétique des résidus (après ingestion répétée de l'additif selon l'emploi proposé) : persistance de la substance active et des principaux métabolites dans les différents organes et tissus après retrait de l'aliment supplémentaire.
- 1.3.4. Étude de la biodisponibilité des résidus dans les produits comestibles provenant de l'animal (point 3.7).
- 1.3.5. Méthodes de contrôle : description des méthodes de détermination qualitative et quantitative utilisées dans les études requises aux points 1.3.1 à 1.3.4 avec indication des taux de récupération, de la spécificité et des limites de détection. Les méthodes d'analyse des résidus doivent être assez sensibles pour permettre de détecter les résidus à des niveaux toxicologiquement négligeables.

2. Études des résidus excrétés (dans le cas des substances actives chimiquement spécifiées)

- 2.1. Nature et concentration des résidus provenant de l'additif (substance active, métabolites) dans les excréments.
- 2.2. Persistance (durée de demi-vie) et cinétique d'élimination de ces résidus dans les lisiers, les fumiers et les litières.
- 2.3. Effets sur la méthanogénèse.
- 2.4. Dégradation, persistance (durée de demi-vie) et cinétique d'élimination dans les sols (divers types de sols).
- 2.5. Effets sur la faune du sol et les processus microbiens de transformation (par exemple : décomposition des résidus végétaux et animaux).
- 2.6. Effets sur les végétaux terrestres (par exemple : germination des semences, croissance des plantes, absorption par les plantes). Ces études doivent être effectuées sous abri ou en plein champ sur différentes espèces végétales.
- 2.7. Solubilité et stabilité dans l'eau des produits dérivés de l'additif (substance active, métabolites).
- 2.8. *Effets sur la vie aquatique :*
 - 2.8.1. effets sur la flore (par exemple : *Chlorella*);
 - 2.8.2. toxicité sur les invertébrés (par exemple : *Daphnia magna*);
 - 2.8.3. toxicité sur les poissons (deux espèces au moins choisies parmi les espèces sauvages vivant sur le territoire de la Communauté).

3. Études sur animaux de laboratoire

Ces études doivent porter sur la substance active et sur ses principaux métabolites ou produits si ces derniers sont présents dans les produits animaux comestibles et sont biodisponibles. Dans la mesure du possible, on s'efforcera de choisir des animaux de laboratoire capables de digérer et de métaboliser l'additif de façon similaire à l'homme ou aux espèces animales cibles.

Une description complète des essais effectués doit être donnée en précisant l'espèce et la souche des animaux utilisés, la taille et le nombre de groupes traités et de groupes témoins, les doses administrées, la composition du régime alimentaire et les résultats d'analyse des aliments, les conditions d'élevage, la durée exacte des essais, les dates des différents examens effectués et des mortalités. Les phénomènes pathologiques macroscopiques et histopathologiques observés chez les animaux d'essai, ainsi que l'indication du moment de l'apparition de toutes les lésions pathologiques, doivent faire l'objet de rapports exhaustifs. Tous les résultats et leur évaluation statistique doivent être présentés en détail.

- 3.1. *Toxicité aiguë (ne concerne pas les micro-organismes)*
 - 3.1.1. Des études de toxicité aiguë par voie orale doivent être effectuées sur deux espèces animales dont l'une sera, de préférence, le rat. La dose maximale ne devrait pas dépasser 2 000 mg/kg de poids corporel. Des observations détaillées devront être données sur les effets biologiques observés au cours d'une période de deux semaines au moins après l'ingestion. Ces études ne concernent pas les préparations enzymatiques.
 - 3.1.2. Des études de toxicité aiguë par inhalation, du pouvoir irritant pour la peau et, si nécessaire, pour les muqueuses, ainsi que du potentiel allergénique, doivent être effectuées à l'aide d'essais appropriés à l'évaluation des risques éventuels associés à la manipulation de l'additif.
- 3.2. *Mutagenèse*
 - 3.2.1. Dans le cas d'une substance active chimiquement spécifiée

Afin d'identifier les substances actives ou leurs métabolites ou produits possédant des propriétés mutagènes, il faut effectuer une combinaison sélective d'essais de mutagenèse reposant sur différents mécanismes génétiques. Ces essais doivent être pratiqués pour l'activation métabolique en présence et en l'absence d'une préparation de microsomes de mammifères.

L'ensemble des essais indiqués ci-après est recommandé :

- a) un essai de mutations géniques en système procaryote ;
- b) un essai de mutations géniques en système eucaryote *in vitro* ou un essai létal récessif associé au sexe sur *Drosophila melanogaster* ;
- c) un essai d'aberrations chromosomiques *in vitro* et *in vivo*.

Toutefois, cette proposition de combinaison d'essais n'implique pas que ces essais soient les seuls à convenir ou que d'autres essais, notamment des essais *in vivo*, ne seraient pas acceptables comme solutions de rechange.

Dans tous les cas, il y a lieu d'indiquer les raisons du choix effectué. Les essais doivent être réalisés conformément à des procédures établies et validées. D'après les résultats obtenus et compte tenu du profil toxicologique général de la substance ainsi que de l'usage auquel elle est destinée, des examens complémentaires peuvent être indiqués.

- 3.2.2. Dans le cas de préparations enzymatiques provenant de micro-organismes, les essais suivants sont normalement requis :

- a) un essai de mutation génique sur bactéries ;
- b) un essai d'aberrations chromosomiques (de préférence *in vitro*).

Les essais toxicologiques doivent, si possible, être réalisés sur un lot provenant du produit de fermentation purifié final avant addition de supports, de diluants ou d'autres substances. Ces essais doivent généralement être réalisés selon les lignes directrices établies⁽¹⁾ par des organismes internationalement reconnus.

Toutefois, en raison des effets exercés au niveau cellulaire par la nature protidique et/ou des activités enzymatiques de certaines préparations enzymatiques, des modifications des protocoles d'essais types, particulièrement dans le cas des essais *in vitro*, peuvent être nécessaires. De tels écarts sont acceptables s'ils sont valablement motivés.

Le système d'essai est conçu pour déceler des réactions toxiques non spécifiées et révéler des effets génotoxiques. Les informations combinées fournies par les spécifications générales et la présente série d'essais permettent d'évaluer la présence de toxines spécifiques connues ainsi que de composés toxiques inconnus.

Le rapport toxicologique doit contenir une documentation probante indiquant que les essais ont été réalisés avec une matière constituant la base du produit commercial décrit dans le dossier technique.

3.3. Aspects pharmacocinétiques

Dans le cas des substances actives chimiquement spécifiées, des études du bilan ainsi que l'identification des métabolites doivent être effectuées à l'aide de molécules marquées de façon adéquate ou d'autres techniques appropriées et après administration de doses uniques et multiples de la substance active pendant une période convenable. Les études du métabolisme doivent comprendre celles de la pharmacocinétique de la substance active et des principaux métabolites. On tiendra compte des différences de métabolisme de la substance active existant entre les différentes espèces pour le choix de l'espèce la plus utile pour les recherches toxicologiques ultérieures.

3.4. Toxicité subchronique

En général, ces études doivent être effectuées sur deux espèces animales dont l'une sera, de préférence, le rat. La seconde espèce pourra être, dans certains cas, une espèce cible. La substance doit être administrée par voie orale et une relation dose/réponse doit être établie. La durée de l'essai chez les rongeurs doit être d'au moins quatre-vingt-dix jours.

Dans certains cas, des études d'une durée de six mois à deux ans sur des animaux non rongeurs seront souhaitables en vue d'établir la variation de sensibilité de différentes espèces animales à la substance concernée.

Ces études ne sont pas applicables aux micro-organismes. Dans le cas de préparations enzymatiques provenant de micro-organismes, un essai de toxicité orale de quatre-vingt-dix jours sur une espèce de rongeur peut être suffisant.

3.5. Toxicité chronique/cancérogénèse

Les études de toxicité chronique doivent être effectuées sur une espèce de rongeur (de préférence le rat), les études de cancérogénèse de préférence sur deux espèces de rongeur. La substance doit être administrée par voie orale à différentes doses. On peut également effectuer une étude combinée de toxicité chronique/cancérogénèse avec exposition *in utero*. Les essais doivent se poursuivre durant au moins vingt-quatre mois chez le rat et dix-huit mois chez la souris. Si l'expérimentation s'étend au-delà de la période minimale prévue, elle s'achève lorsque le nombre d'animaux survivants de chaque groupe, à l'exception de celui ayant reçu la plus forte dose, est réduit à 20 %.

⁽¹⁾ Telles que :

— présentation d'une demande d'évaluation d'un additif alimentaire avant son autorisation, 1989 (ISBN 92-826-0135-B),
— rapport du comité scientifique de l'alimentation humaine concernant les lignes directrices relatives à l'évaluation de la sécurité des additifs alimentaires, 1980, dixième série de rapports (EUR 6892).

Des examens de chimie clinique, hématologiques et urinaires complets doivent être effectués à des intervalles appropriés pendant toute la durée de l'expérimentation. Des examens macroscopiques et histologiques complets doivent être effectués chez tous les animaux morts durant l'essai et chez tous les animaux survivants à l'issue de l'essai.

Ces études ne sont pas applicables aux micro-organismes et aux préparations enzymatiques.

3.6. *Effets toxiques concernant la reproduction* (dans le cas des substances actives chimiquement spécifiées)

Les études sur la reproduction doivent être effectuées de préférence sur le rat. Elles doivent s'étendre sur au moins deux générations en ligne directe et peuvent être combinées avec des études d'embryotoxicité, incluant la tératogénèse.

Tous les paramètres concernant la fertilité, la gestation, la parturition et la période péri- et postnatale doivent être soigneusement étudiés et rapportés. Les études spécifiques de tératogénèse doivent être effectuées sur au moins deux espèces animales appropriées.

3.7. *Toxicologie des métabolites* (dans le cas des substances actives chimiquement spécifiées)

Des documents relatifs au calcul de la concentration des résidus doivent être présentés en vue de l'évaluation des risques pour l'homme.

Les bases pour le calcul des temps d'attente proposés doivent être fournies. Les études mentionnées au point 1.3.4 doivent être effectuées sur des animaux de laboratoire.

3.8. *Autres études appropriées*

On pourra présenter toute autre étude spécifique susceptible d'apporter des compléments d'information utiles à l'évaluation de la substance concernée, par exemple des études sur la biodisponibilité, la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

CHAPITRE V

MODÈLE DE MONOGRAPHIE

1. **Identité de l'additif**

1.1. Dénomination(s) commerciale(s) proposée(s).

1.2. Type d'additif en fonction de l'effet principal.

1.3. Composition qualitative et quantitative (substance active, autres composants, impuretés).

1.4. État physique, dimension des particules.

1.5. Traitement spécifique éventuel.

N.B. : Si la substance active est un mélange de composants actifs, chacun d'eux devant être clairement définissable, les principaux composants doivent être décrits séparément avec l'indication de leur proportion dans le mélange.

2. **Spécifications concernant la substance active**

2.1. Pour les substances chimiquement spécifiées : dénomination générique, dénomination chimique selon la nomenclature UICPA, autres dénominations et abréviations génériques internationales. Numéro CAS (Chemical Abstract Service Number).

Pour les micro-organismes : dénomination et description taxonomique selon les codes internationaux de nomenclature. D'autres manuels de systématique internationalement reconnus peuvent aussi être utilisés⁽¹⁾.

Pour les préparations enzymatiques : dénomination selon les principales activités enzymatiques décrites par UIB/IUCPA. Numéros EINECS et CAS.

2.2. Formule brute et formule développée, poids moléculaire. S'il s'agit de produits de fermentation, composition qualitative et quantitative des principaux composants.

Pour les micro-organismes : dénomination et lieu de la collection de culture, où la souche est déposée, si possible dans une collection de la Communauté européenne, numéro de dépôt ; modification génétique et toutes propriétés importantes pour son identification.

Pour les préparations enzymatiques : origine biologique (en cas d'origine microbienne : dénomination et lieu de la collection de culture où la souche est déposée, si possible dans une collection de la Communauté européenne, numéro de dépôt, modification génétique et toutes propriétés importantes pour son identification, y compris son identification génétique), activités à l'égard de substrats types appropriés, chimiquement purs ; autres propriétés physicochimiques.

2.3. *Degré de pureté*

Composition qualitative et quantitative des impuretés.

Pour les micro-organismes : stabilité génétique et pureté des souches cultivées.

Pour les préparations enzymatiques :

— pureté [mesure du degré de contamination microbienne, des métaux lourds, de l'absence de toxines (par exemple : mycotoxines) provenant de l'organisme d'origine, démontrée par une méthode appropriée],

⁽¹⁾ Tels que « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* », « *The Yeasts, a taxonomic study* » de Lodder et Kreger van Rij, « *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* » de Hawksworth, Sutton et Ainsworth, ou « *The Genus Aspergillus* » de Raper et Fennel.

- absence d'activité antimicrobienne à la concentration utilisée dans l'aliment, démontrée par une méthode appropriée,
- composition du ou des composants non enzymatiques [en particulier les solides organiques totaux (SOT)].

2.4. *Propriétés pertinentes*

Pour les substances chimiquement spécifiées : propriétés électrostatiques, point de fusion, point d'ébullition, température de décomposition, densité, tension de vapeur, solubilité dans l'eau et les solvants organiques, spectre de masse et d'absorption, et toute autre propriété physique pertinente.

Pour les micro-organismes : propriétés pertinentes pour l'identification et pour l'utilisation prévue (par exemple : forme végétative ou sporulée, UFC par gramme).

Pour les préparations enzymatiques : valeur(s) optimale(s) de pH, température(s) optimale(s) et autres propriétés appropriées.

3. **Propriétés physico-chimiques et technologiques et biologiques de l'additif**

- 3.1. Stabilité (pour les micro-organismes : perte d'activité biologique, par exemple : viabilité) à l'égard des éléments du milieu environnant tels que lumière, température, pH, humidité et oxygène. Durée de conservation.
- 3.2. Stabilité (pour les micro-organismes : perte d'activité biologique, par exemple : viabilité) lors de la préparation des prémélanges et des aliments, notamment stabilité à la chaleur, à la pression et à l'humidité. Produits de décomposition éventuels.
- 3.3. Stabilité (pour les micro-organismes : perte d'activité biologique, par exemple : viabilité) au cours du stockage des prémélanges et des aliments dans des conditions définies. Durée de conservation.
- 3.4. Autres propriétés physico-chimiques et technologiques et biologiques pertinentes, notamment aptitude à former des mélanges homogènes dans les prémélanges et les aliments, propriétés en matière de formation de poussières et pour les micro-organismes et/ou préparations enzymatiques, évaluation de la résistance à la dégradation ou de la perte d'activité biologique dans le tube digestif ou par des modèles de simulation *in vitro*.
- 3.5. Incompatibilités ou interactions physico-chimiques ou biologiques (avec des aliments, d'autres additifs autorisés ou des médicaments, etc.).

4. **Méthodes de contrôle**

- 4.1. Description des méthodes appliquées pour déterminer les critères énoncés aux points 1.3, 2.3, 2.4, 3.1, 3.2, 3.3 et 3.4 du présent chapitre.
- 4.2. Description des méthodes d'analyse qualitative et quantitative destinées à identifier et mesurer les résidus d'additif dans les produits animaux.
- 4.3. Si lesdites méthodes ont été publiées, il suffira d'indiquer les références bibliographiques et de fournir les tirés à part correspondants.

5. **Propriétés biologiques de l'additif**

- 5.1. Pour les coccidiostatiques et autres substances médicamenteuses, indication des effets prophylactiques (par exemple morbidité, nombre d'oocystes et notation des lésions).
- 5.2. Pour les additifs zootechniques autres que ceux énumérés au point 5.1, en incluant, le cas échéant, les micro-organismes et/ou les préparations enzymatiques, indication des effets sur l'efficacité alimentaire, la croissance de l'animal, le rendement et les caractéristiques des produits animaux, le bien-être des animaux ainsi que d'autres paramètres ayant une influence positive sur les productions animales.
- 5.3. Contre-indications ou avertissements éventuels, y compris les incompatibilités biologiques, avec leur justification.

6. **Indication qualitative et quantitative des résidus éventuels dans les produits d'origine animale dans les conditions d'emploi envisagées.**

7. **Autres caractéristiques pertinentes pour l'identification de l'additif.**