

AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

COLLOQUE SCIENTIFIQUE

**Biotechnologies  
de la reproduction animale  
et sécurité sanitaire des aliments**

*Journée organisée sous la présidence  
du Professeur Michel Thibier*

**29 septembre 1999  
Paris**

AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

23, avenue du Général-de-Gaulle – BP 19  
94701 Maisons-Alfort cedex

Paris, 29 septembre 1999

AFSSA – Biotechnologies de la reproduction animale et sécurité sanitaire des aliments

**AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS**

**COLLOQUE SCIENTIFIQUE**

**Paris, le 29 septembre 1999**

**Biotechnologies  
de la reproduction animale  
et sécurité sanitaire  
des aliments**

**Président du Colloque**

**Professeur Michel THIBIER**



# Sommaire

Mot d'accueil <i>Martin Hirsch</i> .....	5
Introduction du séminaire <i>Michel Thibier</i> .....	7
<b>Première session : les biotechnologies de la reproduction</b> <i>Modérateur : Michel Thibier</i> .....	9
Utilisation de l'insémination artificielle et du transfert embryonnaire en France, leur impact sur la limitation des problèmes sanitaires <i>Patrice Humblot (UNCEIA)</i> .....	11
Utilisation des biotechnologies de la reproduction de troisième génération (fécondation <i>in vitro</i> ) et sécurité sanitaire <i>Bernard Guérin et Brigitte Le Guienne (UNCEIA)</i> .....	15
Production de mammifères domestiques par clonage <i>Jean-Paul Renard (INRA)</i> .....	23
La transgénèse animale <i>Louis-Marie Houdebine (INRA)</i> .....	29
<b>Discussion de la première session</b> .....	35
<b>Deuxième session : les aspects normatifs et réglementaires</b> <i>Modérateur : Cécile Lahellec</i> .....	43
Le Codex Alimentarius <i>Hubert Ferry-Wilczek (DGAI)</i> .....	45
La réglementation européenne et française <i>Stéphane Devillers (UNCEIA)</i> .....	49
Considérations d'ordre réglementaire concernant l'évaluation sanitaire des animaux transgéniques et l'évaluation de l'innocuité et la qualité des aliments : la position du Canada <i>Primal S. Silva et Barbara Buchanan (Agence canadienne d'inspection des aliments)</i> .....	55
<b>Discussion de la deuxième session</b> .....	61
<b>Troisième session : l'analyse des risques</b> <i>Modérateur : Ambroise Martin</i> .....	63
Y a-t-il des risques zoonotiques liés aux biotechnologies de la reproduction ? <i>Marc Eloit (ENVA)</i> .....	65
Les contaminants microbiens des cultures cellulaires <i>Florian Horaud (Institut Pasteur)</i> .....	73
Risque viral dans les produits biotechnologiques <i>Daniel Larzul (Institut Pasteur)</i> .....	79

La manipulation des génomes peut-elle conduire à la réactivation de pathogènes endogènes ? <i>Thierry Heidmann (IGR, Villejuif)</i> .....	83
<b>Discussion de la troisième session, risques microbiologiques</b> .....	89
Les risques pour l'environnement liés aux poissons transgéniques <i>Patrick Prunet et Pierre-Yves Le Bail (INRA)</i> .....	93
Analyse du risques nutritionnel et toxicologique lié à la consommation de produits animaux issus de nouvelles biotechnologies <i>Pierre Besançon (Université de Montpellier)</i> .....	99
Analyse du risque allergique des (nouveaux) aliments <i>Jean-Michel Wal, INRA</i> .....	103
<b>Discussion de la troisième session, autres risques</b> .....	111
<b>Discussion générale</b> .....	115

# Mot d'accueil

Martin HIRSCH

*Directeur général de l'AFSSA*

Mesdames et Messieurs,

Je suis heureux d'ouvrir cette journée de travail, ce séminaire scientifique, dont nous attendons beaucoup. Le programme est particulièrement dense, densité justifiée par les enjeux liés au sujet des « Biotechnologies de la reproduction animale et de la sécurité sanitaire des aliments ».

Vous me permettez de dire quelques mots des objectifs de la démarche que nous suivons aujourd'hui, qui illustre l'un des modes de travail de l'agence française de sécurité sanitaire, qui va, à la fin de la semaine, atteindre ses six mois d'existence.

L'agence a été créée pour permettre la meilleure mobilisation possible de l'expertise scientifique au service du renforcement de la sécurité sanitaire des aliments. Ses missions sont définies dans la loi du 1<sup>er</sup> juillet 1998. Sans reprendre ici la longue liste des tâches qui lui incombent, je reprendrai quelques principes qui ont présidé à sa création. De l'agence, est attendue :

- une capacité de veille scientifique et d'anticipation permettant de prévenir les risques ;
- une rigueur d'analyse reposant sur l'excellence scientifique ;
- une transparence dans les méthodes de travail ;

Ce sont ces trois principes que nous nous sommes efforcés de mettre en œuvre sur le thème qui nous réunit aujourd'hui :

- Par le choix du sujet d'abord. Ce n'est pas parce que l'AFSSA est parfois conduite à se prononcer dans l'urgence ou sur des questions ponctuelles, que doit être négligé le travail du fond, tel qu'il se poursuit dans ses laboratoires, ou comme il peut être mené en matière d'analyse de risques, par des réflexions prospectives. Il n'y avait pas d'actualité immédiate quand, au mois de mai dernier, j'ai proposé à Michel Thibier de conduire une réflexion sur les éventuels risques sanitaires qui pourraient être liés à la consommation des animaux issus des nouvelles techniques de reproduction, et notamment les techniques de clonage et de transgénèse. Il me semble que l'AFSSA est dans son rôle en s'efforçant d'apporter un éclairage sur ce sujet complexe.

- Par les compétences réunies dans cet amphithéâtre, ensuite. Je remercie tous ceux qui ont accepté de contribuer à cette réflexion ; la qualité et la diversité des intervenants montrent notre souhait de privilégier systématiquement la pluridisciplinarité et la collégialité. L'AFSSA, sans ces experts, sans ces compétences, n'est rien. Nous savons la difficulté de mobiliser des personnalités, toujours beaucoup sollicitées, pour une tâche qui vient se rajouter à toutes les autres. J'espère que tous ceux qui contribuent aux travaux engagés sous l'égide de l'Agence, savent notre reconnaissance pour leur apport irremplaçable.

- Par le déroulement de cette journée, dont Michel Thibier a eu l'idée enfin. Il nous a semblé qu'une réflexion de cette nature nécessitait qu'il y ait de larges échanges de vues entre scientifiques — C'est l'objectif d'aujourd'hui — mais pas seulement entre scientifiques. Il est fini le temps des cloisonnements ou des réflexions se mènent sur des chemins parallèles. Je dois souligner que le conseil scientifique de l'AFSSA a lui-même souhaité que cette journée soit une journée ouverte, notamment aux représentants des consommateurs comme à des journalistes, y compris à un stade préliminaire de la réflexion et alors même que nous n'avons pas aujourd'hui à présenter un produit fini mais à cheminer ensemble.

Voici les trois remarques que je souhaitais faire. Je souhaiterais, avant de vous laisser travailler, adresser quelques remerciements :

Je remercie tout d'abord Dominique Gillot, secrétaire d'État à la santé et à l'action sociale, de nous offrir l'hospitalité de l'amphithéâtre Pierre Laroque, en son ministère. L'agence a la chance d'avoir trois ministres et trois ministères de tutelle et se réjouit de pouvoir ainsi, lorsqu'elle ne les accueille pas chez elle, colloquer chez chacun d'entre eux.

Je remercie ensuite Michel Thibier qui, après avoir dirigé le CNEVA pendant 5 ans, a accepté d'animer l'une des premières thématiques de l'AFSSA, sur un sujet sur lequel il sera trop modeste pour vous dire combien il est légitime et compétent pour travailler.

Je remercie à nouveau tous ceux qui apportent leur pierre à cette construction et qui ont eu quelques devoirs de vacance supplémentaires. Vous comprendrez que j'adresse des remerciements particuliers à Monsieur Primal Silva d'être venu du Canada pour nous apporter l'expérience de son pays, qui a beaucoup travaillé sur ce sujet.

Je remercie également les équipes de l'AFSSA, notamment Carole Thomann, sans lesquels cette journée ne se serait pas tenue.

# Introduction

Michel THIBIER

Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 23, avenue du Général de Gaulle, F-94700 Maisons-Alfort

Le présent séminaire fait partie intégrante de la mission que m'a confiée Martin Hirsch, Directeur Général de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Cette mission a pour but d'établir un rapport sur l'analyse des risques susceptibles de résulter de la consommation d'animaux ou de produits animaux dérivés des biotechnologies de la reproduction. Cette heureuse initiative a pour but d'éclairer avec anticipation, les autorités nationales sur les conditions dans lesquelles les dernières générations de biotechnologies qui ne manqueront pas d'apparaître dans les cinq prochaines années, pourront entrer dans la chaîne alimentaire. La référence aux premières de ces générations qui sont en place dans le monde entier et pour certaines, depuis un demi-siècle sera à cet égard très instructif.

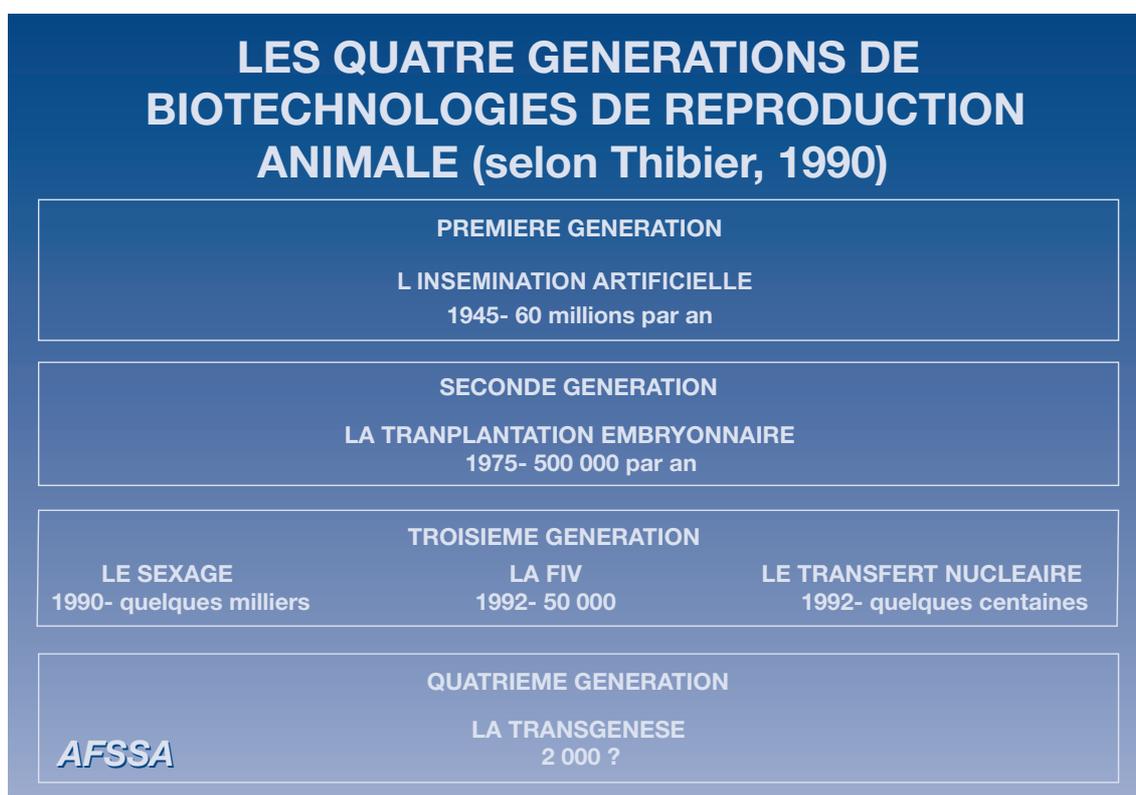
Après m'être entouré d'un petit groupe de spécialistes, dont la plupart interviendront d'ailleurs au cours de cette journée et que je remercie encore pour leur apport important à nos réflexions, j'ai donc proposé la tenue de ce séminaire.

Soyons sûrs de bien nous comprendre tout d'abord, quels sont les maître-mots de cette mission et qui vont constituer l'« ossature » de cette journée :

1. Les **Biotechnologies de la Reproduction** : de quelles biotechnologies s'agit-il ? Classiquement on distingue quatre générations (voir figure 1), depuis l'insémination artificielle (première) jusqu'à la transgénèse (quatrième) en passant par le transfert embryonnaire (deuxième), la fécondation *in vitro* et le transfert nucléaire (troisième génération). Elles se rapportent aux espèces de mammifères de rente, mais pas seulement car elles sont aussi pertinentes pour les oiseaux et les poissons. L'ensemble de ces espèces sera donc envisagé.

2. La **consommation**, tel est l'objet du risque que nous voulons expertiser ici, compte tenu des termes de référence et de la compétence de l'AFSSA d'une façon plus générale. Le groupe *ad hoc* et moi-même sommes rapidement tombés d'accord pour ne pas étendre à ce stade, le champ de la réflexion. Bien sûr, il y a des problèmes de nature éthique à considérer, bien sûr des questions de bien-être animal peuvent être posées et le sont déjà dans certains pays. Ces sujets pourront et devront être traités par ailleurs. L'impact sur l'environnement est une autre problématique qui n'est pas directement reprise par la question posée, il ne sera donc pas envisagé ici en tant que tel, il le sera néanmoins indirectement par l'aspect particulier de la filière « poisson ».

3. **L'analyse de risques**, enfin ; c'est, selon la définition désormais classique de cette analyse, *l'évaluation des risques* que nous développerons ici sur des argumentations aussi précises et rigoureuses que possible. Il est clair que beaucoup de questions vont être posées au cours de cette journée et c'est tout l'intérêt de celle-ci. Quelques réponses pourront être avancées concernant certaines de ces biotechnologies, ne serait-ce qu'en raison de leur existence depuis plusieurs décennies à travers le monde entier et avec un nombre immense de répétitions sans accident. Quelle est la nature potentielle des dangers auxquels le consommateur risque d'être confronté ? S'agit-il de risques de nature microbiologique au sens large, ayant pour origine des agents exogènes voire endogènes, s'agit-il de risques de nature toxicologique, allergique ? ou encore les valeurs nutritionnelles, organoleptiques ont-elles des raisons potentielles d'être modifiées ? A l'évidence il n'y a pas de réponse univoque et encore moins toute faite, pour l'ensemble des biotechnologies de la reproduction concernées. Ce sera sans doute un des mérites de ce séminaire de clarifier un certain nombre de points de confusion potentiels. Enfin, l'analyse de risques comprend un second chapitre d'importance, celui de *la gestion des risques*. Nous ne privilégierons pas à ce premier stade, cette partie de l'analyse. Toutefois,



**Figure 1 – Les quatre générations de biotechnologies de reproduction animale.**

NB : La conception du schéma et les dates proviennent du manuscrit de 1990, en revanche les nombres des opérations effectuées sont ceux issus des statistiques de 1998.

il existe de par le monde, dans les instances consultatives internationales et plus près de nous au sein de l'Union Européenne voire de notre république, des textes qui peuvent d'ores et déjà cadrer cette analyse. Nous n'omettrons pas de faire le point sur ces instances et textes au milieu de notre journée. Nous aurons également le plaisir d'entendre à ce séminaire, le rapport de notre collègue de l'Agence canadienne de l'inspection des aliments. Cette Agence semble en effet parmi les premières au monde à conduire une réflexion analogue à la nôtre et l'écoute de ce rapport sera sans doute un des points forts de cette journée.

Très brièvement résumés ici, voici les enjeux de notre réunion. Nous essaierons de circonscrire les données techniques dont nous disposons pour chacune de ces biotechnologies afin de les mettre en perspective dans l'analyse des risques liés à la consommation.

L'ensemble de l'équipe de l'AFSSA concernée fera tout son possible pour que les actes complets de cette journée soient publiés rapidement.

Première session

---

# **Les biotechnologies de la reproduction**

*Modérateur : Michel Thibier*



# Utilisation de l'insémination artificielle et du transfert embryonnaire en France, leur impact sur la limitation des problèmes sanitaires

Patrice HUMBLLOT

UNCEIA, 13, rue Jouet, BP 65, 94700 Maisons-Alfort

## Résumé

L'insémination artificielle est largement utilisée en France depuis plus de 50 ans dans l'espèce bovine. Elle est basée sur des principes biologiques qui ne modifient pas l'intégrité génique des spermatozoïdes ni même leur patrimoine génétique. Plusieurs millions d'inséminations sont réalisées chaque année pour cette espèce. Plus de 90 % du lait et plus de 60 % de la viande consommés sont issus de produits nés d'insémination artificielle. Sa vocation première est l'amélioration des performances zootechniques mais elle a également largement contribué à améliorer l'état sanitaire du cheptel et à préserver le patrimoine génétique.

Pour des raisons essentiellement économiques, son développement chez les petits ruminants est beaucoup plus restreint. Chez le porc un développement beaucoup plus important a été observé ces dernières années conduisant à inséminer plus de 50 % des truies et à consommer largement les produits issus d'insémination qui représentent maintenant environ 60 % de la viande consommée.

Utilisé principalement à des fins d'amélioration génétique, le transfert embryonnaire initié en 1975 a présenté un développement sensiblement moins important ; environ 30 000 transferts d'embryons en France et plus de 370 000 dans le monde chaque année.

L'insémination artificielle comme le transfert embryonnaire sont réalisés dans un cadre réglementaire sanitaire et zootechnique européen et français extrêmement strict dans un but de santé animale et publique et d'amélioration des produits. L'insémination artificielle a été jusqu'à présent un facteur positif dans l'éradication de nombreuses maladies.

Le statut sanitaire des animaux présents dans les centres d'insémination est contrôlé de façon permanente. En parallèle, les statuts sanitaires des donneuses et des receveuses d'embryons sont également contrôlés rigoureusement.

Progressivement des substituts de tous les produits d'origine animale (BSA/sérum...) présents dans les dilueurs, les milieux de collecte ou de congélation sont de plus en plus largement utilisés.

Le contrôle sanitaire strict et les contrôles dans la réalisation des opérations de mise en place qui y sont associés, expliquent en partie pourquoi l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire représentent des freins à la diffusion des maladies dans les élevages et contribuent à la bonne qualité sanitaire et à la traçabilité des produits qui en sont issus.

## INTRODUCTION

Depuis le début des années 50, l'insémination artificielle a connu un développement rapide et une diffusion universelle qui en a fait la technique de reproduction la plus répandue dans le monde, pour les bovins laitiers tout particulièrement. Le transfert embryonnaire, seconde génération de ces biotechnologies comme le rappelle Thibier (1990), est apparu sur le terrain quelques trente ans plus tard, autour des années 1975. Il connaît aussi un développement mondial.

## 1. LE DÉVELOPPEMENT DE L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE

La technologie de l'insémination artificielle est basée sur des principes biologiques qui ne modifient ni l'intégrité génique ni le patrimoine génétique des gamètes avant et après la fécondation dans le tractus génital femelle. Bien qu'elle soit moins développée chez les bovins allaitants, plusieurs millions d'inséminations dans l'espèce bovine, sont cependant réalisées chaque année en particulier en France. Ainsi on peut constater que plus de 90 % du lait et

plus de 60 % de la viande bovine produits et consommés sont issus d'animaux nés d'insémination artificielle. Sa vocation première était d'améliorer les performances zootechniques, elle a cependant également largement contribué à améliorer l'état sanitaire du cheptel et à préserver le patrimoine génétique des populations animales dans lesquelles elle a été utilisée.

Pour des raisons essentiellement économiques, son développement chez les petits ruminants est beaucoup plus limité.

Chez le porc un développement beaucoup plus important a été observé ces dernières années conduisant à inséminer plus de 50 % des truies et à consommer largement les produits issus d'insémination qui représentent maintenant environ 60 % de la viande proposée à la consommation.

L'impact de l'utilisation de cette technique dans le monde est évidemment très important puisque selon les espèces de 20 à plus de 60 millions d'inséminations sont réalisées chaque année (tableau 1).

## 2. LA SURVEILLANCE SANITAIRE DE L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE

Celle-ci est à la fois extrêmement rigoureuse et ancienne.

Parallèlement à son développement on a pu constater, tout particulièrement à partir de 1960, une montée en puissance des contrôles réglementaires qui a conduit progressivement à exiger pour les centres d'insémination artificielle, une qualification indemne relativement à de nombreuses maladies infectieuses.

- 1950-1970 : tuberculose, brucellose, campylobactériose, trichomonose ;
- 1970-1980 : rhinotrachéite bovine infectieuse ;
- 1975-1981 : leucose bovine enzootique ;
- 1986 : diarrhée virale bovine, maladie des muqueuses.

La réglementation française (arrêtés ministériels du 11 juillet 1994 et du 15 mars 1999) est d'ailleurs sensiblement plus exigeante que la

directive européenne publiée sur le sujet (directive 88/407).

L'insémination artificielle est ainsi devenue un des principaux outils d'éradication des maladies dans les élevages. Elle a en effet joué un rôle majeur dans la lutte vis à vis des maladies sexuellement transmissibles (campylobactériose, trichomonose) et plus généralement dans la lutte contre les anthroponoses (maladies infectieuses contagieuses telles que la tuberculose et la brucellose) au travers des effets indirects qu'elle induit dans l'ensemble des troupeaux ou elle a été et demeure aujourd'hui utilisée.

Elle contribue en outre à diminuer la pression de la contamination bactérienne présente dans l'écosystème des individus et des produits qui en sont issus. A titre d'exemple, en raison des conditions d'entretien des taureaux, des conditions de récolte, du processus de dilution et de congélation de la semence, le nombre de bactéries appartenant à la flore « banale » présentes dans une paille d'IA est 100 000 à 1 million de fois plus faible que dans un éjaculat de taureau utilisé en monte naturelle. Plus généralement du fait du grand nombre d'inséminations réalisées pour un même individu, les risques de contamination par des virus ou des bactéries pourraient paraître importants. En réalité le travail en effectif clos associé au respect de périodes de quarantaine et à un contrôle sanitaire des plus rigoureux (plusieurs contrôles annuels) et exhaustif fait des reproducteurs présents dans les centres d'insémination artificielle, une population d'élite au plan sanitaire, dont le statut de haut niveau est une des conditions associées à sa large utilisation. A titre de comparaison, les animaux utilisés à la monte naturelle sont soumis à des contrôles beaucoup moins fréquents et seulement pour les trois maladies les plus contagieuses : tuberculose, brucellose et leucose.

Par l'action des différents partenaires de la filière (centres d'insémination artificielle, laboratoire national de contrôle, vétérinaires, administration vétérinaire), l'éleveur est ainsi garanti contre tout vice caché, la semence utilisée sur ses vaches ne devant contenir aucun agent

**Tableau 1 – Utilisation de l'insémination artificielle dans le monde pour les différentes espèces de rente (selon Chupin et Thibier, 1994 ; Malafosse, 1996).**

Espèce	Bovins	Porcins	Ovins	Caprins	Équins
Nombre de femelles . . . . .	66 (millions)	20 (millions)	46 (millions)	100 (millions)	100-200 (milliers)

pathogène spécifique susceptible de contaminer son élevage et/ou les produits qu'il fabrique.

### 3. LE DÉVELOPPEMENT DU TRANSFERT EMBRYONNAIRE

Nous n'évoquerons ici que les techniques qui consistent à « collecter » quelques jours après la fécondation *in vivo*, des embryons non encore implantés et qui ont déjà gagné la cavité utérine de la femelle. Les problèmes éventuels relatifs aux embryons produits par fécondation *in vitro* (troisième génération des biotechnologies de la reproduction) seront traités par nos collègues B. Guérin et B. Le Guenne.

Bien qu'essentielle actuellement pour assurer le progrès génétique, la technique de transfert embryonnaire, qui consiste à produire plusieurs embryons chez une femelle de haute valeur génétique, puis à les transférer sur des femelles receveuses dont la valeur génétique est faible, est moins importante en termes de nombre d'interventions réalisées chaque année (inséminations artificielles, collecte d'embryons et transferts) et de produits qui en sont issus. Comme dans le cas de l'insémination artificielle, l'intégrité du génome n'est pas touchée lors de chacune des phases nécessaires à sa réalisation (production des gamètes, fécondation, développement embryonnaire *in vivo*).

Les statistiques de la Société Mondiale de Transfert Embryonnaire (IETS) et nos enregistrements nationaux indiquent que près de 370 000 embryons sont transférés dans le monde chaque année dont 30 000 en France (Thibier, 1998 ; Heyman, 1999) induisant la naissance d'environ 15 000 veaux. Comparée à l'insémination artificielle, cette technique représente 0,6 % du total des veaux produits.

### 4. LA SURVEILLANCE SANITAIRE DU TRANSFERT EMBRYONNAIRE

Comme pour l'insémination artificielle, le transfert d'embryons est réalisé en Europe et en France dans un cadre réglementaire très strict (Journal officiel des Communautés Européennes, JOCE L302 25 septembre 1989, L75 24 juin 1993, L53 24 février 1994) qui oblige avant toute intervention, à évaluer très précisément le statut sanitaire des femelles donneuses d'embryons, mais aussi des embryons transférés et des receveuses. Les équipes de transfert sont elles aussi soumises à des conditions très rigoureuses de fonctionnement et ne peuvent exercer

leurs activités que si elles sont officiellement agréées par le ministère de l'agriculture. Outre la qualité des infrastructures et l'encadrement vétérinaire indispensable qui sont nécessaires pour obtenir cet agrément, la compétence des opérateurs est également vérifiée en continu sur la base de contrôles obligatoires, réalisés une fois par an en laboratoire agréé, dont les résultats favorables sont une des conditions au renouvellement de cet agrément.

Sur un plan plus technique, quels pourraient être les risques liés à la manipulation de ces embryons fabriqués *in vivo* par la femelle inséminée.

Ces embryons sont récoltés 7 jours après la fécondation. Ils se trouvent à cette date dans l'utérus où ils sont récoltés par simple lavage des cornes utérines.

Après leur récolte, ils vont ainsi séjourner pendant 1 à 2 heures dans les milieux de collecte avant d'être transférés ou congelés.

La simplicité de composition des milieux utilisés (à base de tampon phosphate), leur mode de production par les laboratoires spécialisés (les milieux de collecte sont stérilisés et soumis à des contrôles de qualité très stricts avant leur mise sur le marché), font de ces milieux des produits extrêmement fiables qui offrent toutes les garanties relativement à d'éventuels risques de contamination.

En matière de santé animale, la communauté scientifique internationale s'est largement interrogée sur les risques sanitaires qui pouvaient être associés à l'utilisation du transfert embryonnaire. Elle s'est alors appliquée à étudier scientifiquement les risques hypothétiques eux-mêmes, mais elle a également défini les protocoles permettant de garantir la qualité sanitaire des embryons utilisés par cette technique.

Ainsi, un simple lavage des embryons réalisé dans un milieu stérile identique au milieu de collecte et dans des conditions bien définies, (Manuel de l'IETS, Stringfellow et Seidel, 1998) permet d'éliminer tous les micro-organismes éventuellement présents dans l'environnement des embryons et de garantir ainsi leur qualité sanitaire.

Initialement, les milieux utilisés pour les manipulations des embryons contenaient du sérum de bovin ou de l'albumine bovine.

Aujourd'hui, et principalement en raison des risques mal maîtrisés qui sont associés aux produits d'origine animale, des produits dits de substitution de l'albumine bovine sérique sont progressivement testés. Plus généralement tous

les produits d'origine animale sont progressivement éliminés et remplacés par des molécules le plus souvent d'origine végétale.

Ces techniques, en raison de leurs caractéristiques d'utilisation, restent extrêmement proches des conditions naturelles de fécondation et de gestation. Leurs modalités de mise en place, l'environnement réglementaire qui leur est associé en particulier par rapport au contrôle sanitaire, ont été focalisés principalement sur un objectif de santé animale. L'incidence sur la santé publique est de ce fait plus difficile à appréhender. Indirectement, si l'on considère que l'animal est un excellent biorévélateur, le sérieux dont a fait preuve la filière des professionnels de la santé animale et de l'élevage explique sans doute que ces techniques n'ont

jamais été suspectées d'être à l'origine de désordre ou même d'interrogations en matière de consommation alimentaire.

## CONCLUSION

Ainsi, depuis plus de 50 ans, les produits issus d'insémination artificielle et plus récemment ceux issus de transfert embryonnaire, qui représentent aujourd'hui plus de 50 % de la viande bovine et plus de 90 % du lait produit de par le monde, ont démontré une sécurité sanitaire et alimentaire irréprochable ainsi que leur parfaite adéquation aux exigences de la société moderne qui associent celles de la production et de l'économie à celles de la consommation et de la santé publique.

## RÉFÉRENCES

- Chupin D. et Thibier M. (1994) Résultats d'une enquête sur l'état de l'insémination artificielle dans les pays développés. *Élevage et Insémination*, 263, 1-18.
- Heyman Y. (1999) Statistiques AETE, 15<sup>e</sup> réunion, Lyon 1999.
- Malafosse A. (1996) L'insémination des différentes espèces animales dans le monde. Réunion FAIR. Rambouillet 25/09/1996, INRA Éditions.
- Stringfellow D. (1998) Recommendations for the sanitary handling of *in vivo*-derived embryos. IETS Manual, 3rd edition, DA Stringfellow and SM Seidel Ed. pp. 79-84.
- Thibier M. (1990) New Biotechnologies in Cattle Reproduction. In *Proc 7th F A V A Congress*, Bangkok, 4-7 Nov. 1990, 512-524.
- Thibier M. (1998) The 1997 embryo transfer statistics from around the world: a data retrieval committee report. *Embryo transfer Newsletter*, 16, (4), 17-20.

# Utilisation des biotechnologies de la reproduction de troisième génération (fécondation *in vitro*) et sécurité sanitaire

Bernard GUÉRIN et Brigitte LE GUIENNE

UNCEIA - Services techniques, 13, rue Jouet, BP 65, 94700 Maisons-Alfort

## Résumé

Dans les espèces domestiques, la production d'embryons par fécondation *in vitro* a été maîtrisée à partir des années 80 et a connu depuis cette date une évolution très rapide dans tous les grands pays d'élevage en raison des avantages qu'elle présente pour la gestion du progrès génétique. Dans le monde, en particulier en Amérique du nord (USA, Canada) et en Europe (Hollande, Italie, Irlande) plusieurs milliers d'embryons sont ainsi produits chaque année par fécondation *in vitro*.

Dans le cadre de la mondialisation des échanges, les conditions de fabrication parfaitement contrôlées au plan sanitaire (équipes officiellement agréées) et particulièrement fiables des embryons fécondés *in vitro*, représentent aujourd'hui des garanties très fortes et très recherchées en matière de santé animale. Elles expliquent la part croissante que ces embryons prennent actuellement dans le cadre des activités de transfert embryonnaire.

Préoccupée par la gestion du risque sanitaire, la communauté scientifique vétérinaire s'est penchée très attentivement depuis une quinzaine d'années sur les risques de transmission et de dissémination des maladies animales qui pourraient être associés à cette biotechnologie. A ce jour, l'ensemble des travaux concordent et autorisent à conclure, que la sécurité sanitaire est une des qualités majeures liées aux embryons produits par fécondation *in vitro*.

Une nouvelle question se pose cependant aujourd'hui : les animaux issus de cette biotechnologie représentent-ils un risque pour la consommation ?

En dehors d'évaluations scientifiques rigoureuses et objectives qui n'ont pas été conduites à ce jour, consistant à évaluer les caractéristiques des produits de consommation (lait et viande), des animaux issus de cette biotechnologie, on peut toutefois, réfléchir aux caractéristiques, **génétiques, sanitaires, biochimiques et métaboliques** de ces embryons qui pourraient représenter des risques. Ceux-ci peuvent être assez facilement évalués en examinant les différentes étapes de leur fabrication : collecte des ovocytes, maturation, fécondation, culture des embryons, congélation et transfert sur des vaches receveuses.

La première caractéristique, de nature **génétique** est liée aux gamètes, mâle et femelle qui sont impliqués lors de la fécondation pour aboutir à la formation de l'embryon. D'un point de vue strictement génomique, le potentiel génétique de l'ovocyte et du spermatozoïde ne subissent aucune modification lors de la fécondation *in vitro*. Dans ces conditions, rien ne différencie ces embryons des embryons fécondés *in vitro*.

Le risque **sanitaire** est plus précisément lié aux conditions environnementales qui sont associées à la production des embryons *in vitro*. Les trois phases de production de ces embryons : maturation, fécondation, culture, impliquent en effet des milieux complexes qui initialement ont nécessité la présence de produits d'origine animale.

L'évolution de la technique et les exigences de la réglementation conduisent aujourd'hui à supprimer des systèmes de culture tout produit d'origine animale. La stérilité des milieux utilisés représente également un point clef dans le cadre de la garantie sanitaire recherchée par cette biotechnologie. L'étape de fécondation utilise par ailleurs du sperme de taureaux d'élite, très sévèrement contrôlés par les services vétérinaires officiels. L'utilisation récente de dilueurs stériles qui ne contiennent plus de produits d'origine animale aboutit encore à améliorer la qualité des semences.

Les phases de maturation et de culture *in vitro* sont associées à une multiplication cellulaire et à une activité métabolique au niveau de l'embryon qui induisent des différences par rapport à l'embryon produit *in vivo* en particulier au niveau du métabolisme des lipides (triglycérides et cholestérol estérifié). Le syndrome dit « du gros veau » signalé dans certains pays d'Europe semble cependant plus lié à une maîtrise insuffisante des conditions de culture. Ce syndrome qui n'est pas observé en France ne semble pas devoir constituer à court terme une préoccupation majeure.

En conclusion, il apparaît que l'analyse approfondie des facteurs de risque tant en santé animale qu'en santé publique conduisent à considérer que les embryons fécondés *in vitro* présentent des garanties supérieures aux autres embryons produits *in vivo* puisque toutes les étapes de leur fabrication font l'objet de contrôles extrêmement stricts destinés à aboutir à l'obtention de garanties fiables.

Le fait que des milliers d'embryons produits *in vitro* aient été transférés au cours des dix ou quinze dernières années sans qu'aucun problème n'ait été signalé sur les veaux ou sur les animaux adultes, confirme sur le terrain et au niveau de la consommation, l'absence de risque qu'il serait judicieux de confirmer par des études comparatives faciles à mener sur les produits destinés à la consommation.

## INTRODUCTION

La question se pose aujourd'hui, dans un contexte médiatique troublé par le développement inattendu de maladies animales jusqu'ici discrètes et marginales comme les encéphalopathies spongiformes, d'étendre la réflexion et de réfléchir aux risques que pourraient présenter les produits issus des biotechnologies de la reproduction pour la santé publique.

Ces biotechnologies correspondent à l'insémination artificielle (IA), au transfert embryonnaire (TE), à la fécondation *in vitro* (FIV), au clonage et à la transgénèse.

Ayant été mise au point au cours des cinquante dernières années, elles ont été qualifiées par Thibier (1990) de biotechnologies de première (IA), deuxième (TE), troisième (FIV, clonage), et quatrième générations (transgénèse) suite à la chronologie de leur apparition sur le terrain. Nous ne parlerons ici que d'une des technologies de troisième génération, à savoir celle relative à la production d'embryons par fécondation *in vitro*.

### 1. LA TECHNOLOGIE DE LA FÉCONDATION *IN VITRO* - MODÈLE BOVIN

La production d'embryons par fécondation *in vitro* est une technique qui consiste à féconder des ovocytes par des spermatozoïdes en dehors du tractus génital. Elle n'a été maîtrisée qu'à partir du début des années 90. Elle a connu, depuis cette date, une évolution très rapide en raison des avantages qu'elle présente pour la gestion du progrès génétique, facteur économique majeur de productivité dans tous les grands pays d'élevage à travers le monde.

Ainsi en Amérique du nord (USA, Canada) et en Europe (Hollande, Italie, Irlande), plusieurs milliers d'embryons sont actuellement produits chaque année par fécondation *in vitro*.

Dans le cadre de la mondialisation des échanges, les conditions de fabrication contrôlées au plan sanitaire (équipes officiellement agréées) et particulièrement fiables, des embryons fécondés *in vitro*, représentent aujourd'hui des garanties très fortes et très recherchées en

matière de santé animale. Elles expliquent la part croissante que ces embryons prennent actuellement dans le cadre des activités de transfert embryonnaire au sens large.

Parallèlement à sa mise au point et à la recherche d'une meilleure maîtrise technologique, la fécondation *in vitro* a fait l'objet de recherches très actives dans le but d'évaluer les risques sanitaires en particulier les risques de transmission et de dissémination des maladies animales, particulièrement surveillés en raison des échanges internationaux qui conduisent de nombreux pays à exporter ou à importer de la génétique notamment aujourd'hui sous forme d'embryons.

En comparaison avec les échanges d'animaux vivants utilisés massivement pendant près de 50 ans, qui aboutissaient parfois à exporter des maladies animales en même temps que les animaux eux-mêmes, l'expédition de quelques milliers d'embryons est aujourd'hui une formalité simple, rapide, peu coûteuse et qui présente l'énorme avantage d'être beaucoup plus sûre au plan sanitaire.

A ce jour, l'ensemble des travaux concordent et autorisent à conclure que la sécurité sanitaire peut et doit être une des qualités majeures associées aux embryons produits par fécondation *in vitro*.

Une nouvelle question se pose cependant aujourd'hui : les animaux issus de cette biotechnologie représentent-ils un risque pour la consommation ?

En dehors d'évaluations scientifiques rigoureuses et objectives qui n'ont pas été conduites à ce jour, consistant à évaluer les caractéristiques des produits de consommation (lait et viande), des animaux issus de cette biotechnologie, on peut toutefois, réfléchir aux caractéristiques, **génétiques, sanitaires, biochimiques et métaboliques** de ces embryons qui pourraient représenter des risques.

Ceux-ci peuvent être assez facilement évalués en examinant les différentes étapes de leur fabrication.

La production d'embryons *in vitro* comprend trois étapes successives : la maturation *in vitro* de l'ovocyte après son prélèvement dans le follicule (MIV), la fécondation *in vitro* (FIV), puis enfin la culture *in vitro* (DIV), phase de développement au cours de laquelle l'embryon

se développe jusqu'au stade (J7) où il peut être replacé dans le tractus génital d'une vache receveuse par transfert classique de l'embryon produit *in vitro*, éventuellement après avoir été congelé.

La co-culture avec des vésicules trophoblastiques (Camous *et al.*, 1984) ou des cellules d'oviducte (Gandolfi *et al.*, 1987) ont été les premières techniques utilisées. Plusieurs études ont ensuite montré des résultats similaires avec d'autres types cellulaires comme les cellules de la granulosa (Goto *et al.*, 1992) et même des cellules d'origine non génitale et non bovine (Hasler *et al.*, 1994).

D'autre part, des milieux préalablement conditionnés par des cellules épithéliales tubaires ou d'autres types cellulaires ont permis d'obtenir des taux de développement embryonnaire comparables (Eyestone *et al.*, 1991 ; Mermillod *et al.*, 1993). L'effet des systèmes de co-culture ou des milieux conditionnés peut s'expliquer de deux manières : les cellules sécrètent des facteurs embryotrophes qui stimulent le développement embryonnaire ou elles suppriment du milieu de culture des facteurs toxiques néfastes pour le développement de l'embryon.

Enfin des milieux simples tels que l'HECM (Pinyopummintr *et al.*, 1991), le CR1 (Rosenkrans *et al.*, 1993) ou le SOF (Takashi *et al.*, 1992) supportent le développement des embryons sans soutien cellulaire avec des taux de développement embryonnaire équivalents.

Jusqu'en 1988, les ovocytes ne pouvaient être prélevés qu'à partir d'ovaires d'abattoir ce qui n'autorisait qu'une production de masse d'embryons (sans valeur génétique) ou des opérations ponctuelles après abattage de la donneuse. L'adaptation à l'espèce bovine de la technique de collecte d'ovocytes intra-ovariens utilisée par Pieterse *et al.* (1988) chez la femme, a permis d'augmenter la fréquence de collecte des ovo-

**Tableau 1 – Nombre d'embryons produits *in vitro* et transférés au cours de l'année 1997 (selon Thibier, 1998)**

Pays	Nombre d'embryons produits	Nombre d'embryons transférés
Asie . . . . .	28 622 * (69,1 %)	10 560 (52,8 %)
Europe . . . . .	11 443 * (27,7 %)	7 748 ** (38,7 %)
Nouvelle-Zélande . . .	1 336 (3,2 %)	1 701 (8,5 %)
Total . . . . .	41 401	20 009

\* Somme des embryons expérimentaux et commerciaux  
\*\* Parmi lesquels un certain nombre d'embryons cultivés dans l'oviducte de brebis.

cytes sur les femelles à haut potentiel génétique. Cette technique (appelée Ovum Pick Up) est maintenant utilisée dans de nombreux pays. A titre d'exemple (tableau 1), la production d'embryons *in vitro* en Europe représente 27,7 % de la production mondiale répertoriée. Il faut en effet tenir compte de pays comme le Canada et les États-Unis qui font largement appel à cette technique mais qui ne donnent pas le détail de la production d'embryons *in vitro* qu'ils produisent.

Parmi les pays européens, la France produit environ 35 % du nombre total d'embryons (tableau 2), mais les transferts effectués dans notre pays ne représentent que 4,5 % du nombre total d'embryons transférés car seuls les embryons issus d'ovocytes collectés sous échographie (OPU) sont transférés. Les ovocytes issus d'ovaires d'abattoirs servent quant à eux essentiellement à la mise au point des techniques de production et ne sont en général pas transférés exception faite d'un petit nombre d'entre eux.

**Tableau 2 – Activité en France et en Europe en 1998 (selon Heyman, 1999).**

	Nombre d'embryons produits	Nombre d'embryons transférés	Nombre de veaux nés
Europe . . . . .	19 180 *	14 113 *	1 091 **
France (total) . . . . .	6 778 (35,3 %)	634 (4,5 %)	137 (12,5 %)
France (OPU) . . . . .	548 (8,1 %)		
France (abattoir) . . . . .	6 230 (91,9 %)		

\* 13 pays.  
\*\* 8 pays.

## 2. ÉVALUATION DU RISQUE GÉNÉTIQUE

La première caractéristique des embryons fécondés *in vitro*, de nature **génétique**, est liée aux gamètes, mâles et femelles qui sont impliqués lors de la fécondation pour aboutir à la formation de l'embryon. D'un point de vue strictement génomique, le potentiel génétique de l'ovocyte et du spermatozoïde ne subissent aucune modification lors de la fécondation *in vitro* qui s'effectue dans un environnement stérile et dans des conditions que l'on tente encore aujourd'hui de rapprocher le plus possible des conditions *in vivo*, ceci afin d'augmenter les chances de succès et donc les rendements.

Dans ces conditions, rien ne différencie ces embryons des embryons fécondés *in vivo*. En particulier, le développement des embryons après fécondation *in vitro* n'est pas modifié, les embryons FIV atteignant en 7 jours le stade morula/blastocystes, exactement comme les embryons produits *in vivo*.

Les risques de modification de l'expression de certains gènes parfois évoqués ne sont qu'hypothétiques et n'ont jamais été démontrés à notre connaissance.

Un élément à considérer relativement à la qualité alimentaire des produits issus de cette biotechnologie, est que l'embryon, premier stade de l'animal produit, est un excellent bio-révéléateur. Dans ces conditions, il est facile de prévoir que toute modification de l'expression de certains gènes, si elle survenait, conduirait inmanquablement à un déficit de développement et à la mort de l'embryon ou du fœtus et donc à un avortement. De telles anomalies ne sont pas observées même si certains de ces embryons n'arrivent pas à terme en raison d'une mortalité embryonnaire « naturelle » chez les mammifères et chez les bovins en particulier.

## 3. ÉVALUATION DU RISQUE SANITAIRE

Le risque **sanitaire** est plus précisément lié aux conditions environnementales qui sont associées à la production des embryons *in vitro*. Les trois phases de production de ces embryons : maturation, fécondation, culture, impliquent en effet des milieux complexes qui initialement ont nécessité la présence de produits d'origine animale tels que le sérum de fœtus de bovin ou de vache en œstrus ou l'albumine bovine.

L'évolution de la technique permettant d'aboutir à une meilleure maîtrise ainsi que les exigences de la réglementation conduisent

aujourd'hui à supprimer des systèmes de culture tout produit d'origine animale en les remplaçant par des produits d'origine végétale. Les risques de transmission des agents connus voire inconnus entre les espèces animales concernées et notamment à l'homme sont ainsi écartées.

### 3.1. Les milieux utilisés pour la production d'embryons fécondés *in vitro*

Tous les milieux utilisés sont stériles (soit achetés et garantis stériles par les fournisseurs, soit stérilisés par filtration) et contrôlés avant utilisation. Tous les nouveaux produits ou nouveaux lots de produits utilisés sont testés sur des lots d'ovocytes d'abattoir qui permet la validation de chaque lot avant son utilisation dans la chaîne de production d'embryons.

#### • Milieu de maturation *in vitro*

Le milieu de maturation est composé d'un milieu salin (M199) additionné de sérum de fœtus de bovin ou d'un substitut synthétique de ce sérum, de molécules biologiquement actives identiques à celles utilisées pour la stimulation des femelles donneuses d'embryons produits *in vivo*, d'antibiotiques et d'un facteur de croissance épidermique l'EGF (embryonic growth factor). Ce facteur de croissance ainsi que son récepteur sont largement présents chez l'animal vivant en particulier au niveau de l'ovaire et du follicule ovarien. Le tableau 3 montre la non-influence du remplacement du sérum de fœtus de bovin par un substitut synthétique au cours de l'étape de maturation *in vitro* sur la production globale d'embryons.

#### • Milieu de fécondation *in vitro*

Le milieu de fécondation est constitué d'un milieu salin simple (milieu de Tyrode) additionné d'albumine ou d'un substitut de l'albumine et d'antibiotiques.

**Tableau 3 – Effet de l'utilisation de substitut de sérum pendant la maturation *in vitro* sur la production d'embryons *in vitro*.**

	Témoin (sérum de fœtus de bovin)	Substitut du sérum
Nombre d'ovocytes inséminés . . . . .	141	180
% d'œufs divisés . . . . .	92,2	92,2
% d'embryons à J7 . . . .	31,9	26,1
% d'embryons éclos à J9 . . . . .	27	22,2

### • Milieu de culture *in vitro*

Le milieu de culture des embryons est composé d'un milieu salin simple (SOF dont la composition ionique est calquée sur celle de l'oviducte qui permet de cultiver les embryons en l'absence de support cellulaire) additionné de sérum ou d'un substitut et d'antibiotiques. Les taux de développement embryonnaire (tableau 4) ne sont différents que les embryons soient cultivés en présence de sérum ou de substitut. De plus les nombres de cellules qui constituent le trophoblaste et le bouton embryonnaire (ICM) ne sont pas différents.

### 3.2. La fécondation *in vitro*

La fécondation *in vitro* utilise par ailleurs du sperme de taureaux d'élite, très sévèrement contrôlés par les services vétérinaires officiels. Ces contrôles incluent en particulier la vérification régulière du statut sanitaire des reproducteurs vis-à-vis des maladies transmissibles à l'homme comme la tuberculose ou la brucellose. D'autres maladies spécifiques de l'espèce bovine comme la leucose bovine enzootique, la rhinotrachéite bovine infectieuse, la diarrhée virale bovine, la campylobactériose et la trichomonose font également l'objet de contrôles très stricts réalisés par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs de Maisons-Alfort.

L'utilisation récente de dilueurs stériles qui ne contiennent que des produits d'origine végétale aboutit encore à améliorer la qualité des semences. De même les protocoles d'entretien des animaux et la mise en place d'une véritable démarche qualité dans les centres d'insémination artificielle qui couvre les aspects production de semence et la gestion de la politique sanitaire, permet en particulier en France où ces principes sont particulièrement appliqués, de produire des semences d'une qualité exceptionnelle.

Ainsi depuis l'après-guerre, comme cela a déjà été mentionné, des millions de doses d'insémination artificielle ont été utilisées et aucun cas de dissémination d'une maladie infectieuse n'a été signalé, démontrant ainsi l'efficacité du dispositif mis en place et le niveau de garantie sanitaire associé aux semences produites.

## 4. LE DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS ET LES RISQUES ASSOCIÉS

Les phases de maturation et de culture *in vitro* sont associées à une multiplication cellulaire et à une activité **métabolique** au niveau de l'embryon qui induisent des différences par rapport

**Tableau 4 – Effet de l'utilisation de substitut de sérum pendant la culture dans un milieu défini (SOF) sur la production d'embryons *in vitro*.**

	Témoin (sérum de fœtus de bovin)	Substitut du sérum
Nombre d'ovocytes inséminés . . . . .	120	183
% d'œufs divisés . . . . .	83,5	88
% d'embryons à J7 . . . . .	32	31,5
% d'embryons éclos à J9 . . . . .	29	30
Comptage cellules J7		
Nombre total de cellules	170,1	180,1
ICM/total . . . . .	0,37	0,35

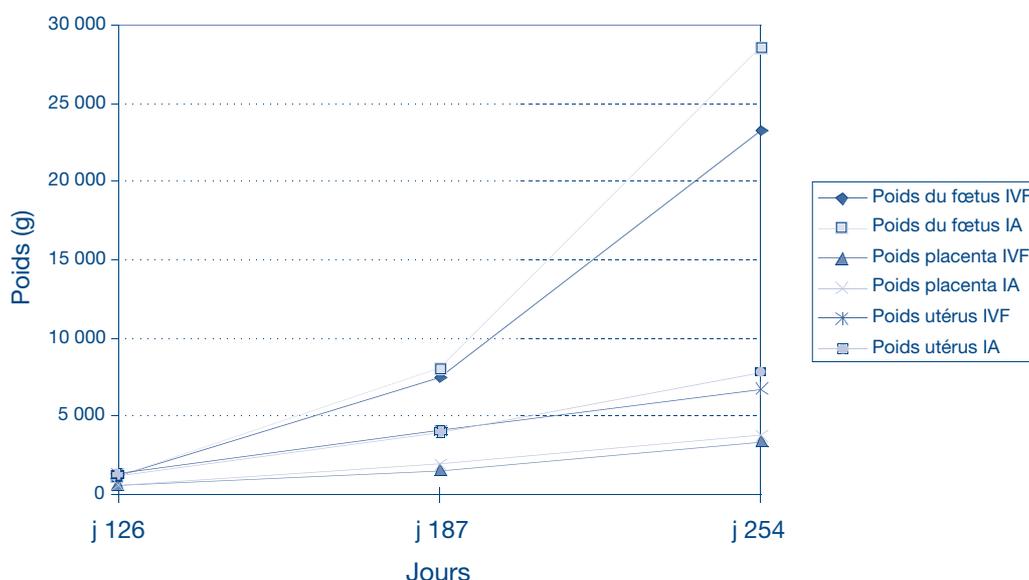
à l'embryon produit *in vivo* en particulier au niveau du métabolisme des lipides (triglycérides et cholestérol estérifié). Il est maintenant pratiquement acquis au plan international que le syndrome dit « du gros veau » signalé dans certains pays d'Europe semble cependant plus lié à une maîtrise insuffisante des conditions de culture. Ce syndrome qui n'est pas observé en France où les conditions de culture sont particulièrement bien maîtrisées, ne semble pas devoir constituer à court terme une préoccupation majeure. Les dernières études publiées sur le sujet ne font d'ailleurs apparaître aucune différence relativement à la taille ou au poids des organes principaux entre des veaux produits par fécondation *in vitro* et ceux produits, dans les mêmes conditions par insémination artificielle (figure 1).

De même les constantes biochimiques sanguines ne révèlent aucune différence significative (tableau 5). Tout au plus enregistre-t-on un allongement de quelques centimètres des membres antérieurs et postérieurs chez les veaux issus de fécondation *in vitro*.

Ces observations ne nous semblent pas de nature à révéler un problème majeur qui pourrait survenir lors de la consommation de ces animaux.

## 5. L'ENVIRONNEMENT RÉGLEMENTAIRE ASSOCIÉ À LA PRODUCTION D'EMBRYONS *IN VITRO*

Les équipes produisant des embryons bovins *in vitro* doivent être titulaires d'un agrément (A.M. 13/07/94 et 21/04/99). Cet agrément attribué pour un an est renouvelable par le préfet



**Figure 1 – Comparaison du développement fœtal après IA ou transfert d'embryons produits *in vitro* chez les bovins (McMillan *et al.*, 1999).**

**Tableau 5 – Comparaison de la durée de gestation, des paramètres sanguins ainsi que des poids des veaux issus d'IA ou de production *in vitro* (Jacobsen *et al.*, 1999).**

	IVF culture sans sérum	IVF culture avec sérum	Témoin (IA)
Poids naissance . . . . .	42,2 ± 3,2	45,9 ± 5,2	47,0 ± 2,2
Durée gestation . . . . .	281 ± 6	280 ± 5	277 ± 2
Paramètres sanguins * . . . . .	≈	≈	≈

\* CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, pH, glucose, lactate, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>.

après avis favorable de la Direction des services vétérinaires qui inspecte les installations et de la direction du Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs qui contrôle les échantillons des milieux prélevés de chaque manipulation. Ces équipes placées sous la responsabilité d'un vétérinaire dit d'équipe doivent être constituées de techniciens compétents et formés aux méthodes de travail en milieu stérile. Elles assurent le prélèvement des ovocytes, la maturation, la fécondation et la culture *in vitro* ainsi que le traitement et le stockage des embryons qui en sont issus.

Enfin, les donneuses d'ovocytes ont le même statut sanitaire que les donneuses d'embryons produits *in vivo*. Quant aux receveuses d'embryons produits *in vivo* ou *in vitro*, elles sont toutes contrôlées et ont le même statut sanitaire, celui qui est exigé pour autoriser leur utilisation dans le cadre de ces biotechnologies.

## CONCLUSION

En conclusion, il apparaît que l'analyse approfondie des facteurs de risque tant en santé animale qu'en santé publique conduisent à considérer que les embryons fécondés *in vitro* présentent des garanties supérieures aux autres embryons produits *in vivo* puisque toutes les étapes de leur fabrication font l'objet de contrôles extrêmement stricts.

Le fait que des milliers d'embryons produits *in vitro* aient été transférés au cours des dix dernières années sans qu'aucun problème n'ait été signalé sur les veaux ou sur les animaux adultes, en particulier lorsqu'ils ont été proposés à la consommation, confirme sur le terrain, l'absence de risque qu'il serait probablement judicieux de confirmer par des études comparatives faciles à mener sur les produits destinés à la consommation.

## RÉFÉRENCES

- Camous S., Heyman Y., Ménézo Y. (1984) *In vitro* culture of early bovine embryos with trophoblastic vesicles cleavage through the block stage, followed by pregnancy after transfer. *Theriogenology* 21, 226-232.
- Chupin D. et Thibier M. (1994) Résultats d'une enquête sur l'état de l'insémination artificielle dans les pays développés. *Élevage et Insémination* 263, 1-18.
- Gandolfi F., Moor R.M. (1987) Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 81, 23-28.
- Eyestone W.H., Jones J.M., First N.L. (1991) Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 92, 59-64.
- Goto K., Iwai N., Takuma Y., Nakanishi Y. (1992) Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.* 70, 1449-1453.
- Heyman Y. (1999) Statistiques AETE, 15<sup>e</sup> réunion, Lyon 1999.
- Jacobsen H., Holm P., Schmidt P., Greve T., Callesen H. (1999) *In vitro* embryo production versus artificial insemination: delivery type, birth weight and blood chemistry of the newborn calf. *Theriogenology* 51, 226.
- Malafosse A. (1996) L'insémination des différentes espèces animales dans le monde. Meeting FAIR. Rambouillet 25/09/1996, INRA Éditions.
- McMillan W.H., Donnison M.J., Thompson J.G., Cox S.F. (1999) Development during mid to late pregnancy following either *in vitro* embryo transfer or artificial insemination in cattle. *Theriogenology* 51, 228.
- Mermillod P., Vansteenbrugge A., Wils C., Moureaux J.L., Massip A., Dessy F. (1993) Characterization of embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol. Reprod.* 49, 582-587.
- Pieterse M.C., Kappen K.A., Kruij Th., Taverne M.A.M. (1988) Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30, 751-762.
- Pinyopummintr T., Bavister B.D. (1991) *In vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.* 45, 736-742.
- Rosenkrans C.F., Zeng G.Q., McNamara G.T., Schoff P.K., First N.L. (1993) Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 49, 459-462.
- Stringfellow D. 1998. Recommendations for the sanitary handling of *in vivo*-derived embryos. IETS Manual, 3rd edition, DA Stringfellow and SM Seidel Ed. pp. 79-84.
- Takashi Y., First N.L. (1992) *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-978.
- Thibier M. (1990) New Biotechnologies in Cattle Reproduction. In: *Proc 7th F A V A Congress*, Bangkok, 4-7 Nov 1990, 512-524.
- Thibier M. (1998) The 1997 embryo transfer statistics from around the world: a data retrieval committee report. *Embryo transfer newsletter*, vol 16, No 14.



# Production de mammifères domestiques par clonage

Jean-Paul RENARD

INRA - Unité biologie du développement, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy en Josas

## Résumé

Le transfert de noyaux issus de cellules d'un organisme donneur dans le cytoplasme d'ovocytes receveurs énucléés permet de produire des groupes d'individus possédant le même ensemble de gènes nucléaires. Ces individus forment un clone. Cette technique initialement mise en œuvre chez les mammifères avec des noyaux de cellules embryonnaires a maintenant été étendue avec succès aux noyaux de plusieurs types de cellules différenciées prélevées sur des animaux adultes. Ces succès ont considérablement renouvelé l'intérêt de la technique de transfert de noyau, rebaptisée clonage, non seulement pour des études fondamentales sur la plasticité fonctionnelle du génome, mais aussi pour les perspectives d'applications biomédicales telles que la production de clones pour réduire le nombre d'animaux en expérimentation, l'obtention d'animaux transgéniques à partir de cellules donneuses de noyaux préalablement modifiés génétiquement lors d'une période de culture *in vitro* ou l'établissement de lignées de cellules multipotentes en vue de la réalisation d'autogreffes (clonage thérapeutique).

La plupart des données actuellement disponibles sur le clonage concernent l'espèce bovine. Quelques milliers de veaux issus du transfert de noyaux de cellules embryonnaires ont été produits ces dix dernières années. Depuis deux ans, environ une centaine de veaux, issus de noyaux de cellules somatiques différenciées, dont une dizaine de veaux transgéniques, ont été obtenus par plusieurs laboratoires dans le monde. Ces animaux sont d'apparence physiologique tout à fait normale. C'est le cas par exemple pour la brebis Dolly, le plus vieux clone du monde, âgé maintenant de trois ans. Néanmoins on constate que lorsqu'on utilise des cellules donneuses de noyaux déjà différenciées, le taux d'avortements tardifs s'élève rapidement et 30 % environ des jeunes veaux meurent dans les quelques jours qui suivent la naissance. Chez la souris où les succès sont encore peu nombreux, plus de la moitié des embryons issus de clonage commencent leur développement fœtal mais on observe aussi une mortalité tardive élevée dès le milieu de la gestation.

Ces données montrent clairement qu'il existe des effets à long terme du clonage qui sont probablement associés aux remaniements du noyau donneur dès son entrée dans le cytoplasme receveur. Des perturbations induites au tout début de l'embryogenèse peuvent donc affecter des fonctions spécifiques de l'organisme parfois bien au-delà de la naissance. Le clonage doit donc aujourd'hui être considéré avant tout comme un outil pour comprendre les mécanismes fondamentaux qui contribuent à la dédifférenciation fonctionnelle du noyau de cellules. L'utilisation de clones somatiques animaux pour la consommation humaine impliquera de disposer d'un recul suffisant pour s'assurer, par des recherches appropriées qui peuvent être mises en route dès maintenant, de l'innocuité des techniques utilisées sur la qualité sanitaire des produits qui pourront être obtenus à partir d'animaux clonés.

## INTRODUCTION

La définition, chez les mammifères, dès le début des années 1980, de techniques de reconstitution d'embryons par introduction d'un noyau dans le cytoplasme d'un ovule ou d'un œuf préalablement énucléé (McGrath et Solter, 1983) a ouvert la voie à des études fondamentales sur la régulation de l'expression des génomes parentaux issus de cellules embryonnaires. Elle a aussi permis l'essor de travaux plus finalisés sur la multiplication d'embryons au stade morula et la naissance de groupes d'animaux possédant le même ensemble de gènes nucléaires ou clones. Mais ce n'est que très récemment qu'il a pu être démontré de

façon incontestable, en utilisant le mouton comme modèle, que ces techniques pouvaient aussi être mises en œuvre pour obtenir des jeunes à partir de noyaux de cellules différenciées et cultivées. Cette étape décisive a ouvert la voie à l'utilisation de noyaux de cellules somatiques prélevées sur des animaux adultes et à la naissance de jeunes, chez le mouton (Wilmut *et al.*, 1997), la vache (Vignon *et al.*, 1998) puis la souris (Wakayama *et al.*, 1998). Ces résultats, spectaculaires, ont considérablement renouvelé l'intérêt de la technique de transfert de noyau rebaptisée « clonage », non seulement pour l'étude de la plasticité fonctionnelle du génome, mais aussi pour les perspectives d'obtention d'embryons ou d'animaux à

partir de cellules donneuses de noyaux modifiés génétiquement lors d'une période de culture *in vitro*.

### **CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES ET FONCTIONNELS DU NOYAU APRÈS INTRODUCTION DANS UN CYTOPLASME RECEVEUR**

Dès son introduction dans le cytoplasme de l'ovocyte, le noyau va subir une série de modifications telles que la disparition de la membrane nucléaire, la condensation de la chromatine, la dispersion des nucléoles avant la reformation d'une nouvelle membrane ou un gonflement marqué par rapport à sa taille d'origine (Czolowska *et al.*, 1984 ; Collas et Robl, 1991). Le déroulement de cette séquence d'événements dépend étroitement des phases respectives du cycle cellulaire du noyau donneur et du cytoplasme receveur au moment du transfert.

Les facteurs ovocytaires induisent des modifications très profondes dans les interactions entre les protéines et l'ADN qui forment la chromatine. Mais des modifications de même nature se produisent aussi à chaque cycle mitotique avec comme conséquences, non seulement celle de permettre la division du noyau, une fois répliqué l'ADN, mais aussi celle de réguler l'état de la chromatine. Celle-ci doit en effet acquiescer une configuration qui lui permette de faciliter ou au contraire restreindre l'accès de facteurs de transcription aux séquences cibles du génome, ceci en fonction de l'état physiologique de la cellule. Ces modifications de la chromatine dépendent étroitement de changements de conformation de toute une classe de protéines, notamment les histones, qui organisent l'enroulement de l'ADN. Les histones subissent des modifications biochimiques affectant des parties de la molécule sensibles à l'acétylation, à la phosphorylation ou à la méthylation. Le rôle de ces modifications dans l'aboutissement des voies de signalisation (activées par exemple par les hormones ou les facteurs de croissance) qui modifient l'activité cellulaire est encore très peu compris. Nos résultats récents chez la souris et le bovin suggèrent que les remaniements que subit la chromatine après transfert du noyau dans le cytoplasme de l'ovocyte s'étendent sur une grande partie de la période de clivage de l'œuf. Au cours du développement normal ces remaniements contrôlent l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux séquences régulatrices des gènes (Bellier *et al.*, 1997). Ils régiraient, au moins en partie, les interactions entre facteurs de transcription et

pourraient être impliqués dans les mécanismes de l'empreinte parentale associés à la méthylation différentielle de certains gènes ou groupes de gènes. La cinétique de ces remaniements apparaît modifiée après clonage (Chastant *et al.*, en préparation).

Ces données indiquent que le contrôle de l'activité des gènes après transfert nucléaire se réalise de fait progressivement et au moins au cours de plusieurs divisions mitotiques. Il est très probable que le noyau donneur ne réacquiesce pas un état comparable à celui qu'il avait dans l'œuf originel et que ce sont des réajustements de la chromatine au cours des mitoses successives, qui contribuent à l'engager dans la voie du développement normal.

### **L'APTITUDE AU DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS ISSUS DE TRANSFERT DE NOYAUX**

La plupart des données actuellement disponibles concernent l'espèce bovine et dans une moindre mesure la souris. Plusieurs milliers de veaux issus du transfert de noyaux de cellules embryonnaires encore non différenciées (blastomères) ont été produits dans de nombreux endroits dans le monde ces quinze dernières années. Les seules anomalies observées avec ces animaux sont celles associées au syndrome dit du « gros veau » (Walker *et al.*, 1996), syndrome que l'on peut aussi obtenir en modifiant sous certaines le milieu de culture d'embryons issu de fécondation *in vitro* conditions (notamment le type et la quantité de protéines sériques du milieu). Ces défauts, qui peuvent affecter jusqu'à 20 % des animaux nés, ne sont donc pas spécifiques du clonage. Ils pourraient être dus à des défauts de régulation de certains gènes soumis à l'empreinte parentale (Young *et al.*, 1998).

Depuis l'annonce de la naissance du mouton Dolly, une centaine de veaux issus de transfert de noyaux de cellules somatiques différenciées (et environ autant de souriceaux) ont été obtenus à ce jour par plusieurs laboratoires dans le monde. Le taux d'embryons reconstitués qui se développent jusqu'au stade blastocyste, stade à partir duquel se mettent en place les premières différenciations cellulaires peut être très voisin de celui que l'on obtient après fécondation *in vitro* (environ 30 %). Malgré leur apparence morphologique normale, 10 % seulement des blastocystes issus de clonage se développent à terme après transfert dans l'utérus d'une femelle receveuse (tableau 1). Ce taux est 4 à 5 fois plus faible que celui observé avec des blastocystes produits *in vitro* et 2 à 3 fois plus

**Tableau 1 – Potentiel de développement d'embryons de mammifères reconstitués à partir de noyaux de cellules somatiques d'animaux adultes.**

Espèce et tissu utilisé	Nombre d'embryons et % reconstitués	Nombre de blastocystes			Nombre de jeunes nés		Référence
		Total	%	Utilisés	% des embryons transplantés	% des embryons reconstitués	
<i>Mouton</i> Épithélium mammaire .	277 (63,8)	29	(11,7)	29	1 (3,4)	0,4	[Wilmut <i>et al.</i> , 1997]
<i>Souris</i> C/cumulus . . . . .	1 407 (98,4)	800	(56,8 *)	800	17 (2,1)	1,2	[Wakayama <i>et al.</i> , 1998]
<i>Vache</i> Explant cutané . . . . .	175 (62,0)	13	(7,4)	6	1 (16,6)	1,2	[Renard <i>et al.</i> , 1999]
Granulosa . . . . .	552 (77,4)	152	(27,5)	100	10 (10,0)	2,7	[Wells <i>et al.</i> , 1999]
C/germinales primordiales . . . . .	140 (80,9)	53	(37,8)	20	1 (5,0)	1,9	[Zakhartchenko <i>et al.</i> , 1999]

\* Embryons aux stades 8c/à blastocystes.

faible que celui obtenu avec des embryons issus de noyaux embryonnaires. Des avortements tardifs se produisent pendant le dernier trimestre de la gestation (9 mois chez le bovin), et environ 30 à 40 % des animaux issus de clonage de cellules somatiques meurent dans les quelques jours qui suivent la naissance. Cette mortalité élevée ne se rencontre qu'occasionnellement avec les noyaux embryonnaires. Chez la souris, on observe aussi une mortalité importante dès le milieu de la gestation alors que plus de la moitié des embryons issus de clonage s'implantent (Wakayama *et al.*, 1998). Chez ces deux espèces, il a été montré que des perturbations induites par le transfert de noyau peuvent affecter des fonctions spécifiques de l'organisme bien au-delà de la naissance (Reik *et al.*, 1987 chez la souris ; Renard *et al.*, 1999 chez la vache). Mais ces altérations peuvent aussi être induites par les seules conditions de culture ou survenir spontanément (quoique plus rarement) dans les conditions naturelles.

Ces données montrent que si le transfert de noyau peut induire des effets physiologiques à long terme, ces effets ne sont pas spécifiques. Cela ne signifie pas pour autant que le clonage n'induit pas d'effets propres. Il est maintenant établi que les longueurs des extrémités des chromosomes du mouton Dolly, les télomères, sont plus courtes que celles des cellules d'un animal de même âge (Shiels *et al.*, 1999). Les télomères sont formés de séquences répétées d'ADN, et leur longueur diminue progressivement à chaque division jusqu'à atteindre un

seuil critique en dessous duquel la cellule cesse de se diviser et entre en sénescence. Cette observation qui devra être confirmée avec d'autres animaux clonés, suggère que d'autres aberrations génétiques pourraient être associées spécifiquement au transfert de noyaux. Il sera important de savoir si la longueur des télomères de ses agneaux reste plus courte que celle des agneaux issus de la reproduction sexuée.

Quelle que soit l'espèce considérée, le clonage donne naissance à des animaux d'apparence physiologique tout à fait normale. C'est le cas notamment de la brebis Dolly, le plus vieux clone du monde âgé maintenant de trois ans. Des taux de succès élevés peuvent aussi être obtenus puisqu'il a été rapporté la naissance de huit veaux à près transfert de seulement 10 blastocystes (Kato *et al.*, 1998).

## DÉDIFFÉRENCIATION ET TOTIPOTENCE NUCLÉAIRE

Une meilleure maîtrise de la technique de transfert de noyaux reste un préalable pour des applications en élevage, en médecine et aussi pour mieux comprendre la nature des événements associés à la reprogrammation de l'activité des gènes.

Un ajustement des phases du cycle cellulaire du noyau donneur et du cytoplasme receveur a initialement été considéré comme requis pour une reprogrammation complète de l'activité

génique (Campbell 1999). Cet ajustement a permis la naissance du mouton Dolly. Il peut facilement être obtenu en cultivant les cellules pendant plusieurs jours dans un milieu appauvri en sérum afin de les transférer en phase G0/G1 dans un ovocyte lui-même amené à entrer en phase G1 lors ou juste après le transfert. Nous avons toutefois montré, chez le bovin, que des fibroblastes du derme prélevés sur un animal donneur adulte puis cultivés en présence de sérum et maintenus à l'état de prolifération active jusqu'au moment du transfert de noyau pouvaient aussi permettre la naissance d'animaux viables (Vignon *et al.*, 1998).

On dispose encore de peu de données sur les différences d'aptitude des noyaux à la reprogrammation en fonction du type de la cellule donneuse. Les premiers résultats publiés chez la souris suggèrent que les noyaux de cellules en différenciation terminale comme des neurones ou des cellules de Sertoli seraient incapables de redevenir totipotents (Wakayama *et al.*, 1998). Le temps de culture des cellules donneuses de noyaux (nombre de passages) avant utilisation ne semble pas influencer sur l'aptitude au développement des embryons et des données montrent que les noyaux de fibroblastes fœtaux bovins cultivés jusqu'à un stade proche de la sénescence (autour de 30 doublements de la population de cellules) peuvent retrouver leur pouvoir de multiplication après clonage (Cibelli *et al.*, 1998).

De nos expériences réalisées en utilisant comme source de noyaux des fibroblastes obtenus après la mise en culture d'explants de différents tissus (muscle, peau) il ressort une grande variabilité dans l'aptitude à la reprogrammation sans que l'on puisse établir si ces différences sont attribuables au génotype de l'animal donneur ou à des stades de différenciation variables selon les cultures. Afin d'examiner ce point nous avons choisi d'utiliser comme modèles les noyaux de cellules cutanées prélevées à l'oreille d'animaux adultes. Ce choix tient compte des facilités d'accès à ces tissus, mais aussi de la possibilité de disposer de populations cellulaires homogènes et de même génotype, isolées à différents stades de différenciation : kératinocytes différenciés, mélanocytes, cellules de la couche basale de l'épiderme en multiplication active, voire éventuellement les cellules souches de l'épiderme (Vignon *et al.*, soumis). Ces expériences que nous avons initiées chez la vache sont maintenant étendues à la souris dans le but d'identifier les conditions et facteurs permettant aux noyaux de cellules parvenues à différents stades de différenciation de retrouver leur totipotence.

## CONCLUSION

Les données établies maintenant chez plusieurs espèces de mammifères domestiques ainsi que chez la souris montrent que le transfert de noyaux de cellules somatiques cultivées peut aboutir à la naissance d'animaux d'apparence physiologique tout à fait normale. Le clonage commence à être utilisé pour produire des animaux transgéniques par modification du noyau des cellules donneuses lors de la culture. Un pas important vient d'être franchi avec la naissance d'agneaux pour lesquels l'insertion du transgène a pu être ciblée dans une région précise du génome (Ayares, 1999). Des développements importants, tant pour des applications pharmaceutiques, industrielles (production de protéines à haute valeur ajoutée), médicales, (modèles non murins de maladies génétiques humaines) ou agronomiques (remplacement de variants alléliques) sont en train de voir le jour.

La maîtrise du clonage pourra difficilement éviter deux écueils : celui qui résulte du prélèvement d'un noyau porteur d'une anomalie survenue pendant la période de culture du tissu donneur, et celui dû à la persistance aléatoire de défauts de reprogrammation pendant la période relativement courte (par rapport à la longue maturation des cellules sexuelles) au cours de laquelle le noyau doit nécessairement retrouver des caractéristiques fonctionnelles d'un noyau embryonnaire. Les cas de physiopathologies dues au clonage devront donc mieux être connus. Néanmoins, à ce jour, aucune des anomalies du développement observées chez ces animaux ne permet de dire que la technique du transfert de noyau est susceptible de générer des risques lors de la consommation des clones ou de leurs produits dérivés.

Le recul étant toutefois largement insuffisant il nous apparaît tout à fait justifié de différer, par précaution, l'introduction de ces animaux dans la chaîne alimentaire. Une telle mesure peut s'appliquer d'autant plus aisément que le nombre d'animaux domestiques clonés est encore très réduit. Il nous semble toutefois qu'il serait également avisé de définir d'ores et déjà sous quelles conditions cette mesure d'interdiction pourrait être levée. Les avancées scientifiques qui se sont réalisées ces deux dernières années dans le domaine du clonage ont été très rapides. Si elles devaient se poursuivre à ce rythme alors on disposerait d'une situation modèle pour montrer comment des applications de ce qui n'est aujourd'hui encore et avant tout qu'une activité de recherche peuvent être mises en œuvre à la fois rapidement et de façon maîtrisée.

## RÉFÉRENCES

- Adenot P., Mercier Y., Renard J.P. and Thompson E.M. (1997b) Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* 124, 4615-4625.
- Ayares D. (1999) Gene targeting in Livestock. in « Proc. of the Transgenic Animal Research Conference », Tahoe City, California, 15-19 Août 1999, p. 20.
- Bellier S., Chastant S., Adenot P., Vincent M., Renard J.P., Bensaude O. (1997) Nuclear translocation and carboxy-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. *EMBO J.* 16, 6250-6262.
- Campbell K.H.S. (1999) Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle. *Cloning* 1, 3-15.
- Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon A., Robl J.M. (1998) Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258.
- Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y. (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282, 2095-2098.
- Collas P. and Robl J.M. (1991) Relationship between nuclear remodelling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45, 455-465.
- Czolowska R., Modlinski J.A. et Tarkowski A.K. (1984) Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 69, 19-34.
- McGrath J., Solter D. (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220, 1300-1302.
- Reik W., Römer I., Barton S.C., Surani M.A., Howlett S.K., Klose J. (1993) Adult phenotype in the mouse can be affected by epigenetic events in the early embryo. *Development* 119, 933-942.
- Renard J.P., Chastant S., Chesné P., Richard C., Marchal J., Cordonnier N., Chavatte P., Vignon X. (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *The Lancet* 353, 1489-1491.
- Shiels P.G., Kind A.J., Campbell K.H.S., Waddington D., Wilmut I., Colman A. et Schnieke A.E. (1999) Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 399, 316-317.
- Wakayama T., Perry A.C.F., Zucotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374.
- Walker S.K., Hartwich K.M. and Seamark R.F. (1996) The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, 45, 111-120.
- Wells N., Misica P.M., Tervit H.R. (1999) Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60, 996-1005.
- Vignon X., Chesné P., LeBourhis D., Fléchon J.E., Heyman Y., Renard J.P. (1998) Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C.R. Acad. Sci., Paris* 321, 735-745.
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Young L.E., Sinclair K.D., Wilmut I. (1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. in Reproduction* 3, 155-163.
- Zakhartchenko V., Durcova-Hills G., Scherthaner W., Stojkovic M., Reichenbach H.D., Mueller S., Steinborn R., Mueller M., Wenigerkind H., Prella K., Wolf E., Brem G. (1999) Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 52, 421-426.



# La transgénèse animale

Louis-Marie HOUDEBINE

INRA - Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy en Josas

## Résumé

De récents progrès techniques permettent désormais d'envisager l'obtention de lignées d'animaux d'élevage transgéniques destinés à l'alimentation humaine. Cette perspective va logiquement commencer à se concrétiser dans la décennie qui vient. Les risques alimentaires nouveaux que peuvent engendrer de telles pratiques ont en principe plusieurs origines.

Le transfert de gènes se fait depuis ses débuts par microinjection d'ADN dans le noyau ou le cytoplasme des embryons au stade une cellule. Cette technique ne comporte aucun risque. L'utilisation de vecteurs rétroviraux est peu répandue et elle a peu de chance de se développer de manière importante. Elle comporte des risques de dissémination des transgènes par infection. Ces risques sont bien connus et peuvent être complètement maîtrisés comme cela est le cas pour la thérapie génique utilisant les mêmes vecteurs.

L'intégration des gènes étrangers au hasard qui a lieu après la microinjection ou une infection par un rétrovirus peut inactiver ou au contraire activer de manière intempestive des gènes du génome de l'hôte. Aucun examen particulier ne paraît justifié par défaut d'hypothèse sur les effets produits. L'intégration ciblée d'un gène étranger pour ajouter et remplacer une information génétique par recombinaison homologue mettant en œuvre des cellules totipotentes ou différenciées et les techniques de chimères ainsi que de clonage des embryons doit réduire très notablement la fréquence de ces événements.

Les produits des transgènes peuvent être toxiques ou allergènes. La toxicité mais non l'allergénicité doit, dans beaucoup de cas être révélée par l'état de santé des animaux qui sont directement concernés. Les tests classiques de toxicité et d'allergénicité déjà appliqués pour l'alimentation humaine, y compris pour les plantes transgéniques, doivent suffire à limiter les risques à des niveaux très acceptables. Une traçabilité raisonnablement appliquée doit par ailleurs permettre d'arrêter rapidement la consommation d'un produit en cas de problème ou de doute.

Les premières expériences de transgénèse chez les animaux ont eu lieu dans la période 1980-1982. Elles ont donc nettement précédé l'obtention des premières plantes transgéniques. Pour autant, les plantes transgéniques sont actuellement l'objet de débats passionnés dans la mesure où elles commencent à faire partie de la nutrition humaine. Les expériences de transgénèse animale sont relativement peu connues de l'opinion publique, à tel point que la plupart des gens s'imaginent que les OGM (Organismes Génétiquement Modifiés) sont des plantes, alors qu'en toute logique les animaux transgéniques mais aussi les micro-organismes portant un gène étranger sont tout autant des OGM. En réalité, les expériences de transgénèse réalisées chez les animaux sont beaucoup plus nombreuses que chez des plantes, qu'il s'agisse de l'addition de gènes étrangers ou de remplacement de gène par recombinaison homologue encore très expérimental chez les végétaux. Pour autant, le nombre de plantes transgéniques est beaucoup plus élevé que celui des animaux transgéniques dans la mesure où les premières sont cultivées à l'échelle indus-

trielle. Les difficultés techniques et partant les coûts d'obtention des animaux transgéniques sont de toute évidence la raison de cet état de fait qui n'a aucune raison de perdurer. Tout indique que la prochaine décennie va progressivement voir apparaître des lignées d'animaux domestiques destinés à la consommation humaine. De récents progrès ont en effet ouvert des perspectives très prometteuses. Une évaluation des risques pour l'alimentation humaine spécifiques de la transgénèse animale peut et doit donc être faite dans la sérénité pour éviter que le débat ne s'envisage sous la pression des événements comme cela a été le cas pour les plantes.

## QUELS GÈNES VONT ÊTRE UTILISÉS POUR PRÉPARER DES ANIMAUX TRANSGÉNIQUES DESTINÉS À LA CONSOMMATION HUMAINE ?

Les contraintes des marchés et les difficultés techniques vont être des arguments décisifs dans le choix des gènes utilisés pour créer des

lignées d'animaux domestiques. Comme cela a été le cas pour les plantes, les modifications génétiques ont, dans un premier temps, beaucoup plus cherché à faciliter la culture des plantes préexistantes que d'améliorer leurs propriétés biologiques. C'est ainsi qu'on a vu apparaître des plantes résistantes à des herbicides et à des maladies. De la même manière, ce sont pour une bonne part des animaux résistants à des maladies qui ont des chances de s'imposer les premiers. Un tel choix présente en effet plusieurs avantages. Les gènes permettant une résistance à des maladies n'interfèrent pas dans beaucoup de cas avec la physiologie des animaux. Ils peuvent par ailleurs en principe être transférés indépendamment à des lignées d'animaux différents. Le but dans ce cas est de poursuivre l'amélioration génétique d'un côté et éventuellement de leur conférer une résistance à des maladies d'une manière tout à fait indépendante. De tels projets sont susceptibles de simplifier la tâche des éleveurs, de réduire les pertes dues aux maladies et de diminuer les chances qu'un agent pathogène animal se transmette à l'espèce humaine. La réduction des maladies ne peut par ailleurs que contribuer à augmenter le bien-être animal. De tels projets ne devraient donc pas rencontrer trop d'obstacles auprès des protecteurs des animaux, des éleveurs et des consommateurs.

D'autres types de projets visent à augmenter la croissance des animaux. C'est le cas de porcs qui existent en Australie et aux USA. Ces animaux ont une croissance musculaire un peu augmentée tout en utilisant mieux leur ration alimentaire et en ne présentant aucune altération de leur santé. Divers poissons d'élevage sont également disponibles. Les tilapia exprimant un transgène codant pour l'hormone de croissance ont récemment été mis sur le marché à Cuba. Des salmonidés, des poissons chats obtenus à l'état de lignées stables présentent des caractéristiques de croissance semblables.

Des tentatives ont été faites en Australie et en Nouvelle-Zélande pour accélérer la croissance de la laine des moutons.

Il existe d'autres projets de ce type dont la finalité ne vise que l'augmentation de la productivité. Il est ainsi envisagé de transférer des mammifères et des poissons des gènes leur permettant de mieux utiliser leur ration alimentaire. Dans le meilleur des cas, ces animaux sont neutres vis à vis des consommateurs, par rapport à leurs congénères non génétiquement modifiés.

Des essais sont également en cours au Canada notamment pour tenter de diminuer les

rejets en particulier des élevages de porcs. Des porcs transgéniques exprimant un gène de phytase ont ainsi été obtenus. Ces animaux doivent rejeter moins de phosphate dans l'environnement et l'utiliser pour leur croissance. Un tel type de projet a des visées essentiellement environnementales et n'apporte *a priori* pas de bénéfice ni d'inconvénient particulier pour le consommateur. Celui-ci peut donc choisir d'acheter de tels produits pour contribuer à diminuer la pollution due aux élevages.

L'utilisation de la transgénèse pour préparer des alicaments commence à être d'actualité chez les plantes. Les alicaments, qui sont à la fois et sans l'être des aliments et des médicaments, peuvent être de nature très variée. Une liste impressionnante des alicaments qui pourraient être proposés aux consommateurs humains à partir des plantes a été dressée. Il est vraisemblable qu'un équivalent ne se rencontrera pas véritablement dans le domaine animal. Les génomes des animaux domestiques sont en effet en pratique moins malléables que ceux des plantes. Il est donc peu probable que la variété des alicaments d'origine animale soit aussi grande que celle qui s'annonce pour les végétaux. Il ne fait pas de doute cependant que la modification de la composition du lait représente un enjeu important. Il est en effet concevable d'optimiser la composition du lait des ruminants domestiques en réduisant la concentration des molécules mal tolérées par les consommateurs (lactose,  $\beta$ -lactoglobuline, caséines). Il est également envisageable de modifier la composition du lait pour améliorer la qualité du lait destiné à l'industrie laitière. De tels projets peuvent servir cette activité industrielle mais également être bénéfique pour les consommateurs.

Il est bien entendu possible en principe de modifier par transgénèse la composition des carcasses des animaux pour augmenter leur qualité nutritive pour les consommateurs. Il est aussi concevable de changer la composition en lipides de certaines viandes pour diminuer le risque de maladies cardio-vasculaires des consommateurs. On peut également imaginer utiliser des gènes qui augmentent la qualité organoleptique des produits animaux. Ces phénomènes sont par nature complexes, le plus souvent dépendants de plusieurs gènes qui ne sont pas connus. Il est out à fait possible que la sélection classique reste une approche plus performante pour ce type de problème.

Un certain nombre d'animaux transgéniques vont être utilisés pour produire des protéines recombinantes ayant des propriétés thérapeu-

tiques et des cellules ainsi que des organes destinés à être transplantés à des patients. De tels animaux ont peu de chance d'être introduits dans la chaîne alimentaire humaine. Ils concernent donc les patients et non les consommateurs.

## **LES TECHNIQUES DE LA TRANSGÉNÈSE ANIMALE**

La technique proposée dès 1980 pour les mammifères est encore celle qui a la faveur des biologistes et des biotechnologistes. Elle consiste à faire une microinjection d'un gène fonctionnel sous forme linéaire directement dans l'un des pronoyaux des embryons au stade une cellule. Ce procédé est relativement peu efficace puisque le nombre d'individus transgéniques qui résultent de cette opération varie de 0,1 à 5 % des embryons manipulés selon les espèces. Chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés, la microinjection de gène doit se faire dans le cytoplasme de l'embryon. L'utilisation de vecteurs rétroviraux ou de transposons permet chez les insectes et les poissons de transférer des gènes étrangers. Il est également possible dans certains cas d'utiliser le spermatozoïde préalablement modifié et incubé en présence d'ADN pour véhiculer le gène étranger après une fécondation par ICSI. Toutes ces méthodes sont des additions de gènes étrangers qui s'intègrent dans des sites quelconques du génome.

Les cellules animales ont des mécanismes de réparation de l'ADN qui permettent à un fragment d'ADN étranger de prendre la place d'un gène endogène par un processus de recombinaison homologue. Ceci n'est possible que si l'ADN exogène proposé présente de longues séquences homologues à celles du gène endogène cible. En pratique également, le remplacement de gène n'est possible que si l'on peut utiliser les cellules qui ont subi la recombinaison homologue pour procéder au développement d'un embryon jusqu'à donner naissance à un individu adulte. Ceci est possible chez la souris en utilisant des cellules embryonnaires souches (ES) totipotentes réintroduites dans des embryons précoces pour former des chimères puis des animaux transgéniques mosaïques. En théorie, le remplacement de gène par recombinaison homologue devrait pouvoir être réalisé dans des cellules somatiques utilisées ultérieurement pour donner naissance à des animaux par la technique de clonage après transfert de noyau.

Aucune de ces techniques sauf celles qui utilisent les vecteurs rétroviraux ne posent de problèmes de biosécurité particuliers. Ceux-ci peuvent être utilisés dans des conditions très

sûres qui sont celles définies pour la thérapie génique humaine.

Dans le futur, il est vraisemblable que des vecteurs épisomaux linéaires ou circulaires, donc capables de s'autorépliquer comme des mini-chromosomes autonomes, seront utilisables pour véhiculer des gènes étrangers. Ces vecteurs qui présentent en principe de grands avantages devront être construits de manière à ce qu'ils ne soient pas transmis aux cellules bactériennes de la flore intestinale.

## **LES RISQUES DUS À L'INTÉGRATION D'UN GÈNE ÉTRANGER DANS UN SITE QUELCONQUE DU GÉNOME**

Il est admis que chez les organismes supérieurs, les régions du génome qui contiennent des informations génétiques ne représentent pas plus de 5 % de l'ADN. La probabilité pour qu'un gène étranger s'intègre dans un ou au voisinage d'une région transcrite du génome est donc relativement faible. Elle peut se traduire par l'inactivation définitive d'un gène de l'hôte ou au contraire par une activation intempestive d'un de ces gènes, y compris de génomes rétroviraux endogènes. Les effets sont essentiellement imprévisibles car ils résultent de phénomènes non contrôlés qui accompagnent l'intégration du gène étranger. Il paraît peu raisonnable d'envisager des études pour déterminer les effets de tels événements, dans la mesure où les hypothèses font défaut. Une observation empirique des animaux suffisamment approfondie doit suffire pour déterminer si leur consommation par l'espèce humaine peut poser des problèmes.

## **LES RISQUES DUS AUX TRANSGÈNES**

Dans la majorité des cas, un transgène contient une information génétique qui se traduit par la synthèse d'une protéine. Celle-ci peut avoir des propriétés toxiques ou allergènes. Elle peut également dans certains cas favoriser le développement de maladies chez les animaux.

Il est assez peu probable que la toxicité d'une protéine dérivant d'un transgène passe longtemps inaperçue. Contrairement à ce qui peut arriver avec les plantes transgéniques, une protéine toxique pour l'espèce humaine a toutes les chances de l'être pour l'animal transgénique lui-même. Que ceci soit le cas ou non, la toxicité des produits dérivés des animaux transgéniques doit être évaluée par les tests classiques. Il n'y a aucune raison *a priori* que ces tests ne soient pas suffisants.

Il en est de même pour l'allergénicité des protéines dérivant des transgènes à une différence près toutefois. L'animal exprime en effet son transgène depuis les stades précoces du développement du fœtus. La protéine dérivant du transgène fait donc partie du soi de l'animal et peut déclencher des réactions allergènes chez le consommateur mais non chez son hôte.

L'évaluation des propriétés allergènes des produits dérivés des animaux transgéniques par les tests classiques doivent pouvoir être suffisants dans la très grande majorité des cas.

Certaines protéines peuvent favoriser le développement de maladies chez les animaux. C'est le cas de protéines servant de récepteur pour les virus. Une protéine peut avoir une telle fonction à l'insu de l'expérimentateur. Cette situation n'est pas très différente de celle à laquelle on est confronté lorsque l'on procède à une amélioration génétique par sélection classique. Celle-ci se fait en effet le plus souvent de manière totalement aveugle puisque l'expérimentateur ignore tout des modifications génétiques qui ont eu lieu spontanément et qu'il stabilise par la sélection. Une observation suffisamment longue et approfondie des lignées d'animaux transgéniques doit donc être faite pour éviter que ceux-ci contractent des maladies qui pourraient être transmises aux consommateurs humains.

Certaines molécules, c'est le cas de la protéine PrP, sont impliquées directement dans des processus infectieux. L'expression intempestive d'un gène codant pour une telle protéine peut avoir des conséquences néfastes pour le consommateur. Une observation prolongée des animaux doit suffire à apporter un niveau de sécurité acceptable.

Pour des raisons d'ordre technique concernant le fonctionnement des transgènes, le transfert d'ADN ne se fait chez les animaux en utilisant le plus souvent que le matériel génétique étranger strictement nécessaire. La présence de gènes de résistance à des antibiotiques par exemple, qui est de toute façon sans risque réel pour les consommateurs, n'a pas de chance de poser de problème chez les animaux transgéniques.

### **LES RISQUES DUS AUX EFFETS SECONDAIRES DES PRODUITS DES TRANSGÈNES**

Une protéine peut avoir certains effets biologiques sans rapport avec son activité normale. Ceci est particulièrement vrai lorsqu'elle est

présente à une concentration élevée, ce qui peut être le cas lorsqu'un transgène s'exprime à un niveau élevé. Ceci inclut une éventuelle accumulation augmentée de contaminants chimiques normalement présents dans l'environnement des animaux. Il en est de même pour les produits des transgènes qui ne sont pas traduits en protéines. C'est le cas pour les ARN antisens, les ribozymes et les ARN formant une triple hélice et qui sont utilisés pour inhiber l'expression de gènes cellulaires ou viraux.

Ces différents effets secondaires sont *a priori* très peu fréquents mais largement imprévisibles. Il ne semble pas judicieux de procéder à un des examens spécifiques pour évaluer ces effets secondaires par défaut d'hypothèse. Un examen global des animaux mettant en œuvre les tests mentionnés plus haut doit suffire pour déceler d'éventuels problèmes pour l'alimentation humaine.

### **LES RISQUES DUS À LA DISSÉMINATION DES TRANSGÈNES**

La dissémination des transgènes dans l'environnement n'est en soi pas un problème pour l'alimentation humaine. Le transfert d'un transgène par le croisement d'un animal transgénique d'élevage avec un homologue sauvage peut modifier les propriétés alimentaires de ce dernier qui peut être consommé après avoir été chassé. Cette situation peut poser un problème dans la mesure où elle échappe à l'observation humaine. Les produits provenant des animaux sauvages n'ont en effet aucune raison d'être soumis aux différents tests mentionnés précédemment.

Une telle éventualité n'est que relativement théorique. En effet, la plupart des animaux d'élevage n'ont depuis longtemps plus aucun échange de gène avec leurs homologues sauvages qui parfois n'existent même plus. Seuls certains animaux aquatiques et aériens peuvent poser de tels problèmes. Ces expériences de génie génétique, y compris la transgénèse, sont réalisées dans des conditions qui ne doivent pas permettre la dissémination des transgènes. Les animaux qui sont susceptibles de transférer leurs transgènes à leurs homologues sauvages, comme les salmonidés, doivent être strictement contrôlés. Leur élevage doit être strictement confiné, réalisé dans des régions ne comportant pas d'homologues sauvages où il doit être réservé à des individus préalablement stérilisés. Ces conditions seront imposées pour des raisons d'ordre environnemental avant même que

soient envisagés les problèmes de leur consommation par l'espèce humaine. Ces problèmes devraient donc être résolus avant que les problèmes de consommation ne se posent vraiment.

## CONCLUSION

Les problèmes que pose la consommation humaine des animaux transgéniques sont donc essentiellement les mêmes que ceux auxquels on s'affronte déjà avec les plantes transgéniques. Ils sont en réalité moins importants dans la mesure où les animaux sont les premiers vecteurs potentiels de transgènes ayant des effets biologiques néfastes et également en raison de la faible dissémination effective des transgènes à partir des animaux domestiques. Les tests de

toxicité et d'allergénicité classiques déjà appliqués aux plantes transgéniques doivent suffire. Une observation supplémentaire globale des animaux doit réduire les risques à un niveau très bas. La longue expérience qu'ont acquise les communautés humaines après des millénaires d'élevage et de sélection est un garant que dans ce domaine un empirisme vigilant doit nous mettre à l'abri de mauvaises surprises. Les organismes vivants sont par essence des entités particulièrement complexes dont beaucoup d'éléments sont et resteront longtemps mal connus. La survenue d'un événement indésirable pour l'espèce humaine ; même très improbable, ne peut donc jamais être totalement exclue. Une traçabilité pratiquée dans des conditions raisonnables doit suffire pour décider rapidement l'arrêt de la consommation de produits comportant des risques pour les consommateurs humains.

## RÉFÉRENCES

- Houdebine L.M. (1998) Les biotechnologies animales. Nécessité ou révolution inutile. Éditions France Agricole.
- Della Penna D. (1999) Nutritional genomics: manipulating plant micronutriments to improve human health. *Science* 285, 375-379.
- Houdebine L.M. The impact of genetic engineering on milk production. 25th International Dairy Congress 1998 Aarhus (sous presse).
- Houdebine L.M. (1999) L'impact de la cartographie des génomes, du clonage et de la transgénèse chez les animaux domestiques. Cahiers/Agriculture (sous presse).
- Houdebine L.M. (1998) Les animaux transgéniques. Lavoisier. Collection Génie Génétique (livre de 181 pages).
- Houdebine L.M. (1999) Le transfert de gène chez l'animal. *Le Technoscope de Biofutur* 190, 2-14.
- Houdebine L.M. (1999) Le confinement des animaux transgéniques. 15<sup>e</sup> journées d'étude IFFA-CREDO (sous presse).
-



## DISCUSSION DE LA PREMIÈRE SESSION

**Michel Thibier** — Dans le cadre de la première génération et pour les autres espèces qui nous intéressent, l'insémination, porcine par exemple, est maintenant quelque chose qui se répand davantage. Concernant les transferts embryonnaires dans ces autres espèces, quelles sont les tendances mondiales ?

**Patrice Humblot** — L'utilisation est assez marginale encore pour les transferts embryonnaires pour les petits ruminants, puisque les coûts de production par embryon dépassent souvent les coûts acceptables économiquement pour l'utilisation de ces techniques. Nous avons un développement encore assez réduit du transfert embryonnaire pour les petites espèces.

**Jacques Laporte - INRA** — Concernant les embryons, quels sont les critères de choix de ceux-ci ?

**Patrice Humblot** — Ce sont des critères morphologiques essentiellement. Actuellement, il n'y a pas de bons critères simples d'évaluation de la qualité d'un embryon pour évaluer son potentiel de développement.

Nous utilisons uniquement des critères morphologiques qui, dans le cadre des embryons produits, sont en bonne corrélation avec les taux de gestation que l'on obtient par la suite après transfert. Ils sont décrits précisément dans le Manuel de la Société Mondiale de Transfert Embryonnaire (IETS) en particulier (1998). Il y a une classification très précise de la qualité des embryons en fonction des critères morphologiques.

**Robert Ducluzeau - INRA** — Lorsque vous dites que l'on passe de quelques millions de germes à quelques cent mille, en passant d'une éjaculation normale à une insémination artificielle, est-ce simplement une question de dilution ou bien y a-t-il un traitement sanitaire quelconque entre les deux ?

**Patrice Humblot** — Deux choses interviennent : les conditions de récolte et d'entretien des taureaux qui sont quand même tout à fait différentes pour un taureau en centre insémination et un taureau dans les conditions naturelles.

Pour les centres qui ont recours au « Lay-off »...

**Michel Thibier** — Pouvez-vous traduire ce que signifie le « Lay-off » pour l'assistance, s'il vous plaît ?

**Patrice Humblot** — Le « Lay-off » est une mise en attente, parfois au pré, des taureaux ayant plus tard une reprise d'une production plus intensive, si la valeur génétique de l'animal ainsi testé le justifie.

Les personnes qui utilisent ces techniques ont bien montré que l'on avait quand même davantage de problèmes inflammatoires pour les taureaux ainsi en attente que dans les conditions d'entretien classiques.

Dans cette différence de concentrations de germes, intervient aussi le processus de dilution de la semence.

**Labib Bakkali - AFSSA Alfort** — Vous avez mentionné que les risques génétiques sont nuls dans ces expérimentations. Comment peut-on affirmer cela ? La stabilité génétique des embryons est-elle aussi contrôlée ?

**Bernard Guérin** — On prend un spermatozoïde qui ne subit aucune modification puisqu'il s'agit d'un spermatozoïde qui est issu de la semence congelée utilisée habituellement pour l'insémination artificielle. De ce point de vue il n'y a strictement aucune différence.

L'intégrité de l'ovocyte par rapport à l'ovule pendant la fécondation *in vivo* est strictement la même. Le fait de réaliser une fécondation *in vitro*, qui ne fait intervenir que des phénomènes de membranes, ne peut pas entraîner de modifications génétiques.

On pourrait se lancer dans une étude de comparaison des génomes pour affirmer cette affaire. Le problème de la recherche est qu'il faut qu'elle soit cohérente et qu'elle ait une raison d'aboutir. Or là, si on se lançait dans des recherches comme celles-ci, on ferait fausse route et on gâcherait beaucoup d'argent.

**Alain Rérat - INRA** — Y a-t-il une différence entre ovocytes d'abattoir et ovocytes prélevés sur les vaches en ce qui concerne les conséquences, les techniques de prélèvements, etc ? Peut-il y avoir des problèmes à ce niveau ?

**Bernard Guérin** — Concernant l'abattoir, les techniques de prélèvement sont différentes car à l'abattoir on a l'ovaire tout proche, il est donc plus facile d'aller récupérer les ovocytes dans les follicules que l'on voit à l'œil nu. Tandis qu'avec un animal vivant, c'est fait sous échographie, c'est donc différent.

Concernant les risques, la différence est surtout un risque sanitaire de santé animale. Dans des conditions d'abattoirs, on n'est pas dans des conditions aussi bien contrôlées, en particulier par rapport à la première étape qui est la tuerie. Tout le monde sait que dans les abattoirs les conditions d'écologie bactériennes ne sont pas les mêmes que dans un laboratoire où il y a des salles blanches...

Donc, le fait de récupérer des ovaires à l'abattoir est associé à un risque un peu plus important au plan sanitaire. On maîtrise cependant cela très bien, puisque l'on a des méthodes de traitement et de désinfection de ces ovaires ainsi que des méthodes de traitement qui sont bactériologiquement propres, sans être stériles puisque nous sommes dans un environnement d'abattoir.

Un point important, d'ailleurs intégré dans la réglementation, est qu'avant de remettre ces embryons produits dans ces conditions, avant de les transférer, on va s'informer du statut sanitaire, non pas des vaches donneuses car c'est difficile, mais du lot de vaches donneuses. Donc, on ne va libérer éventuellement ces embryons que dans la mesure où on aura la garantie, qu'au départ, le lot d'animaux qui a donné ces embryons était sanitaire-ment indemne de toutes les maladies évoquées précédemment.

**François Madec - AFSSA Ploufragan** — Quelles sont les perspectives des transferts d'embryons pour l'assainissement des troupeaux ?

La situation est telle dans un certain nombre d'espèces animales que les grandes maladies sont aujourd'hui contrôlées. Nous en avons parlé à Zurich, en août, mais néanmoins nous sommes aujourd'hui ennuyés par certaines maladies dans lesquelles des virus en particulier sont impliqués et pour lesquels le diagnostic n'est pas toujours facile.

Quelles sont les perspectives du transfert d'embryons dans l'assainissement des troupeaux, est-ce laisser de côté les différents contaminants tout en préservant le patrimoine génétique ?

**Bernard Guérin** — Un réel et énorme potentiel de ces biotechnologies est de mettre la technique au service « du sanitaire » pour la sauvegarde de l'élevage.

Dans un certain nombre de travaux expérimentaux, sur le terrain et dans des conditions complètes, on a montré qu'en fait on pouvait très bien et facilement maîtriser, via le transfert et la production d'embryons, ces problèmes sanitaires et on peut, très facilement, pour des problèmes de brucellose de leucose, d'IBR, de BVD, par exemple, sauver la génétique d'un troupeau uniquement avec l'utilisation du transfert d'embryon ou de la fécondation *in vitro*.

**François André - ENVN** — Dans le cas de clonage à partir de cellule somatique, la mère porteuse est-elle toujours un autre individu que celui dont est issue la cellule somatique ?

**Jean-Paul Renard** — Oui. On prend en compte les données, maintenant très larges avec le transfert d'embryon, qui montrent que l'on peut utiliser une receveuse de la même espèce, quoique la question puisse se poser, mais génétiquement différente.

**François André** — N'y a-t-il pas d'incompatibilité à ce que celle qui donne la cellule somatique soit porteuse ?

**Jean-Paul Renard** — C'est une expérience encore difficile à réaliser. Compte tenu de la faible efficacité du clonage, il faut en effet pouvoir disposer d'un nombre relativement élevé d'ovocytes receveurs (après énucléation). Nous envisageons néanmoins de pouvoir répondre prochainement à cette question en tirant parti du fait que chez le bovin il est possible, comme l'a montré Patrice Humblot de prélever des ovocytes deux fois par semaine pendant plusieurs semaines consécutives. Avec cet « auto-clonage », les noyaux donneurs et les ovocytes de la femelle proviennent bien de la même femelle qui sera ensuite transplanté avec l'embryon cloné qui est son propre clone ! Cette expérience est intéressante, mais il faudra avoir suffisamment d'animaux pour voir ce qu'il en est sur le développement et la physiologie des clones.

**François André** — La question est la suivante : la mortalité serait-elle la même dans ce cas si la mère porteuse est externe ?

**Jean-Paul Renard** — Peut être plus faible car dans ce cas, l'ADN mitochondrial de la cellule donneuse est le même que celui du cytoplasme receveur. C'est justement un des intérêts de cette approche que de pouvoir poser des questions fondamentales sur le rôle des interactions noyau/cytoplasme dans le développement de l'embryon et plus précisément qu'en est-il du rôle de l'ADN mitochondrial dans le développement du fœtus ?

**André Parodi** — Dans le prolongement des conclusions et de l'exploitation qui peut être faite de ces animaux, vous avez fait allusions à des anomalies dites spécifiques ou fonctionnelles, je pense en particulier au développement insuffisant du système lymphoïde que nous avons eu l'occasion d'observer. Ces anomalies peuvent constituer un modèle tout à fait remarquable de troubles de l'ontogénèse du système lymphoïde.

A votre connaissance, y a-t-il un début d'exploitation de cette anomalie dans le sens d'une compréhension de son origine possible et de son mécanisme ?

**Jean-Paul Renard** — Non, pas encore. Nous, nous en sommes encore à l'état du constat. L'article que nous avons publié sur cette question a attiré l'attention d'autres équipes, notamment américaines, qui s'intéressent elles aussi au clonage bovin, comme la Société Genzyme.

**Martin Hirsch** — Si j'ai bien compris, il y a 2 000 clones issus de transferts de noyaux embryonnaires et une centaine issus de transferts de cellules somatiques.

**Michel Thibier** — Oui, c'est exact.

**Martin Hirsch** — La question de l'introduction de ces 2 100 animaux dans la chaîne alimentaire, s'est-elle déjà posée ?

**Jean-Paul Renard** — Les clones embryonnaires, qui existent depuis environ 1989, ont été introduits dans la chaîne alimentaire. On utilise des ovocytes maturés *in vitro*, et les embryons donneurs de noyaux sont cultivés quelques jours comme pour le transfert d'embryons. La seule différence avec la fécondation *in vitro* est que l'ovocyte est fusionné avec une cellule embryonnaire au lieu de l'être avec un spermatozoïde. Mais par rapport au clonage somatique, il n'y a pas là, de véritable « reprogrammation » de l'activité du noyau. C'est ainsi que nous avons raisonné. A partir du moment où on utilisait les noyaux somatiques, nous avons considéré que, là, la reprogrammation était en jeu. Par précaution, nous avons décidé de ne pas introduire ces animaux dans la chaîne alimentaire. D'ailleurs, l'étude de leurs caractéristiques physiologiques sera longue (comment vieilliront-ils ?). Depuis, une note interne à l'INRA a établi un moratoire sur l'utilisation hors recherche de ces animaux. Aujourd'hui nos clones somatiques (nous avons à ce jour fait naître une douzaine de veaux) sont destinés à être incinérés ainsi que les produits de ces clones somatiques y compris le lait de cinq clones actuellement en lactation qui est jeté tous les jours

**Martin Hirsch** — Et dans les autres pays ?

**Jean-Paul Renard** — Michel Thibier précisera sans doute ce point. A ma connaissance, il n'y a pas eu encore dans les autres pays, d'introduction de clones somatiques dans la chaîne alimentaire. Les premiers bovins issus de clonage d'animaux adultes sont nés à l'INRA et au Japon ! J'ignore si des mesures aussi claires que celles de l'INRA ont été prises dans les quelques laboratoires de recherches étrangers qui travaillent sur le clonage bovin.

**Michel Thibier** — Le Japon a estimé que les produits animaux issus d'individus clonés pouvaient entrer dans la chaîne alimentaire, l'ambassade de France l'a confirmé il y a quelques jours, pour les animaux issus du clonage seul<sup>1</sup>.

Mais, il n'est pas toujours facile de déterminer avec précision s'il s'agit de clonages de noyau embryonnaire ou somatique. Il est vrai qu'il n'y a pas tellement de clones issus de noyau somatique qui sont en âge d'être mis dans la chaîne alimentaire de toute façon !... Au Japon, certains clones issus de noyaux de cellules embryonnaires, avec l'accord formel du Ministère de l'agriculture, ont été accueillis dans la chaîne alimentaire.

**Patrick Dujardin - Gembloux (Belgique)** — Dans le domaine de la transgénése végétale, nous sommes assez préoccupés par des phénomènes d'extinction de gènes dans des situations d'addition génique où l'on perd l'expression à la fois du transgène et du gène endogène. Cela se passe à des fréquences élevées.

Qu'en est-il dans le domaine animal ?

**Louis-Marie Houdebine** — Nous n'avons pas ces mêmes problèmes chez les animaux. Cependant, il y a toute une série de transgènes qui ne fonctionnent pas bien, on n'en connaît pas la raison, cela pourrait faire appel à ce genre de phénomène. C'est à l'étude, mais ce n'est certainement pas la même fréquence que chez les plantes.

**Bernard Chevassus-au-Louis** — Concernant la question du caractère potentiellement mutagène, lié à des sites d'insertion qui déstabilisent les expressions, cette question de l'évaluation du risque fait-elle l'objet de protocole en France ou dans le monde ou bien justement par défaut d'hypothèse, on ne fait rien ?

Est-ce un sujet qui fait l'objet de recherches ?

**Louis-Marie Houdebine** — Très peu de travaux fondamentaux ont été réalisés pour montrer qu'il y avait, *in situ*, à l'endroit où le transgène s'était intégré des modifications du chromosome. Seules quelques équipes les ont effectués et c'est ainsi que l'on sait qu'il se passe quelque chose.

Avant, la question ne se posait pas puisqu'il n'y avait pas d'animaux à vendre, donc il était inutile de faire des observations.

Si on voulait observer l'environnement du transgène, il faudrait connaître précisément le chromosome dans sa structure normale pour savoir si quelque chose a été muté à cet endroit là. C'est un travail considérable et connaît-on la modification transgénétique qui s'est passée, comment pourrait-on savoir quelles sont les conséquences. Je me demande si une observation globale n'est pas préférable, même si elle paraît un peu grossière.

---

1. L'Ambassade a confirmé depuis qu'il s'agit bien et seulement, de clones issus de cellules embryonnaires.

**André Parodi** — A travers les exposés de ce matin, il a été parfaitement visible que du point de vue de la sécurité, en particulier de la sécurité microbiologique, les biotechnologies appliquées à la reproduction aux première, deuxième et troisième générations étaient une avancée considérable.

Ma question est beaucoup plus diffuse et plus large. Quels sont les éléments de réponse que les scientifiques vont pouvoir apporter à la perception qu'a le public, donc le consommateur, des produits issus de ces manipulations ?

Cela pour au moins deux raisons. Premièrement, ce sont des manipulations. Chacun sait que le regard du public est très prudent, voire hostile vis-à-vis de ces procédés.

On connaît des précédents. L'irradiation, par exemple, en matière de sécurité microbiologique des viandes, n'a jamais eu de succès car il existe une répulsion du public pour ce procédé.

Deuxièmement, et on le voit à travers la grande presse, le consommateur veut non seulement la sécurité sanitaire de l'aliment, mais, il veut que la viande, le lait, les œufs qu'il consomme soient issus d'un cochon, d'une vache, d'une poule « heureuse », c'est le terme que l'on entend. Tout ce qui est manipulation avec des approximations anthropomorphiques que l'on sait, est un élément péjoratif.

Il y a un vrai problème de perception par le consommateur de tous ces procédés et, comme dans tous les cas, il faut que les scientifiques se préparent à affronter ce type de réaction que les anglo-saxons diraient « émotionnelle ».

**Une intervenante** — Je suis militante d'une association de consommateurs : la Confédération Nationale du Logement et de la Consommation. Je travaille avec les 14 associations de la Maison de la Consommation de Rennes. Je suis impliquée, ainsi que d'autres associations, dans le mouvement cohérence qui regroupe presque 70 associations de consommateurs, environnementalistes, paysans, défenseurs de bassins et je n'approuve pas du tout la remarque du Professeur Parodi.

Nous, les consommateurs, nous n'avons pas des réactions sensibles et émotionnelles ou rétrogrades, comme on veut bien le dire. Nous serions peut-être beaucoup plus réceptifs s'il y avait une véritable traçabilité, et davantage de transparence, si on nous disait ce qui est réalisé dans la réalité et, quand les produits nous arrivent, si on savait comment ils ont été produits. Voilà la raison.

Dans les travaux que vous effectuez, vous les scientifiques que je respecte et que j'honore, nous nous soucions peu des problèmes de goût. Lorsque vous sélectionnez des races, vous souciez-vous du goût de la viande qui sera produite ?

Actuellement, nous sommes en recherche, les consommateurs avec des chercheurs, avec des spécialistes de l'agriculture et de l'élevage pour mettre au point des cahiers des charges, par exemple de porcs durables et de porcs bio. Nous communiquons avec la Chambre des consommateurs d'Alsace pour savoir ce qu'ils ont fait et nous nous apercevons que des races anciennes, comme le porc blanc de l'ouest, ont été délaissées car on a sélectionné des races en examinant le gène de sensibilité au gaz halotane.

Nous, consommateurs, nous regrettons lorsque nous mangeons du porc, que toutes les sélections qui ont eu lieu aboutissent à des viandes qui ont toutes le même goût, et nous l'avouons, pas assez de goût. On a plus le goût que nous avons, ce n'est pas parce que nous sommes réactionnaires et nous voulons manger des viandes comme du temps de nos grands-parents. Nous constatons que le porc élevé en Corse, qui vit plus longtemps, a du goût, tandis que nous, nous avons du porc qui n'en a plus de goût.

Ne faudrait-il pas penser aussi à des sélections pour de viandes pour la charcuterie et de viandes pour la consommation ?

**Michel Thibier** — La qualité des produits est à l'ordre du jour des programmes de recherches de tous les grands instituts mondiaux de zootechnie. Par conséquent, il y a un effort de ce côté là tout à fait identifié. Il y a également un programme, que certains d'entre vous connaissent bien, de maintien de la biodiversité et de la conservation d'un certain nombre de races menacées d'extinction. Il existe plusieurs investigations et projets qui vont dans votre sens. Nous avons noté que le souci de la transparence et de la traçabilité est légitime et que certains organismes, représentant les consommateurs tel que le vôtre, y sont tout à fait sensibles.

Concernant le sujet d'aujourd'hui et pour reprendre une partie de la question que nous réexaminerons cet après-midi, souhaitez-vous nous faire part de vos réflexions concernant la perception du public ou préférez-vous vous engager, dès à présent, sur les pistes que pourraient comprendre les dernières générations de biotechnologie en matière de qualité ?

**Bernard Guérin** — Je souhaite dire à Madame que je suis assez content de son intervention. Pas tout à fait au début, car j'ai cru comprendre que le Professeur Parodi ouvrait simplement le débat mais ne faisait pas un jugement d'espèce ou de valeur.

Vous dites qu'il y a réellement un problème d'entente entre les consommateurs et les scientifiques, lesquels, en dehors de leur zone de compétences, redeviennent des consommateurs comme tout le monde, il ne faut pas l'oublier.

Ce dialogue me paraît essentiel, en particulier pour deux raisons : la première est que l'on a tendance à oublier que parce qu'on fait souvent référence, surtout dans les associations de consommateurs, au naturel et aux méthodes anciennes, on oublie que dans le passé, il existait beaucoup de problèmes liés par exemple aux poules qui allaient sur le tas de fumier et qui transmettaient la tuberculose, le lait des vaches ou des chèvres qui était bu directement après la traite et qui transmettait la brucellose.

Je pense également au problème du botulisme lié à la consommation des conserves et des charcuteries faites maison et qui tuent 250 personnes par an, c'est-à-dire à peu près quatre fois plus que la BSE.

A ce jour, certains éléments sont bien connus, bien maîtrisés parce que la technique a apporté quelque chose.

Concernant l'utilisation des biotechnologies, deux éléments sont essentielles, d'abord la sauvegarde du patrimoine génétique car ce sont les dizaines d'années qui ont précédé, c'est la collectivité nationale, l'État français, les éleveurs français qui ont investi et qui aujourd'hui ont positionné la France, en tout cas la génétique bovine, au premier niveau mondial. Ce patrimoine appartient à tout le monde. Il faut sans doute le perfectionner dans le sens que vous indiquez comme le goût et autres.

En dehors de cet aspect de la sauvegarde du patrimoine génétique, il y a aussi le problème de la sécurité alimentaire et sanitaire. Ces animaux doivent être en bonne santé pour leur bien être et aussi parce que toute maladie entraîne des problèmes de reproduction, donc des problèmes au niveau des éleveurs et éventuellement à celui de la qualité de la viande, puisqu'après les animaux peuvent être saisis à l'abattoir et aller à l'équarrissage.

Ce sont deux axes très forts et nos biotechnologies s'inscrivent dans ce sens.

Des études commencent à être faites sur le bien-être animal, en particulier liées au prélèvement d'ovocytes sous échographie. On démontre, d'une façon scientifique, avec des paramètres d'évaluation du stress, qui sont des paramètres objectifs, qu'en fait les animaux, dans ces conditions, ne souffrent absolument pas. Cette étude est conduite, en particulier, à l'école vétérinaire d'Alfort.

**Patrice Humblot** — Toutes les techniques de reproduction s'inscrivent dans une optique d'amélioration génétique. Nous sommes les professionnels de l'insémination, nous avons des outils pour faire fonctionner ces techniques de façon correcte. Maintenant, tout est une affaire de sélection et de savoir comment on va l'orienter. Mais ces outils existent et on peut orienter la sélection dans le sens où l'on veut.

Si un jour on souhaite renforcer la sélection sur la qualité, nous avons ces outils à disposition. Bernard Guérin évoquait les problèmes de sécurité sanitaire, c'est sûrement le problème essentiel dans un premier temps.

Les techniques de reproduction plus élaborées, comme la fécondation *in vitro* ou celles qui permettent d'augmenter le nombre d'embryons produits par animal, permettent de profiter au mieux de la variabilité génétique et s'inscrivent tout à fait dans les programmes.

Nous avons parlé de la biodiversité pour recréer des noyaux dans certaines races à petits effectifs et pour obtenir des caractéristiques de production viables par rapport à des productions de races à petits effectifs et des productions très spécialisées, comme les fromages de montagne. Ces outils de fécondation *in vitro* sont très utiles, les éleveurs en voient des effets très rapides, des noyaux de producteurs vers des productions de qualité.

**Jean-Paul Renard** — Quelle procédure peut être validée pour estimer et connaître la qualité sanitaire des aliments issus des animaux manipulés ?

On voit bien qu'une réponse positive pour l'utilisation alimentaire des animaux a déjà été apportée pour toute une série de manipulations de première et deuxième générations (selon la classification présentée par Michel Thibier), c'est-à-dire celles développées jusqu'à la technologie de la fécondation *in vitro*. La réponse est claire quand on dit que du point de vue sanitaire, ces animaux sont sans doute en meilleure santé que les animaux issus d'accouplement naturel où la difficulté de contrôle est beaucoup plus grande.

Mais la réponse est moins claire quand il s'agit d'animaux issus de clonage ou de transgénèse. Je m'interroge bien sûr, sur la qualité sanitaire des aliments issus de ces animaux. Mais aussi, en tant que scientifique, sur les modalités qui permettront de connaître la qualité de ces « nouveaux aliments » notamment dans le cas des clones. Qu'entend-on ici par « qualité sanitaire des aliments produits par des animaux sans problème sanitaire apparent » ? Quels types d'aliments : crus, cuits, pasteurisés pour le lait ? Traités sous quelles formes ?

Mais ce qu'il faut bien comprendre, c'est que nous sommes en quelque sorte aujourd'hui au milieu du gué. Notre objectif, sans doute à long terme, est d'utiliser aussi le clonage pour réaliser une transgénèse « propre », c'est-à-dire faire que l'on puisse remplacer un gène (plus précisément un allèle) par un autre plus intéressant. On peut imaginer par exemple, que l'on pourra dans l'avenir intervenir sur un gène clé d'une chaîne métabolique, pour modifier par exemple, la composition des lipides insaturés et enrichir le goût de la viande.

Ce sont des idées qui peuvent se traduire en terme de projets de recherches à condition que l'on arrive sur l'autre rive, c'est-à-dire que l'on maîtrise cet ensemble de techniques. Nous n'y sommes pas encore.

**Louis-Marie Houdebine** — Il faudrait ne pas tenir compte de l'idée perverse qui consiste à dire qu'une technique sophistiquée pour produire quelque chose est forcément ennemie de la qualité. La technique fait ce qu'on lui demande. Or, depuis quelques décennies, on lui a demandé de produire pas cher. Là, le consommateur a une attitude très ambiguë.

Quand on observe les enquêtes réalisées, la première chose que demande encore le consommateur, c'est de la nourriture pas cher, mais il la voudrait également de qualité. Certes, ce n'est pas incompatible, mais on ne peut pas faire un miracle en si peu de temps. Donc, combiner à la fois des choses pas chères et des choses de qualité, il faut du temps. Nous sommes sur cette voie.

**Patrick Prunet - INRA** — Je vais vous donner une information car nous sommes sollicités sur le dossier « bien être du poisson » ; cela peut surprendre mais il y a un dossier fort qui est actuellement en négociation à Strasbourg. Dans ce dossier il y a une rubrique très claire qui dit « toute manipulation biotechnologique des animaux ne peut être acceptable que sous réserve que vous avez prouvé que cela n'a pas d'effet négatif par rapport aux animaux ».

Quel que soit le contexte derrière, je ne peux qu'insister sur le fait qu'il faudrait, à l'avenir, que systématiquement on intègre des notions de bien être qui commencent à avoir une structure scientifique très forte. Robert Danzer à l'INRA, anime une réflexion scientifique solide sur la notion de bien-être.

Il faudrait, à mon sens, intégrer ces notions de bien être qui peuvent être des paramètres scientifiques tout à fait cohérents dans les approches biotechnologiques et ne pas croire qu'on peut gérer rapidement le dossier « bien-être ».

**Michel Thibier** — Personne ne le croit.

**Patrick Prunet** — Même si ce sujet est un peu en dehors du thème principal proposé aujourd'hui, il est important d'intégrer cette notion car les réglementations vont arriver, elles peuvent être draconiennes. Nous avons des exemples récents sur les élevages des poulets où, malheureusement, les éleveurs français seront déçus des décisions prises au niveau européen.

**M. Séralini - Université de Caen** — Vous nous avez parlé de 7 à 8 millions d'inséminations artificielles pour les bovins, en France, chaque année, entre autres. Qu'en est-il des diversités génétiques, autrement dit, de combien de taureaux sont issues ces 7 à 8 millions d'inséminations ? Combien de fois un taureau va-t-il servir ?

Monsieur Houdebine, vous nous avez dit qu'*a priori* on n'avait pas d'hypothèse pour des interférences métaboliques. C'est vrai au niveau global, mais nous avons l'habitude pour les plantes transgéniques de raisonner au cas par cas ou d'essayer d'observer la composition chimique globale la plus détaillée possible de la plante.

Qu'en est-il des interférences endocriniennes d'une surproduction d'hormones de croissance ou de facteur de croissance sur les animaux ?

Regarde-t-on la composition détaillée du lait, de la viande et le développement des tumeurs potentielles ?

**Patrice Humblot** — Il y a environ 800 à 1 000 taureaux qui sont les plus utilisés chaque année globalement sur l'ensemble du territoire français.

Il est vrai que dans certaines races il y a des orientations de la sélection qui sont très claires, définies par le marché. Pour la sélection laitière, on va voir les caractéristiques laitières qui seront privilégiées, cela signifie que pour certains autres caractères, que l'on considère de moins en moins comme des caractères secondaires d'ailleurs, on va effectuer une sélection orientée au détriment de ces caractères. C'est quelque chose qu'il faut reconnaître. Ce n'est pas le cas dans toutes les races.

Dans les races laitières, c'est clair, on sait très bien qu'en termes de fertilité des animaux, on en perd un certain pourcentage chaque année du fait d'une sélection génétique uniquement orientée vers la production laitière.

Maintenant, se pose le problème d'avoir des méthodes efficaces d'intervention pour, éventuellement, si cela intéresse les éleveurs et les producteurs, faire basculer la balance dans l'autre sens.

**Louis-Marie Houdebine** — Il n'y a pas vraiment de différences d'appréciation ou d'appui par rapport aux problèmes entre les plantes et les animaux. On va étudier, au cas par cas, tout ce qui peut l'être.

Le cas de l'hormone de croissance est tout à fait intéressant car les premiers porcs transgéniques obtenus remontent à 1985. Très naïvement, ceux qui l'avaient réalisé, avaient fait une expression du transgène immense en pensant que c'était seulement comme cela que l'on aurait une croissance.

Effectivement, ils ont eu une croissance, mais ils ont eu des effets secondaires épouvantables. Ces animaux n'ont jamais été mis sur le marché et n'ont pas du tout été développés. Ils étaient malades et inexploitable.

Les animaux d'aujourd'hui sont faits de façon plus subtile. On cherche à faire une expression du transgène très faible afin que le taux d'hormone de croissance qui circule, soit dans l'échelle de la physiologie. On double le

taux de l'hormone de croissance circulant ou à peu près. En effet, on ne voit plus d'effets secondaires chez les animaux indésirables, autant qu'on puisse les évaluer.

Quant à la qualité de l'aliment, certaines choses ont été effectuées sur les dépôts de lipide, la quantité de muscles qui se développe, la composition du muscle, des lipides, les dépôts d'un certain nombre de substances. Cela a-t-il été suffisamment pratiqué, je l'ignore.

En Australie, les porcs transgéniques sont prêts depuis plusieurs années, des poissons transgéniques le sont dans un certain nombre de pays. S'ils ne sont pas vendus, c'est en grande partie pour des raisons environnementales, mais s'ils n'ont pas été mis en vente, c'est probablement parce que les instances qui établissent les réglementations ont considéré que l'étude de ces animaux, en terme simplement alimentaire, était insuffisante.

Il ne suffit pas de regarder la composition globale. Les tests n'ont sans doute pas été effectués chez ces animaux. Dans ce cas, on sait à peu près que regarder. On sait examiner les effets d'une hormone de croissance en excès, mais on ne sait pas analyser tous les effets globaux secondaires, et on va tomber dans la deuxième catégorie d'évaluation métabolique générale, équivalence en substance, etc.

**Jean-Paul Renard** — On parle beaucoup du maïs et du soja transgénique. Une question qui pose problème est la présence dans ces plantes modifiées génétiquement d'auxiliaires de fabrication que sont les gènes de résistance aux antibiotiques ou autres gènes qui permettent d'aller repérer les plants modifiés génétiquement avant de les utiliser dans les champs.

Concernant l'animal, la stratégie retenue, au moins à l'INRA, est de dire : « de toute façon nous ne produirons que des animaux transgéniques qui n'auront pas ces auxiliaires de fabrication ».

Il est possible, selon certaines méthodes qui ont fait leurs preuves chez la souris, de retirer ces séquences d'ADN dans les cellules en culture avant d'utiliser les noyaux pour pouvoir refaire produire ces animaux.

**Paul Benkimoum - Le Monde** — A propos de la sécurité sanitaire et alimentaire des animaux nés par fécondation *in vitro*, vous évoquiez le fait que l'on pourrait s'assurer de cette sécurité par des études sur le lait et la viande. Est-ce à dire que ces études n'ont pas été menées ?

Finalement, il y a un élément qui est le bien-fondé scientifique et un autre qui est la perception qu'en a le public quand on s'aperçoit qu'on ne peut plus faire abstraction de cette perception, quand bien même elle serait scientifiquement discutable.

**Bernard Guérin - UNCEIA** — Je ne suis pas un spécialiste de ces questions d'alimentation. A ma connaissance, elles ne sont pas menées. Mais même si ces techniques ne sont utilisées que depuis le début des années 90, il y a déjà quelques dizaines de milliers de veaux ainsi produits dans le monde, sans aucun retour d'informations particulier.

**Joseph Domenech - CIRAD/EMVT** — Dans les pays du sud, nous avons un tel décalage technologique, économique et social que l'on pourrait se poser la question de l'utilisation de ces techniques. De fait, elles ne sont pas utilisées pour l'instant, il y a fort à parier que cela demandera un certain temps, mais cela étant, c'est un immense espoir pour tous les pays y compris ceux du sud.

Les enjeux sur la protection de ces techniques vont se poser immédiatement en termes de propriété du vivant. Quant aux environnements sociaux, économiques, technologiques et aux problèmes de transferts de technologies que posent ces techniques dans les pays du sud, on peut parier que de toute façon, tôt ou tard, cela viendra et ces pays plongeront dans ces technologies au fur et à mesure qu'elles seront vulgarisées. Cela s'adresse surtout aux techniques de première génération.



Deuxième session

---

## **Les aspects normatifs et réglementaires**

*Modérateur : Cécile Lahellec*

---



# Le Codex Alimentarius

Hubert FERRY-WILCZECK

Ministère de l'agriculture et de la pêche - Direction générale de l'alimentation - Sous-direction Recherche, innovation et réglementation, 251, rue de Vaugirard, 75732 Paris Cedex 15

## Résumé

Le codex alimentarius est un programme mixte de la FAO et de l'OMS chargé d'élaborer des normes internationales relatives aux denrées alimentaires dans le double objectif de protéger la santé des consommateurs et de promouvoir des pratiques loyales dans le commerce. Les travaux de la Commission du codex alimentarius, instance intergouvernementale regroupant 160 États membres, sont préparés par une trentaine de comités horizontaux (additifs et contaminants, hygiène, étiquetage...) ou verticaux (produits laitiers...). Depuis 1994, l'accord de l'organisation mondiale du commerce relatif aux mesures sanitaires et phytosanitaires confère aux normes établies par le codex alimentarius un rôle de référence en cas de différends commerciaux (cf. affaire « hormones »).

La Commission du codex alimentarius a adopté des définitions et principes en matière d'analyse des risques qui mettent en avant la séparation fonctionnelle nécessaire entre l'évaluation des risques (*processus à base scientifique comprenant les étapes suivantes : i) identification des dangers ; ii) caractérisation des dangers ; iii) évaluation de l'exposition et iv) caractérisation des risques*) et la gestion des risques (*processus... consistant à mettre en balance les différentes politiques possibles... et au besoin à choisir les mesures de prévention et de contrôle appropriées*) qui relève du codex alimentarius.

Dans les domaines des additifs, contaminants, médicaments vétérinaires et pesticides, les travaux du codex alimentarius s'appuient sur une évaluation des risques réalisée par des comités d'experts scientifiques (JECFA et JMPR) créés conjointement par la FAO et l'OMS. Lorsqu'il s'agit d'appréhender des thèmes plus nouveaux, la FAO et l'OMS ont l'habitude d'organiser des consultations d'experts (souvent conjointement avec un État pour des raisons de coût et d'organisation). Les résultats de ces consultations d'experts sont ensuite généralement utilisés par le secrétariat du codex alimentarius comme base pour initier de nouveaux travaux. Un sujet comme la sécurité sanitaire des aliments issus des biotechnologies de la reproduction animale devrait logiquement être appréhendé par l'organisation d'une consultation d'experts FAO/OMS.

Si les travaux du codex alimentarius s'appuient sur les principes de l'analyse du risque, la 2<sup>e</sup> déclaration de principe concernant le rôle de la science rappelle qu'« en élaborant des normes alimentaires et en prenant des décisions à leur sujet, le codex alimentarius doit tenir dûment compte, le cas échéant, d'autres facteurs légitimes ayant une importance pour la protection de la santé du consommateur et la promotion de pratiques loyales dans le commerce des denrées alimentaires ».

Le débat engagé au sein du comité des principes généraux sur la définition des autres facteurs légitimes (préoccupations des consommateurs, environnement, santé animale...) et la manière de les prendre en compte est loin d'être clos, compte tenu des divergences d'opinions, notamment entre l'Europe et les pays anglo-saxons et latino-américains. Pour autant les questions d'éthique ou de santé animale, si elles ne constituent pas le coeur des travaux du codex alimentarius, ne devraient pas être exclues des débats sur un sujet comme la sécurité des produits issus des biotechnologies de la reproduction animale.

## INTRODUCTION

Il est sans doute inutile de faire ici un grand historique du Codex et de tout ce qu'il fait. Il s'agit plutôt d'essayer de voir comment la question du risque lié aux biotechnologies de la reproduction pourrait être évoquée dans le cadre du Codex Alimentarius. Pour ce faire, je vous présenterai succinctement ce qu'est le Codex Alimentarius, son fonctionnement et comment il serait susceptible de traiter un problème comme celui qui nous réunit aujourd'hui.

## 1. LE CODEX ALIMENTARIUS EST LA PRINCIPALE ORGANISATION DE NORMALISATION INTERNATIONALE

La normalisation internationale est quelque chose d'un peu différent de la normalisation au sens de ce qui se fait à l'Association Française de Normalisation dont les normes sont, par définition, des outils volontaires qui peuvent être utilisés par les personnes qui le souhaitent.

La normalisation internationale, en fait, est plutôt une pré-réglementation négociée entre

États qui, après adoption, peut être utilisée comme base de réglementation par les différents États.

Le « Codex Alimentarius » c'est l'ensemble des normes, des directives et des guides de bonnes pratiques adoptés et en même temps le nom de l'organisation qui élabore ce code.

Il fonctionne avec une Commission qui réunit les 160 et quelques membres. Dans la pratique, à peu près la moitié des membres assiste aux travaux de la Commission du Codex. Par exemple, on n'a encore jamais vu les Îles Fidji dans les travaux du Codex Alimentarius, mais elles en sont officiellement membres.

Les travaux de cette Commission, qui se réunit tous les deux ans et qui prend les décisions, sont préparés par des comités plus techniques qui sont soit horizontaux, comme l'étiquetage, les additifs et contaminants, ou comme l'hygiène, ou verticaux parce qu'ils traitent de telle ou telle catégorie de produits : le chocolat, les produits laitiers, etc.

Le Codex Alimentarius est la principale organisation de normalisation internationale, mais aussi l'organisation internationale dont les normes ont valeur de référence dans le cadre des différends commerciaux qui sont arbitrés par l'Organisation Mondiale du Commerce.

Parmi les accords du GATT, deux ont trait aux réglementations : l'accord sur les mesures sanitaires et phytosanitaires (SPS) qui concerne les réglementations dont l'objet est sanitaire ou phytosanitaire, et l'accord sur les obstacles techniques au commerce (OTC) qui concernent les autres réglementations, notamment les questions d'information, de qualité, etc.

Ces deux accords imposent un certain nombre d'obligations aux pays membres, qui restreignent en quelque sorte leurs droits, de telle manière que leur réglementation soit justifiée, qu'il y ait une information préalable des autres membres sur la réglementation, qu'ils envisagent de prendre, avec possibilité, pour les autres, de faire des commentaires.

Il consacre la liberté d'adopter des réglementations mais elle est, en quelque sorte, encadrée.

L'accord sur les mesures sanitaires et phytosanitaires fait référence explicitement aux normes du Codex Alimentarius. Il indique, finalement, que le mieux pour faciliter le commerce, est d'utiliser la norme, lorsqu'il y en a une.

Si nous utilisons la norme, nous n'avons pas à nous justifier, notre réglementation répond aux obligations résultant des accords du GATT. Si nous décidons de prendre une réglementation différente de la norme, nous devons la jus-

tifier. Quand il s'agit des normes sanitaires ou phytosanitaires, cette justification se fait à partir d'une évaluation du risque et en fonction du niveau de protection que nous avons toujours le droit de choisir.

Nous devons démontrer que la norme ne permet pas d'atteindre nos objectifs, et que nous devons donc adopter une réglementation différente de la norme.

L'autre accord (OTC) ne fait pas explicitement mention au Codex Alimentarius. Comme il a un champ infiniment plus large puisqu'il couvre les télécommunications, les machines à laver etc., on n'allait pas citer toutes les organisations qui normalisent dans tous les domaines. Donc, on parle des organismes de normalisation sans les citer. Mais, implicitement, le Codex Alimentarius est l'organisme dans le domaine alimentaire qui fait également référence dans le cadre de cet accord.

Ces deux accords donnent, une valeur extrêmement forte aux normes du Codex Alimentarius qui, jusqu'à ce que ces accords soient adoptés, n'avaient que le mérite d'exister. On en faisait ce qu'on voulait alors que, maintenant, si on ne choisit pas la norme, il faut être capable d'expliquer pourquoi, avec des arguments scientifiques étayés. Voilà pourquoi le Codex est important.

## 2. LES PRINCIPES DE L'ANALYSE DES RISQUES ADOPTÉS PAR LE CODEX ALIMENTARIUS

Le Codex dans le domaine qui nous concerne aujourd'hui, c'est-à-dire sanitaire, a peu à peu décidé de travailler selon un certain nombre de principes. La Commission du Codex Alimentarius a adopté des définitions et principes en matière d'analyse des risques qui mettent en avant la séparation fonctionnelle nécessaire entre l'évaluation des risques (*processus à base scientifique comprenant les étapes suivantes : i) identification des dangers ; ii) caractérisation des dangers ; iii) évaluation de l'exposition et iv) caractérisation des risques*) et la gestion des risques (*processus... consistant à mettre en balance les différentes politiques possibles... et au besoin à choisir les mesures de prévention et de contrôle appropriées*) qui relève du codex alimentarius.

Dans la pratique, la frontière entre évaluation et gestion n'est pas aussi absolue que les définitions le laissent penser. En effet, les résultats de l'évaluation sont fonction des réglementations adoptées, de leur application et des résultats des plans de surveillance.

### **3. LE RECOURS AUX CONSULTATIONS D'EXPERTS FAO/OMS DANS LES DOMAINES NOUVEAUX**

Le Codex s'appuie sur un certain nombre de comités scientifiques (JECFA, JMPR). Quand un comité existe et travaille régulièrement sur un sujet, les choses fonctionnent assez bien. C'est le cas, par exemple, dans le domaine des résidus de médicaments vétérinaires, des résidus pesticides, des additifs, des contaminants.

Ces comités peuvent parfois traiter de sujets qui sont proches de leurs compétences centrales. Mais lorsqu'il s'agit d'appréhender des thèmes plus nouveaux, la FAO et l'OMS ont l'habitude d'organiser des consultations d'experts (souvent conjointement avec un État pour des raisons de coût et d'organisation). Les résultats de ces consultations d'experts, sont ensuite généralement utilisés par le secrétariat du codex alimentarius comme base pour initier de nouveaux travaux.

Un sujet comme la sécurité sanitaire des aliments issus des biotechnologies de la reproduction animale devrait logiquement être appréhendé par l'organisation d'une consultation d'experts FAO/OMS.

### **4. LA PRISE EN COMPTE ÉVENTUELLE D'AUTRES FACTEURS**

L'importance de l'aspect « évaluation du risque » est tout à fait déterminante. En même temps, au Codex Alimentarius, les décisions prises jusqu'à présent, n'ont pas été purement scientifiques. D'ailleurs, si les travaux du codex alimentarius s'appuient sur les principes de l'analyse du risque, la 2<sup>e</sup> déclaration de principe concernant le rôle de la science rappelle qu'« *en élaborant des normes alimentaires et en prenant des décisions à leur sujet, le codex alimentarius doit tenir dûment compte, le cas échéant, d'autres facteurs légitimes ayant une importance pour la protection de la santé du consommateur et la promotion de pratiques loyales dans le commerce des denrées alimentaires* ».

Au sein du Codex Alimentarius, nous avons des discussions plus que houleuses, très conflictuelles avec d'autres pays qui estiment qu'il ne faut surtout pas mélanger les genres et qu'une réglementation alimentaire doit uniquement veiller à la sécurité et qu'à partir du moment où un « machin » n'est pas dangereux, il faut qu'il soit autorisé et qu'on ne peut pas s'opposer, par exemple, aux hormones si on n'a pas de raisons scientifiques pour le faire.

Le fait que les consommateurs n'en veulent pas, que cela ne soit pas une bonne chose en termes de surproduction ou, pour des raisons éthiques, certains États estiment que ce n'est pas le problème du Codex. Si un État n'en veut pas, il n'a qu'à prendre ses responsabilités, et, sous les contraintes précédemment décrites, des accords sur les mesures sanitaires et phytosanitaires et sur les obstacles techniques, adopter la réglementation qu'il souhaite.

Le débat engagé au sein du comité des principes généraux sur la définition des autres facteurs légitimes (préoccupations des consommateurs, environnement, santé animale...) et la manière de les prendre en compte est loin d'être clos, compte tenu des divergences d'opinions, notamment entre l'Europe et les pays anglo-saxons et latino-américains. Pour autant les questions d'éthique ou de santé animale, si elles ne constituent pas le cœur des travaux du codex alimentarius, ne devraient pas être exclues des débats sur un sujet comme la sécurité des produits issus des biotechnologies de la reproduction animale.

Il y a des évolutions sensibles ces temps derniers. Par exemple, sur le sujet des OGM, on constate que certains pays anglo-saxons vont passer à l'étiquetage. L'évolution de leur raisonnement est très nettement liée à la prise en compte des attentes des consommateurs. Donc, même ceux qui disent qu'il ne faut pas, ou très peu, prendre en compte d'autres facteurs au sein du Codex Alimentarius, sont amenés de fait à prendre en compte de tels éléments dans leurs décisions nationales.



# La réglementation européenne et française

Stéphane DEVILLERS

UNCEIA, 149, rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12

## Résumé

Les biotechnologies de la reproduction des premières générations (insémination, transplantation embryonnaire et fécondation *in vitro*) font l'objet d'une très abondante réglementation dictée par des considérations légitimes de protection de la santé animale, compte tenu de leur intérêt évident pour améliorer le niveau sanitaire du cheptel et des risques de transmission de maladies.

La préoccupation tenant aux risques alimentaires liés à la consommation de produits (lait et viande) issus de ces biotechnologies, pour certaines très courantes et simples, est absente du spectre réglementaire. Les animaux issus de ces techniques ou leurs sous-produits sont introduits dans la chaîne alimentaire depuis 50 ans pour l'insémination (massivement utilisée pour les bovins et 10 ans pour les porcins), 20 ans pour la transplantation embryonnaire et ces dernières années pour les animaux issus de FIV, technique plus récente.

Le principe non normatif d'équivalence du produit pour la consommation humaine, avéré par l'expérience des faits, explique cette situation. Le mode de procréation de l'animal (saillie, insémination, transfert embryonnaire ou FIV) n'induit pas de différence quant à la qualité du produit, ces techniques n'affectant, ni le patrimoine génétique du produit procréé, ni son intégrité génique.

En revanche, l'accélération du génie génétique avec l'apparition de la transgénése et du transfert nucléaire (clonage des animaux), notamment à des fins de recherche pour procréer des machines à produire des substances à vocation pharmaceutique ou médicale, ouvre un débat de société pour le moins passionnel qui pose également avec l'évolution rapide et constante des techniques, le problème de l'adéquation du droit et notamment de la réglementation des OGM.

En matière de police sanitaire, la réglementation de la production d'embryon s'arrête au transfert de noyaux laissant le clonage sans contraintes réglementaires d'ordre sanitaire. Pour les OGM, que sont les animaux en particulier transgéniques, la loi du 13 juillet 1992 impose une autorisation légale administrative préalable, après examen des risques pour la santé publique ou pour l'environnement.

Quant aux clones d'animaux non transgéniques, la mise en marché est libre, puisque ce ne sont pas des OGM, leur patrimoine génétique nucléaire n'étant pas modifié.

A ce jour, la France n'a pris aucune disposition pour prohiber l'entrée dans la chaîne alimentaire des produits nés de transfert nucléaire (clone). En revanche, l'INRA s'est volontairement astreint à détruire tous les animaux issus du clonage embryonnaire et somatique, les animaux transgéniques, ainsi que les animaux expérimentaux ayant consommé des OGM végétaux.

La France a demandé en juin dernier au niveau européen la suspension des nouveaux OGM, sur fond de l'onde de choc des farines animales et de la dioxine.

## 1. INTRODUCTION

Le présent exposé s'attache à dresser l'état des lieux de la réglementation concernant les biotechnologies de la reproduction des animaux domestiques. Elles couvrent l'insémination jusqu'au clonage et la transgénése et sont présentées dans leur ordre d'apparition.

Compte tenu du thème du colloque de l'AFSSA, seuls les aspects relevant de la santé animale, voire de la santé humaine, sont pris en compte, à l'exclusion de ceux ayant trait à l'amélioration génétique, à la protection des animaux, et aux problèmes de responsabilité civile ou pénale de la mise en marché de matériel génétique.

Les sources de droit, communautaire ou interne, sont présentées, un fois n'est pas coutume en droit, dans un ordre temporel d'apparition, le droit communautaire ayant souvent suivi le droit interne français en cette matière, exception faite des OGM.

## 2. DE L'INSÉMINATION À LA FÉCONDATION *IN VITRO* (FIV)

Les biotechnologies de la reproduction (insémination, transplantation embryonnaire et fécondation *in vitro*) font l'objet d'une très abondante réglementation communautaire et française,

dictée par des considérations légitimes de protection de la santé animale.

La préoccupation tenant aux risques alimentaires liés à la consommation de produits (lait et viande) issus de ces biotechnologies, pour certaines très courantes et traditionnelles, est absente du spectre réglementaire, sans doute du fait que de tels risques ne sont pas avérés à l'épreuve des faits.

En effet, les animaux issus de ces techniques ou leurs sous-produits sont introduits dans la chaîne alimentaire depuis 50 ans pour l'insémination (massivement utilisée pour les bovins et 10 ans pour les porcins), 20 ans pour la transplantation embryonnaire et ces dernières années pour les animaux issus de FIV, technique plus récente.

C'est en quelque sorte l'application du principe de fait d'équivalence du produit fondé sur l'antériorité de leur consommation, bio-révéléateur indiscutable de leur sécurité alimentaire.

## 2.1. L'insémination : une technique ancienne et courante

### 2.1.1. Droit interne

- Une activité réglementée dès son origine en France

A peine apparue en France dès 1946 pour l'espèce bovine, cette technique a été immédiatement réglementée par la loi du 15 mai 1946 « sur l'usage de l'insémination artificielle » dans une logique de reproduction : procréer un animal.

Ces principes directeurs (centre agréé, licence de chef de centre, licence d'inséminateur et reproducteurs aux normes sanitaires) sont codifiés aux articles 308 (interdiction de l'usage de semences en dehors de son propre élevage sans licence) ou 339 du code rural (infraction réprimée par une peine d'amende délictuelle).

Ils sont, en théorie juridique, toujours applicables à l'insémination des animaux domestiques, autres que ceux couverts ultérieurement par la loi sur l'élevage. En pratique, ils sont tombés dans une parfaite désuétude. Par conséquent, des espèces d'animaux de boucherie (exemples du lapin ou de la volaille) peuvent recourir à l'IA sans contraintes réglementaires sanitaires. La simple ignorance de l'existence de ce dispositif légal est peut-être la cause de cette désuétude.

Depuis 1966, l'insémination des espèces bovine, porcine, ovine et caprine <sup>1</sup> est gouvernée par la

loi du 28 décembre 1966 sur l'élevage <sup>2</sup>, dont l'objectif clairement affiché est « l'amélioration de la qualité et des conditions d'exploitation du cheptel bovin, porcine, ovine et caprine ». Cette loi s'inscrit dans une logique d'amélioration génétique, tout en sauvegardant des préoccupations de police sanitaire. Force est de constater qu'elle fut inspirée du modèle bovin, première espèce en France à recourir massivement à cette technique simple et au procédé naturel.

Cette législation ne concerne pas l'insémination au sein d'un même troupeau (reproduction intra-troupeau), opération non réglementée qualifiée de monte privée artificielle <sup>3</sup>, l'éleveur assumant les risques sanitaires de ses propres choix de reproduction.

- Une réglementation protectrice de la santé animale

La législation actuelle a pour objectif notamment la sauvegarde de la protection de la santé animale, la semence étant un produit vivant dont l'utilisation risque, faute de contrôles sérieux, de transmettre des maladies ou des tares génétiques, et ainsi de compromettre la santé animale, voire le patrimoine génétique.

Pour comprendre l'ampleur et la rigueur des garanties sanitaires exigées des centres agréés, il importe d'intégrer le pouvoir de diffusion des reproducteurs, pour certaines espèces sans commune mesure avec la monte naturelle. L'exemple des taureaux, susceptibles d'engendrer un grand nombre de descendants, est très démonstratif à cet égard.

Un reproducteur, largement livré à l'insémination, peut donc avoir un impact améliorateur ou détériorateur dans un ensemble d'élevages. Un seul individu fait donc peser un risque sur la collectivité des éleveurs. N'oublions pas que l'IA a été et demeure un puissant levier d'élimination des maladies vénériennes ou sexuellement transmissibles.

- Des garanties sanitaires rigoureuses

Pour écarter les risques de propagation des maladies des animaux, par la voie de l'insémination, la loi sur l'élevage et ses nombreux textes d'application fixent des garanties sanitaires draconiennes pour assurer le légitime et impérieux objectif de protection de la santé animale, sans oublier l'objectif de traçabilité des semences.

Il serait fastidieux et rébarbatif d'énumérer la kyrielle de garanties sanitaires, mais on peut citer les principales d'entre elles :

1. Les espèces équine et canine se sont raccrochées ensuite à la loi sur l'élevage par deux décrets respectivement en 1976 et 1987.

2. Elle est codifiée aux articles L 653.1 à L 653.17 et L 671.9, L 671.10 et 11 du code rural.

3. Décret n° 257 du 22.03.1969 sur la monte publique.

- un agrément sanitaire des centres d'insémination (centre de collecte), condition essentielle à la libre circulation des semences (aucune dose ne peut être produite hors d'un centre agréé) ;
- une qualification sanitaire et des contrôles réguliers du reproducteur donneur ;
- une surveillance permanente par un vétérinaire du centre et un contrôle des services officiels vétérinaires et du laboratoire national de contrôle des reproducteurs ;
- un stockage de la semence, quelle que soit son origine, dans un centre agréé.

Cette dernière contrainte a été reconnue compatible avec le droit communautaire par la Cour de justice des Communautés européennes dans deux arrêts concernant les CIA français <sup>4</sup>.

### 2.1.2. En droit communautaire

L'harmonisation des conditions de police sanitaire régissant les échanges et importations <sup>5</sup> de semence fut tardive, puisque la première directive date de 1988 <sup>6</sup> et concerne l'espèce bovine. Elle est applicable dans les États membres depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1990 <sup>7</sup>.

Son quatrième considérant témoigne du souci de santé animale. Il souligne que « ... l'état membre dans lequel le sperme est recueilli doit être tenu de garantir que le sperme soit recueilli et traité dans des centres agréés et contrôlés, qu'il provienne d'animaux dont l'état sanitaire est de nature à écarter les risques de propagations des maladies des animaux... ».

Il n'est pas indifférent de noter que le dispositif communautaire d'harmonisation s'est très largement calé sur le système français. Cependant, la France s'impose encore des normes sanitaires plus strictes que la norme minimale communautaire.

Viendront ensuite les textes d'harmonisation pour la semence porcine en 1990 <sup>8</sup> et pour les semences des autres espèces en 1992 (directive balai <sup>9</sup>).

En revanche, l'acte d'insémination relève de la subsidiarité, chaque état membre étant libre de légiférer comme bon lui semble en ce domaine.

## 2.2. La transplantation embryonnaire (*in vivo* et *in vitro*)

### 2.2.1. En droit français

Technique de reproduction plus tardive (années 1970), la transplantation des embryons produits *in vivo* a fait également l'objet d'une réglementation de police sanitaire très stricte. Le premier arrêté date de 1986 pour l'embryon bovin.

Aujourd'hui, cette réglementation s'articule autour de quatre arrêtés ministériels par espèces <sup>10</sup> : bovine (arrêté du 13.07.1994 ayant abrogé celui initial du 8.09.1986), ovine et caprine (arrêté du 31.03.1994) et équine (arrêté du 11.03.1996). Il n'y a pas de texte de droit interne pour l'espèce porcine.

Pour l'espèce bovine <sup>11</sup>, il est distingué la fécondation :

- *in vivo* : la collecte, le traitement et le stockage des embryons frais et congelés ;
- *in vitro* : la collecte d'ovocytes, le prélèvement, la maturation et la fécondation, le traitement et le stockage des embryons.

La notion de « traitement » couvre les opérations réalisées au cours de la « phase *in vitro* » : examen microscopique, lavages, conditionnement, y compris toute manipulation qui implique la pénétration de la zone pellucide de l'embryon (sexage, bissection).

Ces opérations doivent être effectuées pour la fécondation *in vivo* par une équipe agréée de transplantation embryonnaire et pour la fécondation *in vitro* par une équipe agréée de production d'embryons, chaque équipe étant placée sous la responsabilité d'un vétérinaire (agrément relevant du ministre chargé de l'agriculture).

La réglementation nationale prévoit des garanties sanitaires tenant à la qualification des agents de l'équipe, aux équipements (laboratoire), à la qualification sanitaire de la donneuse, au stockage des embryons réservés aux équipes agréées et aux centres agréés.

Elle exclut de son champ d'application les embryons résultant d'un transfert de noyaux <sup>12</sup>.

4. Arrêt du 5 octobre 1994 (affaire 93/323 CEIAM c/ La Crespelle) et arrêt du 7 décembre 1995 (affaire C17/94 CPAEIA c/ vétérinaires).

5. Les textes communautaires d'harmonisation ne s'appliquent pas à la mise en marché interne à un pays membre qui relève de la subsidiarité.

6. Directive n° 88/407 du 14 juin 1988 (JOCE n° L 194 du 22.07.1988)

7. En revanche, la première directive semence au plan zootechnique date de 1977.

8. Directive n° 90/429 du 26 juin 1990 modifiée (JOCE n° L 224 du 18.08.1990)

9. Directive n° 92/65 du 13.7.1992 (JOCE n° L 268 du 14.09.1992).

10. La loi sur l'élevage ne couvre pas la transplantation embryonnaire.

11. Pour les ovins et caprins, la réglementation en reste à la fécondation *in vivo*.

12. Article 1<sup>er</sup> d) de l'arrêté du 13 juillet 1994.

En outre, elle ne s'applique pas, à l'instar de l'insémination, aux opérations relevant d'un même troupeau (reproduction intra-troupeau) qualifiées de monte privée artificielle<sup>13</sup>.

### 2.2.2. En droit communautaire

Comme la semence et pour la même considération sanitaire, la mise en marché dans l'UE d'embryons frais ou congelé de l'espèce bovine est harmonisée par une directive opérationnelle depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1991<sup>14</sup>.

Une fois de plus, elle s'est inspirée du dispositif français. Cette directive ne concerne pas l'embryon résultant d'un transfert de noyaux<sup>15</sup>. Naturellement, les arrêtés français précités ont retranscrit en droit interne la norme communautaire.

La directive balai, citée au paragraphe 1.1.2., couvre quant à elle les ovules et embryons des autres espèces.

## 3. LES ANIMAUX CLONES OU TRANSGÉNIQUES

Pour les animaux domestiques, il n'y a pas de textes de police sanitaire, dans la mesure où les technologies du clonage et de transgénèse demeurent au stade de la recherche expérimentale. Il convient donc de se référer à la législation sur les OGM qui instaure des restrictions et contraintes quant à la recherche et la mise en marché d'OGM pour des motifs de protection de la santé humaine et de l'environnement.

### 3.1. Champ d'application de la réglementation des organismes génétiquement modifiés (OGM)<sup>16</sup>

#### 3.1.1. OGM et animaux

La directive 90/220 du 23 avril 1990 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement (OGM), transcrite tardivement en droit interne par la loi n° 92.654 du 13 juillet 1992<sup>17</sup>, harmo-

nise les législations concernant tous les OGM dans le but de « protéger la santé humaine et l'environnement ». Bien sûr, le droit communautaire s'est structuré autour du modèle végétal où la mise en marché d'OGM est courante dans certains pays.

La première question qui se pose pour le règne animal est de savoir si les animaux et leur matériel génétique peuvent être considérés comme des OGM.

Une réponse affirmative s'impose. En effet, un OGM est défini comme : « un organisme dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle »<sup>18</sup>, et « l'organisme » comme « toute entité biologique capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique ».

La loi du 13 juillet 1992 se veut plus précise pour appréhender la notion d'organisme, puisqu'elle retient en son article 1<sup>er</sup> § a) la définition suivante « toute entité biologique non cellulaire, cellulaire ou multicellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique ; cette définition englobe les micro-organismes, y compris les virus ».

A la lecture de ces définitions, il ne fait donc pas de doute que les animaux, la semence, les ovules et les embryons peuvent être des OGM, si leur patrimoine génétique est modifié, ce que confirme surabondamment le décret n° 95.487 du 28 avril 1995 sur les « organismes animaux génétiquement modifiés ».

#### 3.1.2. Techniques concernées par la réglementation OGM

La deuxième question est de savoir quelles techniques génèrent par son utilisation une modification génétique permettant d'obtenir des OGM. Il s'agit notamment des techniques suivantes<sup>19</sup> :

- la recombinaison de l'ADN à systèmes vectoriels visés par le droit communautaire ;
- l'incorporation directe dans l'organisme de matériaux héréditaires préparés à l'extérieur de l'organisme, y compris la micro-injection, la macro-injection et le micro-encapsulage ;
- les techniques de fusion cellulaire, y compris la fusion de protoplastes, ou hybridation, dans lesquelles des cellules vivantes présentant de nouvelles combinaisons de matériaux génétiques et héréditaires sont constituées par fusion de deux cellules ou davantage, au moyen de méthodes ne survenant pas naturellement.

13. Décret n° 257 du 22.03.1969 sur la monte publique.

14. Directive n°89/566 du 25.09.1989 (JOCE n° L 302 du 19.10.1989). Les conditions de police sanitaires régissant les échanges intracommunautaires et les importations des ovules et embryons des espèces non couvertes par un texte communautaire d'harmonisation, sont fixées par la directive 92/65 du 13.7.1992 dite « balai ».

15. Article 1<sup>er</sup> de la directive.

16. Annexe 1 A de la directive 90/220 du 23.04.1990 et décret n° 93.774 du 27.03.1993

17. Le délai de transcription prenait fin le 23.10.1991.

18. Article 2 - 2) de la directive.

19. Annexe 1 A de la directive, et article 1<sup>er</sup> du décret n° 93.774 du 27.03.1993.

### 3.1.3. Les techniques exclues<sup>20</sup>

En revanche, certaines techniques permettant d'obtenir des OGM sont exclues du champ de la réglementation. Il s'agit de celles « *qui ne sont pas considérées, de part leur caractère naturel, comme entraînant une modification génétique ou par celles qui ont fait l'objet d'une utilisation traditionnelle sans inconvénient avéré pour la santé publique ou l'environnement* »<sup>21</sup>. Elles concernent<sup>22</sup> :

- à la condition d'une absence de recourir aux techniques de recombinaison d'ADN ou à l'emploi d'OGM :
  - la fécondation *in vitro* ;
  - la conjugaison, la transduction, l'infection virale, la transformation, ou tout autre processus naturel ;
  - l'induction polyploïde.
- à la condition de l'absence d'OGM comme organismes récepteurs ou parentaux :
  - la mutagenèse ;
  - la formation et l'utilisation d'hybridomes d'animaux somatiques ;
  - la fusion cellulaire de végétaux ;
  - l'autoclonage de micro-organismes non pathogènes survenant de façon naturelle répondant au groupe I des OGM ;
  - l'infection de cellules vivantes par des virus, viroïdes ou prions.

### 3.1.4. La situation des clones

Si la technique de transgénèse (les produits transgéniques sont des OGM) ne pose pas de problème, il se pose une autre question simple, mais difficile pour le profane : les animaux issus de clonage embryonnaire ou somatique sont-ils des OGM, soumis à toutes les contraintes légales tenant notamment à la recherche et la mise en marché des OGM ?

Pour un juriste, l'ésotérisme de cette terminologie scientifique réglementaire rend l'exercice hasardeux. On peut cependant avancer l'analyse suivante faisant primer le bon sens.

En premier lieu, le vocable clonage n'est utilisé, ni dans la directive, ni même dans la loi et le décret du 27 mars 1993.

En deuxième lieu, le clonage est cependant une technique relevant de la fusion cellulaire, technique permettant d'obtenir des OGM.

20. Annexe 1 A et B de la directive, article 2 de la loi n° 92.654 du 13.07.1992 et article 2 du décret n° 93.774 du 27.03.1993.

21. Article 2 de la loi du 13.07.1992.

22. Article 2 du décret n° 93.774 du 27.03.1993.

En troisième lieu, la question essentielle est de déterminer si le matériel génétique du clone a été modifié.

L'article 2 de la directive 90/220 définissant l'OGM comme « *un organisme dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle* ».

Ce texte ne fait pas référence à la notion plus claire de matériel génétique nucléaire (noyau), pour la simple raison que la notion « *d'organisme* » en droit communautaire vise « *toute entité biologique* ».

Considérant que le matériel génétique nucléaire du clone animal n'est pas modifié, on peut raisonnablement conclure qu'il n'est pas un OGM *stricto sensu*, sauf si cette technique sert à la multiplication des OGM. De surcroît, les mitochondries de l'ovocyte se recombinent naturellement entre elles, sans modification de leur constitution génétique, ni de celle du noyau. Il s'agit d'une simple multiplication du même produit (sorte de photocopie), sans nouvelles combinaisons de matériaux génétiques héréditaires.

En raisonnant par l'absurde, admettre le contraire reviendrait à qualifier d'OGM la quasi totalité des produits issus des biotechnologies, ce qui viderait de sens la réglementation même des OGM.

### 3.1.5. La mise en marché des OGM

La mise en marché d'OGM est donc possible, sous réserve du respect de la réglementation OGM qui exige notamment une autorisation légale administrative préalable, après examen des risques pour la santé publique ou pour l'environnement. Tout manquement constitue un délit réprimé par une peine de prison (un an) et/ou une peine d'amende (500 000 F).

## 4. CONCLUSIONS

Les biotechnologies de la reproduction sont réglementées uniquement sous l'angle de la santé animale, sous réserve des OGM intégrant des préoccupations de santé publique et d'environnement. La sécurité alimentaire des produits issus de l'insémination et de la transplantation d'embryons est avérée par l'épreuve des faits de leur consommation depuis plusieurs années, cette consommation constituant un puissant bio-révéléateur.

Pour les produits nés de transfert nucléaire non transgéniques (clone), la France n'a pris aucune disposition pour prohiber ou restreindre

l'entrée dans la chaîne alimentaire, à la condition qu'ils ne soient pas considérés comme des OGM. Il y a même un vide juridique sur les normes sanitaires de production au regard de la santé animale.

Cependant, le problème ne se pose pas avec la même acuité que pour les végétaux, dans la mesure où il ne semble pas y avoir aujourd'hui de clones ou de produits animaux transgéniques livrés à la consommation humaine.

En revanche, l'INRA s'est volontairement astreint dans le cadre de ses travaux de recherches à détruire par incinération les animaux issus du clonage embryonnaire et somatique, ou ayant consommé des OGM végétaux, ainsi que les animaux transgéniques.

Les débats actuels de société sur les OGM laissent cependant planer une interdiction de la mise en marché des animaux transgéniques à des fins agricoles. La France a pris position en juin dernier pour une suspension de la mise en vente de nouveaux OGM, le temps de s'assurer de leur innocuité pour la santé humaine et l'environnement, en pleine onde de choc des farines animales et de la dioxine.

Il faut cependant garder raison et mesure pour le clonage et la transgénèse dans les productions animales. Ces techniques récentes sont pour l'heure circonscrites au stade de la recherche pour procréer des machines à produire des substances à vocation pharmaceutique ou médicale.

# Considérations d'ordre réglementaire concernant l'évaluation sanitaire des animaux transgéniques et l'évaluation de l'innocuité et de la qualité des aliments : la position du Canada

Primal S. SILVA <sup>1</sup> et Barbara BUCHANAN <sup>2</sup>

(1) Agence canadienne d'inspection des aliments - Division de la santé des animaux et de l'élevage

(2) Direction générale de la Santé - Bureau de la biotechnologie alimentaire - Bureau des dangers microbiens, Canada.

## Résumé

Les récentes percées de la technologie de recombinaison de l'ADN ont abouti à la production d'animaux transgéniques possédant des génomes modifiés. Bien que cette technologie ait de nombreuses applications possibles, le présent exposé portera surtout sur les animaux transgéniques produits à des fins agricoles (p. ex. animaux qui produisent du lait, de la viande ou des œufs améliorés, ceux qui donnent des produits possédant des attributs différents ou ceux qui résistent mieux aux maladies) et destinés à être largement distribués en milieu agricole.

Pour réglementer les animaux transgéniques destinés à l'alimentation, il faut tenir compte de deux volets importants, soit : (i) l'évaluation de l'état sanitaire de l'animal en vue de son lâcher dans un environnement agricole ; (ii) l'évaluation de l'innocuité et de la qualité avant l'introduction dans la chaîne alimentaire. On reconnaît que certaines des considérations réglementaires (santé animale par ex.) sont les mêmes pour tous les animaux, que ceux-ci soient obtenus par des méthodes classiques (dont l'insémination artificielle et la transplantation d'embryons) ou par transgénèse.

Pour répondre aux principales questions d'ordre réglementaire visant les animaux transgéniques, en novembre 1998, le gouvernement canadien lançait des consultations publiques avec un grand éventail d'intéressés, dont les scientifiques, la profession, les responsables de la réglementation, les consommateurs et le grand public.

Ces consultations ont permis de dégager le consensus suivant : avant d'introduire des animaux transgéniques en agriculture, le gouvernement fédéral doit procéder à une évaluation exhaustive des risques en se penchant sur de nombreux aspects, dont la santé des animaux et le potentiel zoonotique, la sensibilité aux maladies et la capacité de survivre dans un environnement agricole, les altérations possibles des besoins nutritionnels et métaboliques, l'expression retardée de phénomènes physiologiques, immunologiques ou reproductifs indésirables, ainsi que l'impact sur les populations animales domestiques et sauvages. De plus, l'élaboration de stratégies de gestion des risques visant des applications précises est jugée importante dans ce contexte.

Au Canada, Santé Canada veille à l'évaluation de l'innocuité des aliments issus d'animaux transgéniques. Comme les techniques du génie génétique animal peuvent éventuellement modifier les aliments provenant de ces animaux, il faut évaluer les produits alimentaires finaux et les constituants alimentaires nouveaux pour éviter les effets imprévus et/ou des produits secondaires potentiellement toxiques.

Le Canada propose que l'on utilise le concept d'« équivalence substantielle » pour l'évaluation de l'innocuité des animaux génétiquement modifiés utilisés pour la production d'aliments. La détermination de l'équivalence substantielle exige une comparaison exhaustive entre la nouvelle source alimentaire génétiquement modifiée (c.-à-d. l'animal) ou le produit alimentaire (c à d. le lait, les œufs, la viande) et l'équivalent non modifié.

Chaque évaluation de l'innocuité de l'aliment transgénique porte sur les organismes receveur et donneur et sur le processus utilisé pour le mettre au point, compare ses caractéristiques à celles de l'animal traditionnel et évalue sa valeur nutritive, la présence possible de substances toxiques ou non nutritives, ainsi que l'allergénicité de toutes les protéines introduites dans l'aliment. L'évaluation couvrira également les effets intentionnels et non intentionnels qui peuvent résulter de la modification génétique. Il faut préciser que le gouvernement fédéral peaufine encore les considérations susmentionnées pour la réglementation des animaux transgéniques utilisés comme sources d'aliments et que ces considérations seront modifiées au besoin au gré des nouvelles connaissances. De plus, le gouvernement canadien tente actuellement de préciser les autorisations légales concernant ces questions en modifiant les lois en vigueur et en élaborant des règlements et des lignes directrices. Jusqu'ici, aucun animal transgénique n'a été évalué pour son utilisation en alimentation humaine.

## INTRODUCTION

Les Canadiens ont joui d'un approvisionnement d'aliments salubres et nutritifs, qui est le fruit d'une longue expérience. Ces dernières années, après des évaluations détaillées de la salubrité et de la qualité, le Canada a autorisé l'introduction de sources d'aliments issues de plantes génétiquement modifiées telles que le maïs, le canola et le soja, appelées à faire partie de la chaîne alimentaire canadienne. La salubrité est une question très complexe à examiner sous divers angles. Par exemple, on doit évaluer la salubrité des aliments non seulement par rapport à la composition nutritionnelle de l'aliment et de son potentiel toxicologique, mais aussi en prenant en considération l'animal, le végétal ou le micro-organisme dont il dérive.

Les aliments constituent des mélanges complexes, et il faut examiner l'interaction de leurs constituants. Il faut aussi tenir compte des répercussions de l'aliment (ou l'organisme parent) sur l'environnement. Ces considérations sont valables, que l'aliment soit issu de l'amélioration génétique traditionnelle ou de la biotechnologie. L'analyse du risque, qui englobe l'évaluation du risque, la gestion du risque et la communication du risque, est la principale méthode utilisée par les organismes canadiens de réglementation pour évaluer les nouveaux produits prêts à entrer dans la chaîne alimentaire.

Traditionnellement, les modifications génétiques des animaux de ferme résultaient de la sélection pour le caractère recherché, opérée sur des douzaines de générations. Les avancées récentes de la biologie moléculaire et cellulaire ont permis des modifications génétiques plus considérables, par l'insertion de transgènes, technique qui va plus loin que celle de l'amélioration génétique classique telles que l'insémination artificielle et le transfert d'embryons, lesquelles ont abouti aux animaux de ferme d'aujourd'hui. L'élaboration de techniques telles que la micro-injection de pronucléus, le transfert de gènes au moyen de rétrovirus dans les cellules souches d'embryons, il y a plusieurs années et, dernièrement, la technique du transfert de noyaux, tout cela a donné naissance à des ovins, des caprins, des bovins, des porcins et à de la volaille aux génomes modifiés.

Dans la présente communication, nous entendons par *animal transgénique* un animal dont le génome a été modifié par suite d'une manipulation délibérée, utilisant la technique de l'ADN recombinant, technique qui permet le transfert de gène(s) entre espèces (d'où le qualificatif *transgénique*) ainsi que le réarrangement de ce(s) gène(s) chez l'espèce. Le principal objet

de la présente communication est de discuter de considérations réglementaires concernant les animaux transgéniques ainsi que la viande, le lait ou les œufs dérivés et destinés à entrer dans la chaîne alimentaire.

Même si on peut trouver de nombreuses applications à la technologie des animaux transgéniques (production de molécules pharmaceutiques, xénotransplantation et modèles de recherche), l'objet de la présente note, comme nous l'avons déjà mentionné, est d'insister sur les animaux transgéniques de ferme (c'est-à-dire dotés de meilleurs attributs de production de lait, de viande ou d'œufs, donnant des produits aux qualités modifiées ou animaux résistant mieux aux maladies, et destinés à la dissémination dans le milieu agricole).

Deux grands domaines doivent être pris en considération dans la réglementation des animaux transgéniques destinés à la production d'aliments : (i) l'évaluation de la santé des animaux, destinés à être disséminés dans le milieu agricole ; (ii) l'évaluation de la qualité et de la salubrité des aliments, avant leur entrée dans la chaîne alimentaire humaine. On devrait reconnaître que certaines considérations réglementaires discutées dans ce contexte sont les mêmes, que les animaux soient issus de méthodes classiques d'amélioration génétique, y compris l'insémination artificielle et le transfert d'embryons, ou qu'ils soient issus de la transgénèse.

## ÉVALUATION DU RISQUE

L'identification et la caractérisation des risques de transmission de maladie aux animaux et à l'être humain et, des risques pour les aliments dérivés d'animaux transgéniques ainsi que l'estimation de leur probabilité et de l'ampleur de leurs conséquences sont des éléments déterminants de l'évaluation du risque. Les lignes qui suivent sont consacrées à la discussion des principaux facteurs à prendre en considération dans l'évaluation du risque pour la santé des animaux transgéniques et pour la salubrité des aliments.

Il faut reconnaître que les autorités fédérales continuent à travailler aux considérations exposées ci-dessous pour la réglementation des animaux transgéniques créés pour la production de nourriture. Au besoin, on modifiera ces considérations à mesure qu'on accédera à des données nouvelles. En outre, il faudrait noter que l'on cherche à se doter des pouvoirs juridiques précis qui permettront de s'attaquer aux questions soulevées par les animaux transgéniques, grâce à la modification des lois en

vigueur et à l'élaboration de règlement et de lignes directrices.

## Évaluation de la santé des animaux

### Considérations sur la santé des animaux

L'avènement des espèces transgéniques a compliqué l'évaluation de la santé des animaux et du risque de zoonose. En effet, les animaux transgéniques pourraient ajouter une dimension nouvelle, jusqu'ici négligée, à l'évaluation du risque lié aux espèces animales. Les risques dont on devrait tenir compte dans ce contexte sont notamment : la perturbation des mécanismes immunitaires normaux par l'insertion de certains gènes ; la traversée des barrières entre les espèces par des pathogènes et l'activation de virus latents ; le transfert éventuel d'agents infectieux adventices au cours des manipulations génétiques *in vitro* ; la possibilité que les animaux transgéniques agissent comme source de maladies inédites ou d'agents pathogènes, plus virulents. Peuvent aussi faire problème, dans l'emploi de cette technologie, l'insensibilité des techniques de détection des agents pathogènes nouveaux, inattendus.

La possibilité de réactiver des virus latents tels que les rétrovirus trouvés dans tous les génomes animaux et la difficulté de dépister ces virus réactivés chez les animaux transgéniques est un domaine à prendre en considération, compte tenu plus particulièrement de l'observation selon laquelle l'ADN proviral de certains rétrovirus endogènes des porcins a été réactivé lors de son introduction dans les cultures de cellules humaines. La mise au point de méthodes visant à vérifier cette activation virale poserait un grand défi, vu la présence probable d'un nombre élevé de rétrovirus chez les espèces de mammifères et notre ignorance relative des moyens d'identifier et de caractériser ces virus.

Autre sujet de préoccupation à dissiper : la possibilité que l'introduction de transgènes mène, par accident ou en raison de la nature de la manipulation génétique, à la suppression immunitaire ou à une modification de la résistance inhérente aux maladies chez un animal. Devraient également être pris en considération les effets immunologiques négatifs découlant de l'expression aberrante de produits géniques ou du déclenchement d'une tolérance immunologique.

On devrait surveiller la fonction de reproduction des animaux transgéniques, afin de déceler d'éventuelles altérations de la physiologie normale, de la fertilité, de la gravité et de l'évolution du fœtus. À cet égard, les avancées

scientifiques visant à comprendre les phénomènes tels que le syndrome de la progéniture de grande taille, caractérisé par la croissance excessive des fœtus et des organes, et les défauts placentaires constatés dans les techniques des embryons *in vitro* justifient un examen minutieux.

La nécessité de renseignements sur les exigences nutritionnelles modifiées des animaux, par suite de changements physiologiques entraînés par la transgénèse mérite aussi que l'on s'y attarde. Par exemple, l'insertion de gènes d'hormones de croissance, qui accélérerait beaucoup la croissance des animaux transgéniques, est susceptible d'exiger un apport plus important d'éléments nutritifs. Actuellement, nous connaissons peu les besoins métaboliques de ces animaux. On devrait déterminer les répercussions des changements génétiques sur les paramètres physiologiques et métaboliques dans le cadre du processus d'évaluation. En outre, on devrait tenir compte du risque que la transgénèse stresse davantage les animaux qui en sont issus. Comme une alimentation inadéquate ou l'augmentation du stress peuvent influencer directement sur la susceptibilité aux maladies, l'élucidation de ces paramètres serait vitale pour l'évaluation de la capacité de ces animaux de bien se développer dans différents milieux.

### Évaluation de la dissémination

Au Canada, la dissémination des animaux transgéniques sera un processus réglementé à l'échelon fédéral. Avant de l'autoriser, il faudra que les autorités fédérales fassent une évaluation approfondie, au cas par cas, du risque de l'opération, en tenant compte de la santé des animaux, de la santé humaine et des répercussions sur l'environnement. La dissémination ne devrait se faire que graduellement, les animaux passant de la claustration aux terrains confinés et, enfin, au milieu agricole. Dans les évaluations de la dissémination, on devrait tenter de répondre à une large gamme de questions touchant la santé des animaux, leur susceptibilité aux maladies, le risque de zoonose, la protection des animaux, la zootechnie, les répercussions sur les populations d'animaux domestiques et sauvages, la diversité biologique, la capacité de survivre dans le milieu agricole, les capacités de surveillance et de dépistage, la capacité de remonter aux origines d'un problème, la conformité aux règlements et la capacité d'application de ces derniers. Même si, au moyen des lois en vigueur ou à venir, on pourra s'occuper de nombre des questions susmentionnées, il est probable que certaines

d'entre elles, la protection des animaux et la zootechnie notamment, continueront de relever de l'action volontaire.

## Évaluation de la salubrité des aliments

### Processus de réglementation

Santé Canada a proposé un règlement sur les aliments nouveaux, qu'il espère placer sous le régime de la *Loi sur les aliments et drogues* à l'automne 1999. Ce règlement rendrait obligatoire pour toute société commerciale une notification préalable à la mise en marché de 45 jours avant la mise en vente ou la publicité en vue de la vente d'un aliment non traditionnel. On entend par aliments nouveaux (ou non traditionnels) : (i) toutes les substances sur lesquelles on ne possède aucun antécédent d'utilisation sûre ; (ii) les aliments qui ont été fabriqués, préparés, préservés ou emballés au moyen d'un processus qui n'a jamais été appliqué auparavant à cet aliment ou qui modifie notablement l'aliment ; et/ou (iii) un aliment tiré d'un végétal, d'un animal ou d'un micro-organisme génétiquement modifié, au point qu'on y observe des caractéristiques nouvelles ou que des caractéristiques normalement visibles ne le sont plus ou des caractéristiques sont observées à une intensité qui s'écarte de l'intervalle prévu.

Pour aider à clarifier les modalités nécessaires de l'évaluation des aliments nouveaux, Santé Canada a rédigé des *Lignes directrices relatives à l'évaluation de l'innocuité des aliments nouveaux*. Leur volume I concerne le mécanisme de notification ; leur volume II donne aux promoteurs le type d'information que l'on estime nécessaire à l'évaluation de la salubrité des aliments nouveaux dérivés de micro-organismes et de végétaux génétiquement modifiés. On rédige un troisième volume, qui portera précisément sur les données exigées pour les animaux de ferme et les poissons transgéniques.

### Considérations sur la salubrité et la qualité des aliments

L'évaluation du risque en matière de salubrité et de qualité des aliments comporte quatre étapes : (i) l'identification du danger ; (ii) la caractérisation du danger ; (iii) l'évaluation de l'exposition ; (iv) la caractérisation du risque. Comme il est difficile d'examiner de façon critique chaque point considéré sous l'angle des aspects de la nutrition, de la toxicologie, de la microbiologie et de la biologie moléculaire qui entrent dans l'évaluation d'un aliment nouveau dans la présente communication, nous présen-

tons ci-dessous quelques exemples choisis de chaque domaine afin de montrer comment ils pourraient contribuer à l'évaluation du risque.

Une grande partie de l'identification du danger, quel qu'il soit, provient de l'application du principe d'équivalence notable. Ce principe autorise la comparaison d'une chose inconnue (l'aliment génétiquement modifié) et d'une chose connue (l'aliment homologue traditionnel). Cette comparaison mène à trois issues possibles : (i) les deux produits seront jugés substantiellement équivalents ; (ii) les deux produits seront notablement équivalents, sauf pour ce qui concerne les caractéristiques précises, bien définies ; ou (iii) les deux produits ne sont pas notablement équivalents.

Par cette approche, les évaluateurs de tous les domaines peuvent rétrécir le champ de l'évaluation et la polariser vers une étude plus poussée des aspects différents dans l'aliment génétiquement modifié et son homologue traditionnel. Chaque différence identifiée sera jugée à son mérite, et il faudra fournir suffisamment de données pour montrer qu'elle ne soulève pas de motifs précis de préoccupation à l'égard de la salubrité des aliments. Cette approche se fonde sur les principes élaborés à la faveur de consultation d'experts internationaux par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) des Nations unies, de même que par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Actuellement, cette stratégie est appliquée par les organismes de réglementation de l'Union européenne, de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande, du Japon et des États-Unis.

Chaque évaluation détaillée permettra d'identifier un ou des dangers potentiels. Par exemple, la caractérisation moléculaire permettra d'examiner l'information sur l'origine du transgène, y compris le promoteur, les gènes structuraux et les gènes marqueurs, le nombre de copies insérées — à l'état homozygote ou hétérozygote — du transgène, leur emplacement et orientation ainsi que la méthode utilisée pour créer l'animal transgénique. À partir de cette information, on peut déterminer la nature, la fonction et la quantité du ou des produits de l'expression du caractère, qu'ils soient liés au caractère recherché ou qu'ils découlent d'un effet secondaire imprévu. Les produits d'expression peuvent se comporter exactement comme on le voulait, mais ils peuvent aussi influencer sur la régulation d'un gène natif.

Les données nutritionnelles à considérer comprendraient les cendres, les protéines brutes, les lipides et les glucides, les vitamines,

les minéraux ainsi que la composition des matières azotées, y compris le profil des acides aminés des séries D et L, et leur teneur, les types et quantités de lipides et leur bioassimilabilité, etc. Par exemple, si la concentration d'un acide aminé donné dans la viande, le lait ou les œufs génétiquement modifiés se révélait être située à l'extérieur de la gamme normale de concentrations observées chez les produits homologues traditionnels, il faudrait déterminer l'effet d'une concentration supérieure ou moindre de cet acide aminé lorsque le produit est consommé par l'être humain.

La caractérisation du danger peut comporter des études toxicologiques (c'est-à-dire dose journalière admissible, études pharmacocinétiques) et/ou épidémiologiques (c'est-à-dire bioassimilabilité, usages antérieurs sûrs, etc.). Dans ce processus, on établit la gamme des effets liés au danger pour la santé ainsi que le rapport dose/réponse. Pour ce rapport, il faut considérer des facteurs comme toute différence physiologique entre la population en général et la population considérée à plus fort risque.

L'évaluation de l'exposition comporte la prise en considération de l'information sur d'autres voies possibles d'exposition, l'origine ou les origines des dangers, la taille et la nature d'une population susceptible, et la quantité possible de viande, de lait ou d'œufs d'animaux génétiquement modifiés qui est consommée. En outre, le moment, la durée, la fréquence, la probabilité d'exposition et la concentration sont à examiner.

En dernière étape de l'évaluation du risque, on réunit toute l'information susmentionnée afin de caractériser le risque, en tenant compte du degré d'incertitude. Les types d'incertitudes comprennent les limites de détection de chaque méthode utilisée ou les difficultés éprouvées dans la mesure simultanée des répercussions de plusieurs constituants, comme le cas se présente dans les aliments. Il peut être nécessaire de réévaluer d'autres renseignements sur d'éventuelles répercussions négatives, les risques perçus et leur acceptabilité. De la sorte, afin de maximiser la fiabilité d'une décision finale concernant la salubrité, il est essentiel que les méthodes d'analyse, les normes, les hypothèses et les limites connues soient évaluées de façon critique. Cette activité mènera à une estimation quantitative ou qualitative de l'agent dangereux qui devrait être présent pour provoquer un effet négatif et du mécanisme biologique.

## CONCLUSIONS

Il importe d'examiner comment des produits alimentaires issus de technologies de la reproduction telles que l'insémination artificielle, la fécondation *in vitro*, le clonage et la transgénèse s'inséreraient dans l'évaluation du risque que nous venons de décrire. Au cours des dernières décennies, l'insémination artificielle et la fécondation *in vitro* ont été utilisées couramment au Canada. On ne s'inquiète pas des effets sur la santé et la salubrité des animaux de ferme qui en sont issus. Ces deux techniques de reproduction ne seraient donc pas évaluées quant à la salubrité alimentaire. Bien que le clonage par transfert de noyau ne comporte pas la manipulation du matériel génétique, mais qu'il modifie plutôt le rapport entre le cytoplasme et le noyau cellulaire, on possède une expérience réglementaire limitée de cette technique, pour ce qui concerne la salubrité des aliments. C'est pourquoi il reste à voir si le clonage doit ou ne doit pas être l'objet d'une évaluation des aliments nouveaux. D'autre part, les animaux transgéniques, quelle que soit la méthode utilisée pour les obtenir, doivent faire l'objet d'évaluations en vertu du projet de règlement sur les aliments nouveaux de Santé Canada ; en conséquence, ils seront assujettis à une évaluation complète de la salubrité des aliments.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'administration fédérale continue d'examiner les considérations réglementaires dont nous venons de discuter. L'amélioration continue des techniques d'évaluation du risque, pour relever les nouveaux défis découlant des percées des techniques d'obtention d'animaux transgéniques, et l'obtention des pouvoirs juridiques permettant précisément de s'attaquer aux problèmes susmentionnés seront déterminants pour un processus réglementaire averti et réceptif au Canada.

Au pays, plusieurs sociétés travaillent à des animaux (de ferme, et à des poissons) transgéniques, mais elles sont encore aux stades de la recherche - développement. On prévoit que d'ici deux à cinq ans, les responsables de la réglementation au Canada recevront des demandes d'évaluation de la dissémination d'animaux transgéniques et de la salubrité des aliments dérivés.

Enfin, à ce jour au Canada, aucun animal transgénique n'a été évalué en vue de son entrée dans la chaîne alimentaire humaine.

## RÉFÉRENCES

*Lignes directrices relatives à l'évaluation de l'innocuité des aliments nouveaux*, volumes 1 et 2, 1994. Santé Canada.

« Utilisation alimentaire prévue et sort des animaux transgéniques » (partie 1. — Questions liées à l'innocuité des aliments). 1998. *Consultation sur la réglementation des animaux d'élevage issus de la biotechnologie*. Rapport de séance, p. 23-25.

« Risques relatifs à la santé des animaux et aux zoonoses des animaux transgéniques ». 1998. *Consultation sur la réglementation des animaux d'élevage issus de la biotechnologie*. Rapport de séance, p. 51-55.

« Libération d'animaux transgéniques dans l'environnement » 1998. *Consultation sur la réglementation des ani-*

*maux d'élevage issus de la biotechnologie*. Rapport de séance, p. 27-30.

Règlements sur les aliments nouveaux. [www.hc-sc.gc.ca/food-aliment](http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment).

*Points to consider in the manufacture and testing of therapeutic products for human use derived from transgenic animals*. 1995. US Food and Drug Administration.

*Points to consider in the food safety evaluation of transgenic animals from transgenic animal research*. 1994. Ministère de l'Agriculture des États-Unis, Food Safety and Inspection Service.

---

## DISCUSSION DE LA DEUXIÈME SESSION

**B. Chevassus-au-Louis** — Monsieur Ferry-Wilczek, pourriez-vous nous préciser par quel canal se ferait, selon vous, la saisine du Codex Alimentarius en matière de clonage ?

**H. Ferry-Wilczek** — Il y a deux possibilités, soit un groupe *ad hoc* existe déjà et il y a toujours quelqu'un du groupe ou un pays qui attire l'attention du groupe sur ce sujet, c'est le cas du groupe *ad hoc* sur les biotechnologies, créé récemment, soit la Commission est saisie du problème et décide de créer un nouveau groupe *ad hoc*. Les OGM au sens large seront abordés dans ce groupe spécifique, même si les végétaux naturellement, sont « en avance » si l'on peut dire... il sera donc surtout question vraisemblablement au début, de végétaux transgéniques.

**D. Peper - Familles Rurales** — Ma question s'adresse également à Monsieur Ferry-Wilczek. Les derniers échos des conférences ou réunions nous donnent l'impression que les faits scientifiques ne pèsent plus autant de « tout leur poids » que dans le passé et que d'autres éléments interviennent dans le débat. Est-ce votre sentiment ?

**H. Ferry-Wilczek** — C'est exact. Les européens se sont bien mieux coordonnés ces dernières réunions pour faire valoir leur position, à savoir qu'il n'y pas que des arguments scientifiques à prendre en compte mais d'autres, par exemple les préoccupations des consommateurs. Nos positions plus ouvertes ont reçu un écho grandissant dans les discussions internationales.

**B. Chevassus-au-Louis** — Ce commentaire s'adresse à Monsieur Devillers. La réglementation INRA est de ne pas mettre sur le marché des animaux ayant consommé des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) végétaux **issus** d'expérimentations. Si on fait manger, comme des tas de gens en France, des OGM végétaux, des tourteaux de soja autorisés...

**Stéphane Devillers** — C'est exact. Mais comme on ne fait en principe que l'expérimentation, je n'ai pas pensé à le dire, vous avez raison.

**M. Séralini - Université de Caen** — J'ai apprécié tout à l'heure, dans la présentation du Codex Alimentarius, le schéma que vous avez présenté entre la science et les facteurs politiques au sens noble du terme. Cependant, il est vrai que les facteurs scientifiques peuvent eux-mêmes parfois ne pas relever de fait mais d'assomption. Un consensus scientifique peut d'abord être discutable et peut lui-même évoluer au fur et à mesure où la science évolue, soit dans sa prise en compte du principe de précaution, soit dans ses connaissances.

Les assomptions scientifiques, s'il n'y a pas d'étiquetage ou d'expérimentation, permettent de donner en continu à des animaux, des plantes transgéniques ou de doser, de manière précise, les composants de la viande et du lait d'animaux issus d'OGM.

On n'a pas intégré toutes les limites de la science dans la prise de décision. On procède par assomption et on prend en compte le niveau de bio-révéléteurs. Ces bio-révéléteurs ne peuvent pas être complètement connus si on n'a pas étiqueté ni suivi les effets.

Ces assomptions scientifiques intègrent un certain niveau économique, c'est-à-dire qu'il est décidé de ne pas faire cette expérience car cela va coûter trop cher.

Qui décide de la limite des assomptions scientifiques au niveau du Codex Alimentarius ? Est-ce les scientifiques eux-mêmes ou des personnes assistent aux débats comme dans le cadre des commissions françaises ?

**Hubert Ferry-Wilczek** — La première partie de votre question renvoie à la manière dont est organisée l'évaluation du risque, puis la gestion. Dans la discussion en cours sur les principes de l'analyse du risque, qui ont lieu au sein du Codex, que nous essayons de faire valoir, nous souhaitons que l'évaluation du risque faite par recours à l'expertise soit réalisée de telle manière que l'on ait une organisation du choix des experts, une transparence permettant de savoir d'où ils sortent, d'où ils viennent, et sur quoi ils travaillent, qui nous permettent d'avoir un minimum de confiance.

Les experts ne doivent pas simplement donner un résultat, mais nous permettre de distinguer quelque chose qui puisse être affirmé parce qu'il repose sur une base extrêmement solide sur des éléments qui sont, *in fine*, un jugement de valeur, au sens le plus noble du terme, savoir prendre ses responsabilités. Cela consiste, en fonction de tout ce que l'on voit, à dire « il nous semble que le niveau de risque est celui-là » afin qu'en arrivant au résultat, on ait connaissance des incertitudes qui restent ou des manques de données.

Tout cela pour avoir une confiance dans l'expertise mais aussi pour être en mesure d'effectuer la deuxième partie du travail qui est la gestion du risque.

C'est dans la gestion du risque, qu'éventuellement le principe de précaution intervient, c'est-à-dire de savoir, en fonction des avantages et des inconvénients des risques éventuels, si ce reste d'incertitude on décide de le courir ou pas selon l'intérêt que peut présenter le fait de le prendre ou pas.

Le problème est d'être en mesure de prendre des décisions dans l'absolu, en ayant pesé tous les risques autant que l'on peut les appréhender y compris le risque d'une incertitude. On peut avoir le risque en disant : « On sait qu'il va y avoir un mort sur mille ». Accepte-t-on un mort sur mille ou pas ? On accepte un risque, on peut penser qu'il est bon, mais il reste une petite incertitude. Accepte-t-on de courir le risque de cette incertitude ? Au niveau du Codex, nous essayons de faire évoluer, à travers l'édification de ces principes de l'analyse du risque, la manière dont les conseils scientifiques sont choisis, fonctionnent, sont transparents et donnent de l'information afin que, sur cette base, on puisse prendre des décisions, c'est le premier élément.

Le deuxième élément est qu'il faut prendre un risque. La bonne approche est de faire en sorte d'avoir à différents moments une évaluation du risque et de reprendre l'idée de l'OMC. On le fait de façon complètement confinée puis semi confinée. Après obtention des résultats, on le fait de manière plus large et on le met sur le marché. Une fois sur le marché, on installe un dispositif de bio-vigilance au cas où des problèmes se présenteraient et afin de prendre les décisions pour essayer de les résoudre. A chaque fois, si toutes ces étapes ont été effectuées, la probabilité d'apparition d'un problème diminue. C'est la seule manière d'avancer.

**Stéphane Devillers** — J'ai lu le procès-verbal d'une coopérative d'insémination qui fêtait récemment, ses 50 ans. Elle mentionnait que le premier veau né d'insémination dans cette zone, en 1946, avait été abattu quelques jours après sa naissance. Il était né, ce qui déjà était un miracle, et a été consommé par les administrateurs qui voulaient s'assurer qu'il était comestible.

Je vous rassure, le Président de cette époque est en bonne santé, mais ces préoccupations de santé alimentaires étaient déjà dans l'esprit des pionniers de l'insémination...

**Michel Thibier** — J'aurais deux questions pour notre confrère Primal Silva. La première concerne le clonage. Est-il exact qu'il n'y a pas de réglementation concernant l'entrée des clones dans la chaîne alimentaire ?

**Primal Silva** — Cette question s'inscrit dans la politique concernant les « aliments nouveaux » qui initialement se traitent de façon volontaire. Pour le moment il n'y a pas de notification obligatoire au gouvernement canadien d'animaux issus de clonage. Je ne connais donc pas exactement le nombre de tels clones susceptibles d'être entrés dans la chaîne alimentaire.

**Patrick Prunet** — Comment gérez-vous la « proximité » immédiate du Canada avec les USA en la matière ?

**Primal Silva** — Évidemment nous nous connaissons très bien et nous suivons nos réglementations respectives. Le mode de base de la réglementation des USA est aussi basé sur le volontariat. Nous n'avons pas, avec nos voisins américains, de groupe de travail commun en ce moment sur ces sujets de transgénèse animale, à l'inverse de ce qui se passe pour les plantes génétiquement modifiées par exemple, mais nous avons toujours des discussions sur ces sujets, sachant respectivement très bien quelles sont nos positions. Peut-être que le Canada est plus avancé sur ces questions ?..

**Michel Thibier** — Ma deuxième question se rapporte précisément aux « aliments nouveaux ». Avez-vous l'impression que les définitions de ces « aliments nouveaux » au Canada sont en phase ou en tout cas très proches de celles des Européens ?

**Primal Silva** — Tout d'abord permettez-moi de vous dire que l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments ainsi que le Ministère de la Santé au Canada travaillent en étroite concertation sur ce thème. J'ai eu l'occasion de vous le dire dans mon exposé. Nous nous appuyons surtout sur les documents-types de l'OCDE et bien que connaissant mal les termes européens, je présume qu'il doit y avoir un assez large accord. Naturellement si nécessaire, je ne verrais que des avantages à ce que vous et nous travaillions encore plus ensemble.

**Alain Rérat** — Excusez-moi de parler quelques instants de plantes OGM, mais sauf erreur de ma part vous avez au Canada plus de 10 millions d'ha semés avec de telles plantes, c'est énorme, comment faites-vous pour gérer cela ?

**Primal Silva** — De nouveau, en toute transparence, en parfaite liaison avec le Ministère de la Santé (Health Canada), nous appliquons les procédures très bien connues au Canada avec tous les documents nécessaires publiés et ouverts aux commentaires du public. La seule chose qui manque je crois, mais pour des raisons évidentes est le nom et le lieu exact où les champs d'OGM se trouvent, autrement tout est transparent. Il y a quelque pression un peu semblable à ce que vous trouvez ici en Europe, mais jusqu'à présent on a pu parler raisonnablement. Je pense que jusqu'à maintenant tout au moins, notre système « marche ».

Troisième session

---

## **L'analyse des risques**

*Modérateur : Ambroise Martin*



# Y a-t-il des risques zoonotiques liés aux biotechnologies de la reproduction ?

Marc ELOIT

École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort

## Résumé

L'émergence de nouvelles infections résulte d'un mécanisme à deux étapes : introduction d'un agent pathogène chez un nouvel hôte puis diffusion. Dans cette conception d'une circulation des agents infectieux, l'émergence de nouvelles maladies résulte essentiellement d'un changement des conditions d'interaction agent/hôte, correspondant à des modifications dans l'agriculture, le commerce, le tourisme ou l'usage des médicaments. L'utilisation des biotechnologies de la reproduction peut-elle fournir des possibilités de diffusion à des agents infectieux capables d'infecter l'homme au travers de l'aliment ?

L'épidémiologie des maladies infectieuses est la conséquence de la confrontation entre la fréquence de l'**exposition** à des agents infectieux et la **réceptivité** (aptitude à multiplier l'agent) et/ou sensibilité (aptitude à développer des symptômes) de l'hôte. Poser la question du risque lié à ces biotechnologies consiste à identifier soit des risques déjà existants dans des conditions naturelles de reproduction qui soient quantitativement modifiés, soit, de manière probablement plus alarmante, des risques qualitativement nouveaux. L'analyse doit tout d'abord porter sur l'hypothèse d'un risque accru pour l'animal dérivé de ces biotechnologies, le risque inhérent pour l'homme étant alors consécutif d'un hasard (l'agent infectieux considéré est pathogène pour l'homme), associé à des facteurs d'exposition au travers du contact avec l'animal, et de l'alimentation.

Pour le premier aspect, l'**exposition à des agents infectieux** peut s'effectuer par transmission horizontale (d'animal à animal, par contact direct ou par l'intermédiaire de matériel souillé) ou par transmission verticale (au travers des gamètes infectés, par transmission fœtale de la mère au fœtus, ou lors de la mise bas). Le risque éventuel lié à certaines biotechnologies de la reproduction concerne les risques de transmission verticale. Plus précisément, les barrières à l'infection naturelle du fœtus par des agents hébergés par la mère que sont normalement le type de placentation chez les mammifères et la réponse immune de la mère et/ou du fœtus sont évidemment inopérantes dans les conditions de culture *in vitro* puis d'implantation artificielle.

Ces risques sont liés aux réactifs biologiques utilisés pour stocker ou cultiver le matériel transféré. Le risque biologique peut être considéré comme relevant en terme de franchissement de barrières d'espèce car les **réactifs biologiques** utilisés sont souvent originaires d'une espèce animale différente de l'espèce cible. Néanmoins, les modes de sécurisation de ces réactifs sont connus et le risque correspondant est facilement maîtrisable. Un autre niveau de risque correspond à la possibilité que les conditions de culture ou de modification génétique du matériel transféré permette l'**activation de virus endogènes**, en particulier de rétrovirus.

Ces rétrovirus sont dans ce cas, par définition, endogènes à l'espèce considérée, et la démonstration que de telles réactivations correspondent ultérieurement à la naissance d'animaux à risque accru de portage ou d'excrétion reste à démontrer. Enfin, on ne doit pas négliger les aspects favorables de ce type de technique. S'agissant de manipulations *in vitro*, certains contrôles virologiques ou bactériologiques peuvent être développés, pouvant donner à ces approches un niveau de sécurité inconnu des modes de reproduction naturelle. En effet, nous rappellerons que les modes naturels de reproduction représentent un mode extrêmement efficace de transmission de maladies infectieuses, y compris zoonotiques.

La modification de la **réceptivité des animaux** peut être une conséquence accidentelle et indirecte des biotechnologies de la reproduction. Différents scénarios peuvent être envisagés pour les animaux où un gène étranger a été ajouté par transgénèse. Compte tenu de l'*absence de spécificité d'intégration* consécutif aux techniques actuelles (hors recombinaison homologue), des hypothèses de modification des réponses immunes, de la spécificité d'expression de certains récepteurs viraux dans certains types cellulaires, des mécanismes de défense antivirale intracellulaires, de la régulation de certaines hormones comme les glucocorticoïdes permettant l'activation de certains promoteurs viraux... sont envisageables.

De même, le *produit du transgène* lui-même peut modifier suffisamment certains métabolismes pour qu'un impact sur les mêmes effecteurs soit mesurable, ou modifier un cycle viral. La limitation de ce type de risque passe par des études au cas par cas en fonction des modes de transfert utilisés et du transgène employé. Néanmoins, si ces scénarios permettent d'envisager une modification de la sensibilité ou de la réceptivité de certaines espèces à certains agents infectieux préexistants, les conséquences directes pour la santé humaine ne sont pas obligatoirement objectivables, s'agissant d'agents infectieux auxquels la population humaine peut être déjà exposée sans conséquence pathologique.

La probabilité que de tels événements conduise à une susceptibilité accrue des animaux vis-à-vis d'agents qui seraient par ailleurs pathogènes pour l'homme, dans des conditions de non détection au travers des contrôles de la chaîne alimentaire, apparaît essentiellement théorique dans la plupart des situations. Par contre, certaines modifications du patrimoine génétique porcin dédié aux xénogreffes sont susceptibles de favoriser l'émergence de virus porcins possédant un nouveau tropisme d'espèce pour l'homme, et doivent donc être envisagées avec précaution.

Enfin, on peut se demander si une conséquence indirecte de l'utilisation de certaines de ces biotechnologies ne serait pas une homogénéisation accrue de la *diversité génétique* des espèces visées, avec des conséquences difficilement prévisibles sur les écosystèmes microbiens.

En résumé, la sécurisation des réactifs biologiques, les contrôles effectués sur les partenaires cellulaires lorsque cela est possible, l'approche théorique des effets potentiels du transgène pour les animaux transgéniques, l'approche expérimentale au cas par cas, sont de nature à donner à ces techniques un niveau de sécurité au moins équivalent à celui de la reproduction naturelle au regard du risque zoonotique.

L'émergence de nouvelles infections résulte d'un mécanisme à deux étapes : introduction d'un agent pathogène chez un nouvel hôte puis diffusion. Dans cette conception d'une circulation des agents infectieux (Morse, 1993), l'émergence de nouvelles maladies résulte essentiellement d'un changement des conditions d'interaction agent/hôte, correspondant à des modifications dans l'agriculture, le commerce, le tourisme ou l'usage des médicaments. L'utilisation des biotechnologies de la reproduction peut elle fournir des possibilités de diffusion à des agents infectieux capables d'infecter l'homme au travers de l'aliment ?

Nous rappellerons tout d'abord quelques éléments sur la transmission des maladies infectieuses, puis la notion de zoonose sera évoquée dans le cadre plus général du concept de réceptivité et de sensibilité aux agents infectieux. Enfin, nous discuterons des risques éventuels associés aux biotechnologies de la reproduction.

## TRANSMISSION DES AGENTS INFECTIEUX

La figure 1 résume les différentes modalités de transmission développées dans le texte.

La **transmission directe** correspond aux situations de contact entre animal donneur et receveur. La transmission entre individus indépendamment de la filiation est appelée **transmission horizontale**. La voie muqueuse est impliquée pour la plupart des maladies, et plusieurs muqueuses agissent comme site de transmission. La voie *vénérienne* est concernée dans la transmission de la brucellose, de la campylobactériose, de maladie d'Aujeszky... La voie *oronasale* est fréquente pour certaines maladies. Ainsi, certains virus, bactéries ou parasites peuvent être isolés dans le lait de mères infectées et être transmis à leur progéniture (chorioméningite lymphocytaire, maladie d'Aujeszky...).

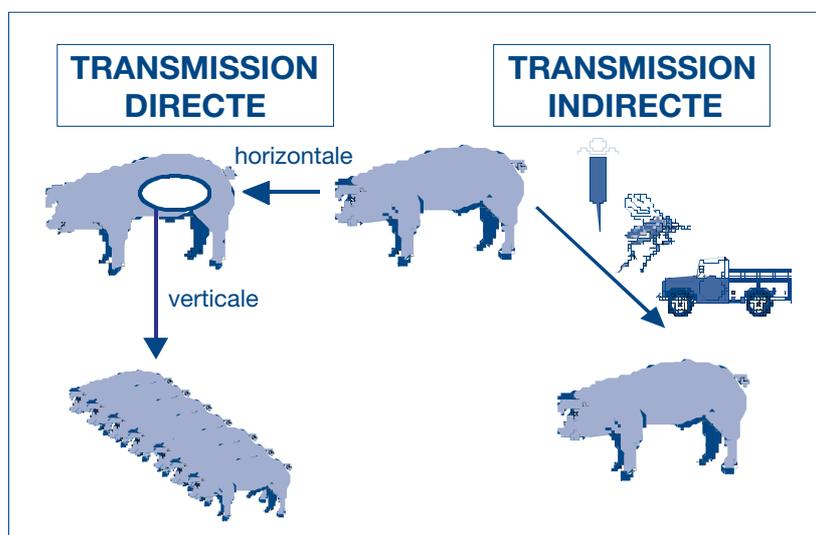


Figure 1 – Modalités de transmission des maladies infectieuses.

Le cannibalisme joue un rôle important dans le maintien de la trichinose en élevage porcin. La voie *percutanée* est utilisée dans les maladies transmises par morsure (rage, maladie des griffes du chat, pasteurellose,) mais aussi pour certains rares agents capables de traverser la peau saine (tularémie). La transmission entre les parents (habituellement la mère) et le fœtus pendant la conception, la gestation ou la mise bas est appelée **transmission verticale**. Les *maladies infectieuses héréditaires* existent sporadiquement par infection des gamètes pour certains rétrovirus, et on peut y rattacher les formes de maladies de Creutzfeldt-Jacob familiales liées à des mutations du gène de la protéine PrP, qui se comportent également comme des maladies transmissibles. Les *maladies congénitales* peuvent être transmises pendant la gestation ou la mise-bas. Les pestivirus, Brucella sp., Toxocara canis sont transmis au fœtus après passage de la barrière placentaire. Dans de telles conditions, les animaux survivant à cette infection fœtale peuvent développer une tolérance immune en restant porteur chronique de l'agent sans être détectable par des tests classiques de recherche d'anticorps. De nombreuses maladies sont transmises par contact avec les muqueuses ou le sang de la mère au moment de la mise bas (herpesvirose, infection à papillomavirus).

La **transmission indirecte** est définie par la diffusion d'agents entre individus sans contact entre eux. Elle peut impliquer *l'eau, le sol, ou l'air* contaminé. Cette voie est spécifiquement importante pour des agents infectieux excrétés à haut titre dans l'environnement, de telle manière que même après dilution dans l'environnement, la concentration en agent reste suffisante (salmonelles, rotavirus, brucelles, leptospires). Dans certaines conditions d'environnement, les bactéries peuvent non seulement survivre mais se multiplier. Le matériel contaminé (seringues, ustensiles d'élevage...) peut également être impliqué. Des *organismes vivants* non réceptifs à l'agent (incapables de le multiplier) peuvent également jouer le rôle de vecteur (rapaces disséminant des spores de Bacillus anthracis après ingestion de proies mortes de charbon). Enfin les arthropodes peuvent transmettre certaines maladies soit par simple transport mécanique (taons et leucose bovine ou anémie infectieuse des équidés ; mouche domestique et Salmonelles), soit par transmission biologique au cours de laquelle l'agent est multiplié par l'arthropode : arboviroses comme la fièvre de la vallée du Rift, babésiose, leishmaniose...

## DU CONTACT AVEC L'AGENT INFECTIEUX A LA MALADIE : LE CAS PARTICULIER DES ZONOSSES

Du contact avec l'agent infectieux ne découle pas obligatoirement une maladie.

En premier lieu, il est nécessaire que l'hôte, animal ou homme, soit **réceptif**, c'est-à-dire capable de multiplier l'agent. Ainsi les bovins sont réceptifs au virus de la fièvre aphteuse alors que les chiens ne le sont pas. Le déterminisme de cette réceptivité reste encore inconnu pour un grand nombre d'agents infectieux, même si elle est en partie documentée pour certains d'entre eux.

Pour des espèces réceptives, l'aptitude à développer des symptômes définit la **sensibilité**. Ces deux notions, réceptivité et sensibilité doivent être bien différenciées. Ainsi certains rongeurs sont réceptifs à certains virus et les multiplient sans présenter de symptômes, se comportant en réservoir. Ils peuvent transmettre ces virus à certains animaux domestiques ou à l'homme, qui sont à la fois réceptifs et sensibles. Quand le rôle de l'agent infectieux est nécessaire et suffisant, on parle de maladie monofactorielle (rage...). Lorsque le rôle de l'agent pathogène est nécessaire mais non suffisant (autrement dit lorsque cet agent n'est qu'un des facteurs responsable des symptômes), on parle de maladies plurifactorielles. Les bronchopneumonies enzootiques des bovins sont un exemple de ce type de maladie où plusieurs agents pathogènes très prévalents et des facteurs individuels et d'environnement agissent de manière synergique. Au-delà du risque de voir les biotechnologies de la reproduction, et en particulier les animaux transgéniques, donner naissance à des animaux plus sensibles à, ou infectés par, des agents de maladie monofactorielles, un risque plus difficile à évaluer est celui d'une sensibilité accrue à ces maladies plurifactorielles où les fluctuations individuelles de sensibilité sont plus marquées. Néanmoins, il ne s'agit pas là d'un problème de santé publique en raison de la prévalence important des agents considérés, auxquels l'homme est déjà exposé.

Qu'en est-il de la sensibilité de l'homme à certains agents infectieux animaux ? A titre d'exemple, le tableau 1 indique les zoonoses transmissibles à partir de certaines espèces animales majeures. Par ailleurs, de nombreux agents infectieux animaux n'ont pas de potentiel pathogène connu chez l'homme. Ce constat ne permet cependant pas d'en déduire avec une certitude absolue qu'ils soient anodins. En effet,

il existe une certaine incertitude sur la définition des zoonoses. Pour qu'une zoonose soit identifiée comme telle dans les conditions naturelles, il faut que l'infection animale soit suffisamment répandue et/ou que la maladie humaine corresponde à des symptômes identifiables, évoluant sur un mode aigu. Dans ces cas, le nombre de cas de maladie peut permettre d'établir une relation entre l'infection humaine et animale. En définitive, puisque la reproduction expérimentale de la maladie est bien sûr exclue chez l'homme, il est en pratique extrêmement difficile de prouver qu'un micro-organisme n'est pas agent de zoonose, même en restreignant l'investigation aux conditions de transmission naturelle. Un telle démonstration passe par la mise en place d'enquêtes épidémiologiques visant à identifier si le contact direct ou indirect (en particulier au travers de l'aliment) avec l'agent pathogène est un facteur de risque d'apparition de la maladie humaine. De telles enquêtes ont rarement été effectuées : pour la tremblante (scrapie) du mouton (agent transmissible non conventionnel) et la leucose bovine enzotique (rétroviridae), elles ont fourni des résultats en défaveur d'un risque pour la santé humaine. A l'inverse, les coronavirus du chat (péritonite infectieuse féline) et du porc

(gastro-entérite transmissible et coronavirus respiratoire) sont très proches du coronavirus respiratoire humain 229E : néanmoins, le très faible nombre de travaux effectués sur ce dernier virus ne permet pas une évaluation satisfaisante des risques d'inter-transmissibilité. Enfin les virus grippaux représentent une situation complexe : les oiseaux aquatiques et plus accessoirement le porc semblent jouer un rôle de réservoir pour différentes souches qui peuvent y subir des réassortiments avec émergence de souches pathogènes pour l'homme. Néanmoins la transmission naturelle animal vers l'homme est un événement rare, alors que la transmission homme vers animal (particulièrement le porc) apparaît plus fréquente.

Les risques de transmission d'agents pathogènes de l'animal à l'homme ne sont qu'une situation particulière des cas de transmission inter-spécifique. Les exemples dans le domaine de la pathologie infectieuse vétérinaire doivent inciter à la prudence quant à l'évaluation des risques. Ainsi, il y a une dizaine d'années, de très nombreux cas d'infection grave à pestivirus sont apparus chez le porc, après utilisation d'un lot de vaccin vivant contre la maladie d'Aujeszky contaminé par un pestivirus du mouton. Or, aucun cas clinique chez le porc n'avait jamais

**Tableau 1 – Virus et bactéries à potentiel zoonotique présents ou susceptibles d'être présents chez les bovins, porcins et volailles en France métropolitaine. Seuls certains de ces agents pathogènes ont été à l'origine de contamination par voie alimentaire.**

	<b>Bovins</b>	<b>Porcins</b>	<b>Oiseaux</b>
<b>Virus</b>	Poxviridae (cowpox, pseudocowpox, stomatite papuleuse) Encéphalopathie spongiforme bovine	Orthomyxoviridae (grippe) Rétroviridae ? (retrovirus endogène porcin) Picornaviridae (maladie vésiculeuse des suidés, encéphalomyocardite)	Orthomyxoviridae (grippe) Paramyxoviridae (maladie de Newcastle)
<b>Bactéries</b>	Bacillus anthracis (charbon) Brucella sp (brucellose) Campylobacter sp. (campylobactériose) Coxiella burnetii (fièvre Q) Escherichia coli VT + (colibacillose) Leptospira sp. (leptospirose) Listeria monocytogenes (listeriose) Mycobacterium bovis (tuberculose) Pasteurella sp (pasteurellose) Salmonella sp (salmonellose)	Bacillus anthracis (charbon) Brucella sp (brucellose) Campylobacter sp. (campylobactériose) Coxiella burnetii (fièvre Q) Erysipelothrix rhusiopathiae Escherichia coli VT + (colibacillose) Leptospira sp. (leptospirose) Mycobacterium bovis (tuberculose) Pasteurella sp (pasteurellose) Salmonella sp (salmonellose)	Campylobacter sp. (campylobactériose) Chlamydia psittaci (ornithose) Erysipelothrix rhusiopathiae Escherichia coli VT + (colibacillose) Listeria monocytogenes (listeriose) Salmonella sp (salmonellose) Yersinia pseudotuberculosis : pseudotuberculose

été rencontré après contamination naturelle, probablement en raison de la faible probabilité de cette transmission, pour des raisons tenant aux modes d'élevage de ces deux espèces. Il en est ainsi de la transmission de l'agent de la BSE aux bovins par l'intermédiaire de l'aliment.

On doit ajouter que la situation à un moment donné ne préjuge pas de la situation future. Encore plus fréquemment que chez l'homme, de nouveaux variants ou de nouvelles espèces virales émergent régulièrement au sein des différentes espèces animales, et présentent des modifications de tropisme tissulaire ou d'espèce cible. Ainsi, un variant du parvovirus du chat a émergé en 1978 et a changé d'hôte, en tuant des milliers de chiens après une dissémination mondiale. Le calicivirus de la maladie hémorragique du lapin était inconnu il y a quelques années et est actuellement répandu à travers le monde entier. Le coronavirus de la gastro-entérite transmissible du porc, virus à tropisme entérique strict, a connu une mutation portant sur quelques acides aminés qui a transformé totalement son tropisme pour en faire un virus des voies respiratoires supérieures, qui a diffusé à travers l'Europe par transmission aérienne. Des souches hypervirulentes de pestivirus sont apparues au cours des dernières années chez les ovins et les bovins, réalisant un tableau clinique de fièvre hémorragique très différent du tableau clinique habituel. Ces modifications peuvent bien sûr intéresser l'homme : ainsi, il est probable que le virus du SIDA dérive d'un virus animal et ait pu connaître une adaptation à l'homme au travers de modalités initiales de transmission interspécifique actuellement inconnues. Des cas humains mortels ont été enregistrés après contact avec un cheval atteint d'une infection à virus Hendrah (paramyxoviridae, rubalavirus) d'origine chauve souris, non décrite jusqu'alors (Murray *et al.*, 1995). D'autres cas humains mortels ou sévères d'infection à paramyxoviridae des chauves souris ont été décrits après relais apparent chez le porc (virus Nipah et Menangle). Enfin, certaines données récentes de la littérature ne sont pas encore confirmées par le recul mais doivent aussi inciter à la prudence : il s'agit par exemple de l'implication du virus Borna (infectant de nombreux mammifères dont les chevaux) dans certains syndromes de démence chez l'homme (Bode *et al.*, 1995). Nous retiendrons comme dernier exemple celui du rétrovirus porcin, endogène chez le porc, dont Patience *et al.* (1997) ont montré que la forme répliquative isolée de cellules rénales de porc PK15 était capable de se multiplier dans des cellules humaines. Ce virus est résistant aux anticorps du sérum humain

après passage sur cellules humaines, car elles ne permettent pas l'ajout de certaines formes de glycosylation qui sont reconnues comme étrangères chez l'homme. Le virus issu de cellules porcines modifiées pour ne plus effectuer cette glycosylation afin de ne pas être reconnu par la réponse immune de l'homme post-greffe, posséderait les mêmes caractéristiques de risque accru chez l'homme.

Par ailleurs, toutes les infections connaissent un effet dose : en deçà d'une dose seuil, l'infection n'est pas réalisée. Ainsi, la maladie de Newcastle des volailles a toujours été une zoonose exceptionnelle chez l'homme alors que l'infection animale est fréquente, sans doute parce que la dose infectante chez l'homme est relativement élevée et peu susceptible d'être rencontrée dans les conditions naturelles. Il est probable que d'autres zoonoses potentielles soient méconnues pour les mêmes raisons.

## LES RISQUES ZONOTIQUES LIÉS AUX BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION

L'épidémiologie des maladies infectieuses est donc la conséquence de la confrontation entre la fréquence de l'**exposition** à des agents infectieux et la **réceptivité** (aptitude à multiplier l'agent) et/ou **sensibilité** (aptitude à développer des symptômes) de l'hôte. Poser la question du risque lié à ces biotechnologies consiste à identifier soit des risques déjà existants dans des conditions naturelles de reproduction qui soient quantitativement modifiés, soit, de manière probablement plus alarmante, des risques qualitativement nouveaux. L'analyse doit tout d'abord porter sur l'hypothèse d'un risque accru pour l'animal dérivé de ces biotechnologies, le risque inhérent pour l'homme étant alors consécutif d'un hasard (l'agent infectieux considéré est pathogène pour l'homme), associé à des facteurs d'exposition au travers du contact avec l'animal, et de l'alimentation.

Pour le premier aspect, l'**exposition à des agents infectieux**, le risque éventuel lié à certaines biotechnologies de la reproduction concerne les risques de transmission verticale. Plus précisément, les barrières à l'infection naturelle du fœtus par des agents hébergés par la mère que sont normalement le type de placentation chez les mammifères et la réponse immune de la mère et/ou du fœtus sont évidemment inopérantes dans les conditions de culture *in vitro* puis d'implantation artificielle. Ces risques sont liés aux réactifs biologiques utilisés pour stocker ou cultiver le matériel

transféré. Le risque biologique peut être considéré comme relevant en terme de franchissement de barrières d'espèce car les **réactifs biologiques** utilisés sont souvent originaires d'une espèce animale différente de l'espèce cible. Néanmoins, les modes de sécurisation de ces réactifs sont connus et le risque correspondant est facilement maîtrisable. Un autre niveau de risque correspond à la possibilité que les conditions de culture ou de modification génétique du matériel transféré permette **l'activation de virus endogènes**, en particulier de rétrovirus. Ces rétrovirus sont dans ce cas, par définition, endogènes à l'espèce considérée, et la démonstration que de telles réactivations correspondent ultérieurement à la naissance d'animaux à risque accru de portage ou d'excrétion reste à démontrer. Dans ces deux situations, le risque que les animaux nés développent une tolérance immune à l'agent et puissent se comporter comme des porteurs chroniques non ou peu détectables par les techniques sérologiques doit être pris en compte. Enfin, on ne doit pas négliger les aspects favorables de ce type de technique. S'agissant de manipulations *in vitro*, certains contrôles virologiques ou bactériologiques peuvent être développés, pouvant donner à ces approches un niveau de sécurité inconnu des modes de reproduction naturelle. En effet, nous rappellerons que les modes naturels de reproduction représentent un mode extrêmement efficace de transmission de maladies infectieuses, y compris zoonotiques.

La modification de la **réceptivité des animaux** peut être une conséquence accidentelle et indirecte des biotechnologies de la reproduction. Différents scénarios peuvent être envisagés pour les animaux où un gène étranger a été ajouté par transgénèse. Compte tenu de *l'absence de spécificité d'intégration* consécutif aux techniques actuelles (hors recombinaison homologue), des hypothèses de modification des réponses immunes, de la spécificité d'expression de certains récepteurs viraux dans certains types cellulaires, des mécanismes de défense antivirale intracellulaires, de la régulation de certaines hormones comme les glucocorticoïdes permettant l'activation de certains promoteurs viraux... sont envisageables. De même, le *produit du transgène* lui même peut

modifier suffisamment certains métabolismes pour qu'un impact sur les mêmes effecteurs soit mesurable, ou modifier un cycle viral. La limitation de ce type de risque passe par des études au cas par cas en fonction des modes de transfert utilisés et du transgène employé. Néanmoins, si ces scénarios permettent d'envisager une modification de la sensibilité ou de la réceptivité de certaines espèces à certains agents infectieux préexistants, les conséquences directes pour la santé humaine ne sont pas obligatoirement objectivables, s'agissant d'agents infectieux auxquels la population humaine peut être déjà exposée sans conséquence pathologique. La probabilité que de tels événements conduise à une susceptibilité accrue des animaux vis-à-vis d'agents qui seraient par ailleurs pathogènes pour l'homme, dans des conditions de non détection au travers des contrôles de la chaîne alimentaire, apparaît essentiellement théorique dans la plupart des cas. Par contre certaines modifications du patrimoine génétique porcin dédiées aux xénogreffes peuvent présenter des risques spécifiques. Les objectifs généraux sont en effet de faire acquérir aux cellules porcines certaines caractéristiques des cellules humaines afin de limiter la réponse immune de l'hôte contre le greffon. Comme décrit antérieurement à propos du rétrovirus endogène porcin, de telles manipulations sont susceptibles de favoriser l'émergence de virus porcins possédant un nouveau tropisme d'espèce pour l'homme, et doivent donc être envisagées avec précaution.

Enfin, on peut se demander si une conséquence indirecte de l'utilisation de certaines de ces biotechnologies ne serait pas une homogénéisation accrue de la *diversité génétique* des espèces visées, avec des conséquences difficilement prévisibles sur les écosystème microbiens.

En conclusion, la sécurisation des réactifs biologiques, les contrôles effectués sur les partenaires cellulaires lorsque cela est possible, l'approche théorique des effets potentiels du transgène pour les animaux transgéniques, l'approche expérimentale au cas par cas, sont de nature à donner à ces techniques un niveau de sécurité au moins équivalent à celui de la reproduction naturelle au regard du risque zoonotique.

**RÉFÉRENCES CITÉES DANS LE TEXTE**

- Bode L., Zimmermann W., Ferszt R., Steinbach F., Ludwig H. (1995) Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nature Medecine* 3, 232-236.
- Morse S. Emerging viruses, 1993, Oxford University Press, Oxford, New-York.
- Patience C., Takeuchi Y., Weiss R.A. (1997) Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Medecine* 3, 282-286.
- Murray K., Selleck P., Hooper P., Hyatt A., Gould A., Gleeson L., Westbury H., Hiley A., Selvey L., Rodwell B., Ketterer P. (1995) A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 268, 94-97.

**RÉFÉRENCES DE SYNTHÈSE**

- Acha P.N., Szyfres B. (1989) Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, Paris, Office International des Épidémiologies.
- Eloit M., Benet J.J., Bourdeau P. (1997) Epidemiology of infectious and parasitic diseases, in *Vaccinology*, OIE editions, Paris.
- Eloit M. (1997) Risques virologiques associés aux matières premières extraites de tissus animaux utilisées dans la fabrication des médicaments. *Virologie* 5, 413-422.
- Eloit M. (1999) Risks of virus transmission associated with animal sera or substitutes and methods of control, in *Animal sera, animal sera derivatives and substitutes used in the manufacture of pharmaceuticals: viral safety and regulatory aspects*. *Dev Biol Stand*, Basel, Karger 99, 9-16.
- Organisation Mondiale de la Santé, Zoonoses bactériennes et virales, Genève, O.M.S., série de rapports techniques, n° 682, 1982.



# Les contaminants microbiens des cultures cellulaires

Florian HORAUD

Institut Pasteur, F-75724 Paris cedex 15

## Résumé

Les cultures cellulaires (CC), développées au milieu du notre siècle, sont devenues un des outils majeurs de la recherche biomédicale et de l'industrie moderne de la biotechnologie. La technique qui exploite la capacité de la cellule animale à se propager *in vitro* s'est diversifiée considérablement, satisfaisant ainsi les exigences les plus variées, de l'étude de la différenciation cellulaire à la production des protéines médicales dans des bioréacteurs géants. La technologie de la transgénèse animale et son potentiel considérable impliquent aussi des étapes où les CC sont indispensables, et il est normal de s'interroger sur les pièges que nous réserve une telle démarche.

Historiquement le « *premier ennemi* » des CC a été les contaminations bactériennes et ce sont elles qui ont retardé d'un demi-siècle le développement de cette technologie. Même à l'heure actuelle, les contaminations bactériennes restent un redoutable danger pour les cellules en culture. Au fur et à mesure que la méthodologie et le volume des CC se sont développés, nous avons appris que les contaminations microbiennes ne sont que la partie visible de l'iceberg et qu'en dessous se trouvent des contaminations plus subtiles qui comportent : i) les cellules provenant d'une autre culture ; ii) les mycoplasmes, micro-organismes étudiés surtout à cause de leur importance comme contaminants cellulaires et enfin, « *the last but not the least* » iii) les virus.

Les connaissances sur les contaminants microbiens et les méthodes pour détecter leur présence ont suivi tous les progrès réalisés dans le domaine de l'identification des signaux moléculaires et immunologiques spécifiques, progrès qui ont changé d'ailleurs la face de la microbiologie.

Il est peut-être trop tôt pour évaluer l'impact spécifique des différentes contaminations des CC sur les techniques de transgénèse animale, mais il est certain que le dogme de la pureté microbienne des CC doit être pris en considération. Une sagesse apprise au cours des dernières années, qui nous demande de rester vigilants chaque fois qu'une technologie nouvelle concernant le vivant, se met en place.

Je n'envisage pas de faire un inventaire complet du sujet annoncé dans le titre car il est trop vaste. Mon intention est surtout d'*exhumer* ici certains aspects de la contamination des cultures cellulaires, qui ont été bien documentés dans le passé, mais qui, au fil du temps, ont été mis dans « les oubliettes » de la littérature scientifique. En effet, le grand danger qui guette les cultures cellulaires, c'est la facilité avec laquelle on les obtient.

Initiées en 1907 par Harrison, les cultures des cellules sont restées, jusqu'au milieu du XX<sup>e</sup> siècle, une technique particulière pratiquée par un nombre réduit de chercheurs. L'essor des cultures cellulaires, comme un outil fondamental dans la recherche biomédicale, émerge à la fin des années 1940 grâce à quelques observations capitales. Il convient de citer ainsi la démonstration faite par Earle en 1943 sur la capacité des cellules de rongeurs à produire des lignées continues, et la découverte capitale, faite en 1949, par Enders, Weller et Robbins, sur la propriété de répllication du poliovirus sur

les cellules fibroblastiques des primates. Mais ces observations à leur tour ont été rendues possibles grâce au perfectionnement des techniques de travail en conditions stériles. En effet, en matière de cultures cellulaires, il est nécessaire « d'annoncer la couleur » dès le début et de dire que le premier ennemi de cette méthode a été, et reste encore, les contaminants bactériens.

Le terme de « culture cellulaire » demande certains éclaircissements : Harrison, et plus tard Carrel, ont utilisé la culture des tissus non-fragmentés et c'est ainsi que s'établit le terme de « culture de tissus » qui aujourd'hui est devenu inadéquat. Il est certain qu'à présent les cellules dispersées cultivées, soit en monocouches accrochées sur un support solide, soit en suspension, constituent les systèmes les plus utilisés. Ils offrent l'avantage de faciliter l'étude de la cellule comme micro-organisme autonome, indépendamment des variations qui se produisent dans l'organisme au cours de l'homéostasie normale ou pendant le stress expérimental.

Les principales étapes qui ont marqué le progrès de la technologie des cultures cellulaires sont montrées dans le tableau 1.

Il est facile de remarquer dans ce tableau la progression rapide de cette technologie, favorisée en particulier par l'essor des vaccins viraux et par les avancées de la biotechnologie. Mais au fil des années, des passerelles importantes se sont établies entre les objectifs de l'industrie et les approches nécessaires de la recherche fondamentale pour laquelle les cultures cellulaires étaient un outil indispensable dans les recherches de physiologie et de génétique cellulaire.

L'évolution de la technologie cellulaire a été dépendante des perfectionnements techniques et conceptuels tels que, par exemple, l'utilisation du plastique comme support solide. Les chercheurs ont dû cependant faire face, en même temps, au problème des contaminants. En effet, le développement rapide des cultures en masse, exigé par les besoins de l'industrie, a constitué un facteur d'augmentation du risque de contaminations. C'est ainsi qu'en partant des cultures de cellules en petits tubes de verre, nous sommes arrivés aujourd'hui aux bioréacteurs de 5 000 l.

Si nous considérons les progrès réalisés dans le domaine qui fait l'objet de notre présentation, il est facile d'observer que l'introduction des hottes à flux laminaire d'air stérile, et les membranes filtrantes de 22  $\mu$  (et dernièrement l'introduction de la nanofiltration) ont permis d'améliorer considérablement la stérilité des cultures cellulaires.

**Tableau 1 – Progrès dans la technologie des cultures cellulaires.**

Earle (1943)	Les cellules de rongeurs sont capables de produire des lignées cellulaires continues
Enders, Weller et Robbins (1949)	Les fragments de tissus non-nerveux sont susceptibles au poliovirus
Dulbecco (1952)	Cultures des cellules en monocouche sur support solide. Préparation des vaccins viraux
Hayflick et Morhead (1961)	Cultures des cellules diploïdes humaines. Vaccins viraux
Macpherson et Stoker (1962)	Cultures en suspension, BHK 21. Vaccin contre la fièvre aphteuse
Van Wezel (1967)	Cultures sur microsupport en bioréacteur. Vaccins et produits de biotechnologie
Millstein et Kohler (1976)	Cultures des hybridomes

Les contaminants des cultures cellulaires sont présentés dans le tableau 2.

Il est nécessaire de rappeler ici que la contamination fortuite d'une culture cellulaire par les cellules provenant d'une autre culture n'a pas été un accident rare. Cette affirmation est surtout valable pour toutes les lignées cellulaires établies et utilisées avant les années 1970, époque où les hottes à flux laminaire et les filtres de 22  $\mu$  n'étaient pas encore introduits. C'est ainsi que de nombreuses lignées sont contaminées par des cellules adventices, comme c'est le cas des cellules HeLa. Pratiquement toutes les lignées continues de cellules de tumeurs humaines, comme par exemple Hep2, KB, etc., sont en réalité des cellules HeLa. Cette constatation est évidente lors d'un examen par un test très sensible comme le polymorphisme génique.

Hakku a publié en 1984 (*Cell Characterization by use of multiple genetic markers*, dans *Eukariotic Cell Culture* pag 13-31, Plenum Publishing Co) une étude sur 275 échantillons de lignées cellulaires examinées sur une période de 18 mois. Ses résultats sont présentés dans le tableau 3. Comme on peut l'observer, les résultats de Hakku montrent la fréquence avec laquelle les contaminations fortuites des cultures par les cellules provenant d'une autre culture.

Il y a un consensus pour considérer que la plupart des contaminations croisées des cultures cellulaires sont le résultat d'une gestuelle erronée de l'opérateur. Il est certain, que même à l'heure actuelle, très peu d'entre nous mesurent judicieusement ce risque.

Dans le tableau 4 sont montrées les précautions à prendre pour éviter une contamination cellulaire croisée.

**Tableau 2 – Les contaminants des cultures cellulaires.**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contamination croisée par des cellules animales adventices provenant d'une autre culture cellulaire.</li> <li>• Levures</li> <li>• Bactéries (mycoplasmes)</li> <li>• Virus adventices indigènes pour l'espèce respective (SV40 dans les reins de Rhésus)</li> <li>• Virus adventice non-indigène pour l'espèce (BVD dans les cellules de rongeurs)</li> <li>• Rétrovirus endogènes (humains et primates, rongeurs, aviaires)</li> <li>• Rétrovirus exogènes</li> </ul>
--

**Tableau 3 – Résumé des contaminations croisées de lignées cellulaires.**

Reported cell species	Cultures received	Interspecies	Intraspecies	% total
Human	160	40 (25 %)	18 (11 %)	36
Mouse	27	2	–	8
Cat	24	1	–	4
Others	64	35	–	54
Total	275	78	18	35

Données issues d'une enquête de 18 mois.

**Tableau 4 – Recommandations pour éviter une contamination des cultures cellulaires.**

- Introduire dans le laboratoire uniquement des cellules provenant d'une banque cellulaire réputée, ou procéder rapidement à sa caractérisation (commencer par les tests de stérilité bactérienne (et mycoplasmes).
- Ne jamais utiliser les mêmes flacons de milieux ou de solutions pour des cellules différentes.
- Ne jamais réutiliser dans un milieu une pipette qui a été en contact avec des cellules.
- Travailler toujours en dernier les cellules de croissance rapide (HeLa) ou non caractérisées.

Je ne veux pas insister sur la contamination par les bactéries car elle présente l'avantage d'être visible dans la plupart des cas. Cependant la contamination par les mycoplasmes donne encore du fil à retordre : elle est invisible macroscopiquement, n'interfère pas dans tous les cas avec la réplication cellulaire, et enfin elle n'est pas facile à détecter. L'opérateur est très souvent responsable de ces contaminations. Toutefois, la culture des cellules d'explant primaire, prélevées directement d'un organe ou d'un tissu humain ou animal, augmente fortement le risque de contamination par les mycoplasmes. Que faire avec un lignée contaminée par des mycoplasmes ? Mon expérience personnelle m'indique une solution qui est capitale : « la politique de la terre brûlée », c'est-à-dire passer le plus vite possible à l'autoclave les cellules contaminées par des mycoplasmes. Si vous êtes un optimiste incorrigible et un courageux, essayez de les guérir !

Je voudrais maintenant en venir aux contaminations virales. Je commence par vous faire une confession : il y a deux ans j'ai été informé que dans certains centres de fécondation médicalement assistée en France, la fécondation était effectuée en présence d'une couche de cellules nutritives (feeder layer) constituée de cellules

de souris 3T3 ou, pire encore, de cellules de la lignée de souris L — la plus ancienne lignée continue — établie en 1943 par Earl, réputée comme contaminée par des cellules adventices, mycoplasmes et rétrovirus. Depuis, des mesures ont été prises pour arrêter ce type de manipulation et heureusement, il n'y a pas eu de conséquences fâcheuses.

Les contaminants viraux des cultures cellulaires ayant fait l'objet d'un long débat qui n'est pas encore terminé, sont les rétrovirus. L'intérêt que nous portons à ce groupe de virus ne provient pas seulement de la modernité du sujet mais surtout des nombreuses questions de sécurité soulevées par la présence de rétrovirus dans des cellules d'une grande importance médicale, comme par exemple les hybridomes ou les cellules CHO-dhfr<sup>-</sup> largement utilisées pour la préparation des produits pharmaceutiques recombinants. Une stratégie internationale de réglementation a été développée pour définir les critères d'acceptabilité des produits dérivés de telles cellules, basée sur les puissants moyens de purification des protéines qui existent aujourd'hui et sur les techniques d'inactivation virale.

Toutefois une vigilance extrême est nécessaire car le perfectionnement des techniques de détection virale nous réserve des surprises, comme la découverte récente d'une particule rétrovirale endogène, non infectieuse, présente dans les cultures primaires des cellules aviaires servant à la fabrication de certains vaccins viraux.

Comme j'ai déjà eu l'occasion de le mentionner, l'industrie des biotechnologies a accentué l'importance des bioréacteurs, pour les cellules animales, de grande capacité et qui sont exploités pendant plusieurs mois grâce à la technique de perfusion. Dans ces circonstances, une contamination virale, qui au départ est minimale, est amplifiée de manière considérable. De telles contaminations au cours de la fabrication d'un produit sont montrées dans le tableau 5.

**Tableau 5 – Contamination virale de cultures de tissus pendant la phase de fabrication.**

Virus	Cytopathogenicity 1)	Possible source	Material tested ; Product	Reported by
MVM (murine parvovirus)	Cytopathogenic	Medium	Unprocessed bulk r-DNA product	R. Garnik, Washington 1995
Human Rhinovirus (two events)	Non-cytopathogenic	Personnel	Unprocessed bulk human hepatitis A vaccine	PEI, batch release, 1995
BpyV (bovine polyomavirus)	?	FBS	12/20comm lots of FBS 2/14 live vet.vaccine	A.Keppler et al. : Biologicals in press
BVDV	Non-cytopathogenic (hum. lymphoblast, fibroblast cell culture)	FBS ?	Final product IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ (46 prep., 6 manufacturer)	R.Harasawa, T. Sasaki, Biologicals 23, 1995, 263-9
BVDV	Non-cytopathogenic	FBS ?	3 human vaccines (MMR, MR)	R. Harasawa - J. Clin. Microb., 1994, 1604-5
Bluetongue virus (Orbivirus)	?	?	Final product ? Vet. vaccine	D. O'Toole et al. : J. Amer. Vet. Med. Ass. 205, 1994, 407-8
EHDV (Epizootic Haemorrhagic Disease)	Cytopathogenic	FBS ?	CHO r-DNA	H. Rabeneau et al. : Biologicals 21, 1993, 207-14
BVDV	Non-cytopathogenic	Calf serum ?	Final product Live vet. Vaccines	HA. Kreeft et al. : Dt Tierärztl. Wochenschr. 97, 1990, 63-5
CPV (Canine parvovirus, wild strain)	Non-cytopathogenic	?	Live vet. Vaccines	M.Senda et al. : J. Clin. Microbiol. 33, 1995, 110-13
BVDV	Non-cytopathogenic	FBS ?	Final product 6 live vet. Vaccines	R.Harasawa - Vaccine 13, 1995, 100-3

Ces données montrent clairement que, dans la plupart des cas, le virus adventice a été introduit dans la fabrication par le sérum animal. Toutefois, dans le cas rapporté par Garnick (Development in Biological Standardization 1996, vol 88, p. 49) sur la contamination d'un bioréacteur par un parvovirus murin, le milieu de culture ne contenait aucun réactif d'origine animale. Les essais pour détecter le virus dans les matières premières sont restés négatifs car la contamination a probablement été induite par une très faible quantité de virus. L'origine de cette contamination n'a pas été élucidée, mais elle montre clairement, que même en l'absence de protéines, les réactifs utilisés dans la préparation des milieux peuvent introduire des virus.

Le deuxième cas est représenté par la contamination par un rhinovirus 14 des milieux de culture destinés à la fabrication du vaccin anti-hépatite A. Dans ce cas, l'origine de la contamination se trouvait chez l'opérateur, car le virus a été trouvé dans le milieu de culture avant qu'il ait été ajouté aux cellules.

Il résulte de ces deux cas que les virus non-enveloppés, du fait de leur résistance accrue aux agents physico-chimiques, présentent un risque important de contamination.

Pour finir, je voudrais vous présenter un tableau qui provient d'une publication de Bryan Mahy (Developments in Biological Standardization 1990, vol 75 pag 183) et qui montre la corrélation entre la contamination des animaux, dans ce cas des souris  $nu^+ nu^+$ , par le virus de la chorio-méningite-lymphocytaire (LCM) et sa présence dans les lignées cellulaires dérivées de ces animaux.

Dans le tableau 6 est montrée une contamination inhabituelle. Il s'agit de personnes qui, ayant manipulé des souris  $nu^+ nu^+$  et des cultures dérivées de ces animaux, ont développé ultérieurement une infection clinique par LCM.

Nous vivons un moment où nous assistons à une modification importante de l'écologie virale qui se manifeste par l'émergence de nouveaux virus. Cette émergence est le résultat de l'activité humaine et de son influence sur l'équilibre naturel des espèces.

**Tableau 6 – Isolation of LCM virus from animal tissues and cell lines.**

<b>Source</b>	<b>No. LCM isolates</b>	<b>Tumors tested</b>	<b>% +</b>	<b>Lines tested</b>	<b>% +</b>
Hamster (Rochester) . . . . .	22	28	79	11	100
Mice (Rochester) . . . . .	0	10	0	10	0
Hamsters (Southern Res. inst.) . .	4	13	31	7	29

Il est trop tôt pour évaluer l'impact spécifique des différentes contaminations de cultures cellulaires sur les techniques de transgénèse animale. La démarche actuelle de la biotechnologie consiste dans la difficulté de réaliser un mariage heureux avec la pharmacie. La bonne microbiologie et la sagesse apprise au cours des

dernières années, nous demandent de rester vigilants chaque fois qu'une technologie nouvelle, qui concerne le vivant, se met en place.

Je voudrais pour finir remercier Monsieur Thibier qui m'a fait l'honneur de m'inviter à cette réunion.



# Risque viral dans les produits biotechnologiques

Daniel LARZUL

Institut Pasteur, F-75724 Paris Cedex 15

## Résumé

Le risque viral associé à l'administration à l'homme d'un médicament issu des biotechnologies doit être considéré comme la résultante d'un grand nombre de paramètres.

L'origine humaine ou animale de certaines matières premières crée un risque viral dont l'importance est également modulée par la notion de barrière d'espèce et la voie d'administration du médicament à l'homme. Ce risque viral initial, précédemment défini, peut être réduit à trois niveaux différents afin d'arriver à un risque résiduel extrêmement faible.

Le premier niveau de réduction est porté par la sélection des matières premières selon des critères précis et une traçabilité rigoureuse.

Le second niveau dépend directement de la capacité du procédé de fabrication du médicament à éliminer et/ou inactiver une charge virale potentielle. Cette capacité peut-être évaluée en laboratoire au cours d'expériences de surcharge virale.

Le troisième niveau de sécurisation consiste en un contrôle des produits finis au cours de tests virologiques généralement *in vitro*.

L'évaluation du risque viral résiduel prend donc la forme d'une analyse détaillée de chacun de ces paramètres.

## INTRODUCTION

La sécurité virale des médicaments à usage humain peut être évaluée selon l'approche détaillée ci-dessous.

Tout d'abord, le risque viral initial doit être quantifié, au moins théoriquement et ce paramètre dépend essentiellement de :

- 1) l'origine biologique du matériel biologique initial : banque de cellules, tissu ou fluide d'origine animale/humaine ;
- 2) la barrière d'espèce ;
- 3) la capacité d'un contaminant éventuel de se répliquer au cours du procédé de fabrication ;
- 4) la voie d'administration chez l'homme, par exemple la voie orale, parentérale, etc.

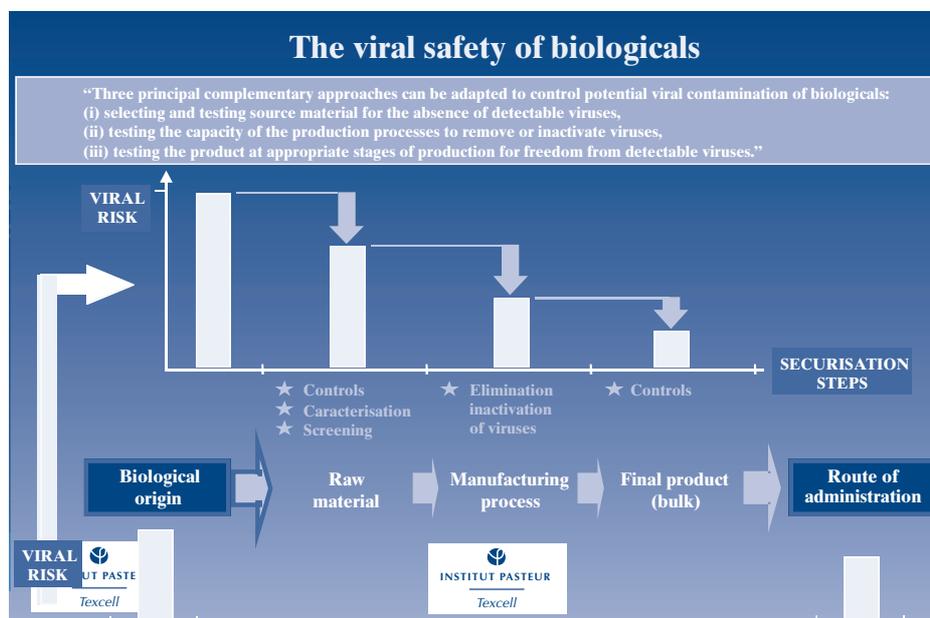


Figure 1

En tenant compte du risque viral initial, il existe trois niveaux indépendants permettant de sécuriser le produit final (figure 1).

Le premier niveau consiste à tester systématiquement la matière première d'origine biologique. A titre d'exemple, le plasma humain est testé contre un grand nombre de virus avant d'être utilisé comme matériel de base dans la production de dérivés du sang. Quand il s'agit de tissus ou fluides animaux, l'examen du matériel de base consiste généralement en la constitution d'un dossier vétérinaire complet comprenant en particulier les contrôles réguliers des animaux, la traçabilité et leur prophylaxie. Pour les protéines recombinantes ou les anticorps monoclonaux, les banques de cellules doivent être évaluées quant à leur absence de virus contaminants dans un grand nombre de système de tests *in vitro* et *in vivo*.

Le second niveau correspond à la capacité des procédés de fabrication à éliminer et inactiver les virus en général. Une telle évaluation quantitative peut être effectuée en réalisant les essais de surcharge avec des virus connus.

Le troisième niveau est un contrôle du produit final à l'aide de tests de screening similaires à ceux mis en œuvre au cours du niveau un.

On peut noter que les deux premiers niveaux de réduction du risque viral initial sont généralement suffisants pour que l'on puisse affirmer que le risque résiduel est acceptable pour une utilisation chez l'homme. Si ce n'est pas le cas, un test de screening complémentaire sur le produit final (troisième voie) peut être utilisé comme outil supplémentaire.

La deuxième partie de cette présentation traitera du second niveau, c'est-à-dire de l'évaluation du procédé de fabrication quant à sa capacité à éliminer et/ou inactiver les virus.

## LA VALIDATION VIRALE DU PROCÉDÉ DE FABRICATION

Une expérience de surcharge consiste en l'addition d'un virus connu dans un produit intermédiaire qui sera soumis à une étape de fabrication susceptible de l'inactiver et/ou de l'éliminer (figure 2).

Pour chaque virus utilisé et pour une étape définie, un facteur de réduction en log décimal peut être calculé (exemple : charge virale ajoutée =  $10^7$  ; charge virale retrouvée après le procédé =  $10^2$  ; donc la réduction d'un facteur  $R = 5 \log_{10}$ ).

Chaque essai de surcharge est indépendant. Si trois étapes du procédé et cinq virus sont retenus pour l'évaluation, un total de trente expériences indépendantes de surcharge seront effectuées, puisque chaque évaluation est réalisée en double.

## LE CHOIX DES VIRUS

Selon les textes réglementaires de l'Union Européenne, « *le but de la validation virale est de prouver que le procédé de production inactive/élimine efficacement les virus qui sont connus, soit pour contaminer le matériel initial, soit qui pourrait le faire, mais aussi la contamination de virus nouveaux ou imprévisibles* »... « *Les virus utilisés pour la validation doivent être*

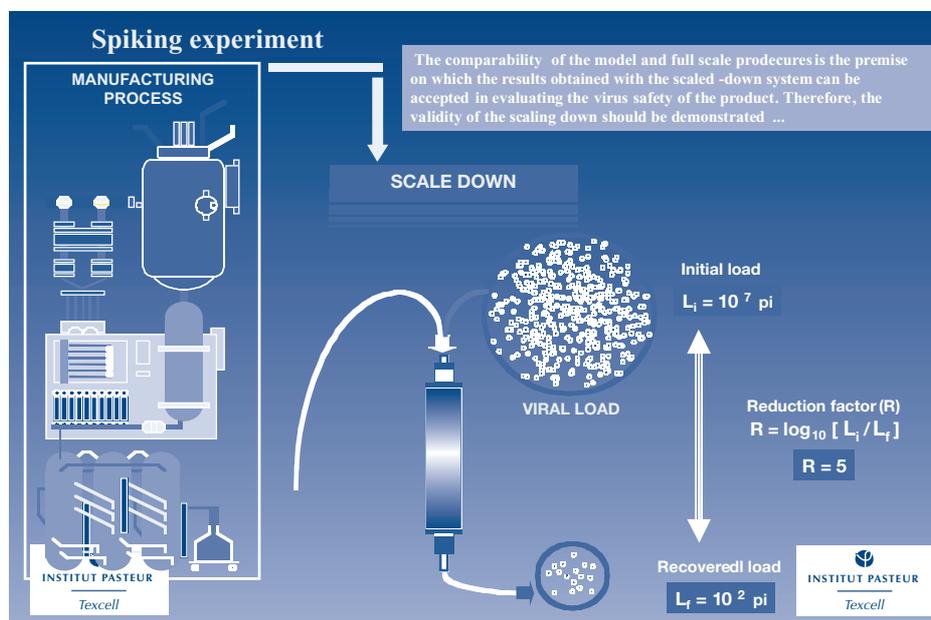
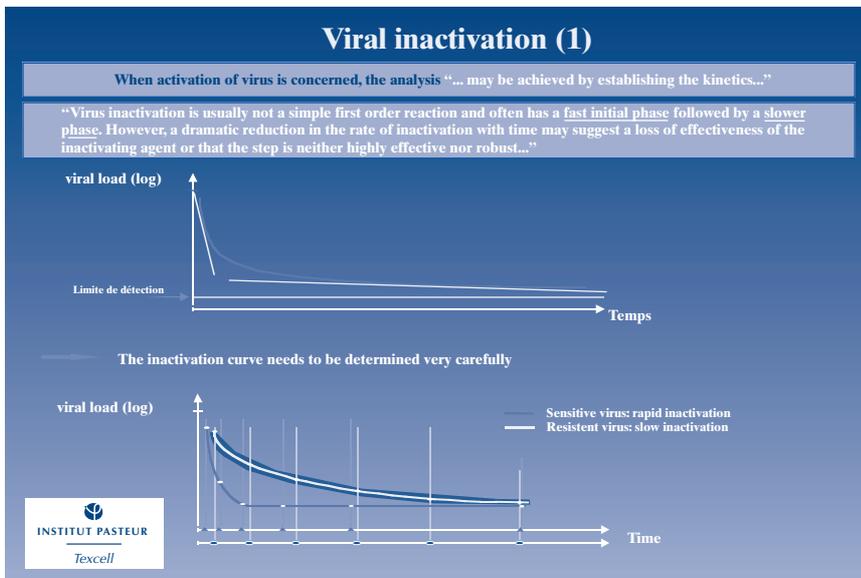


Figure 2

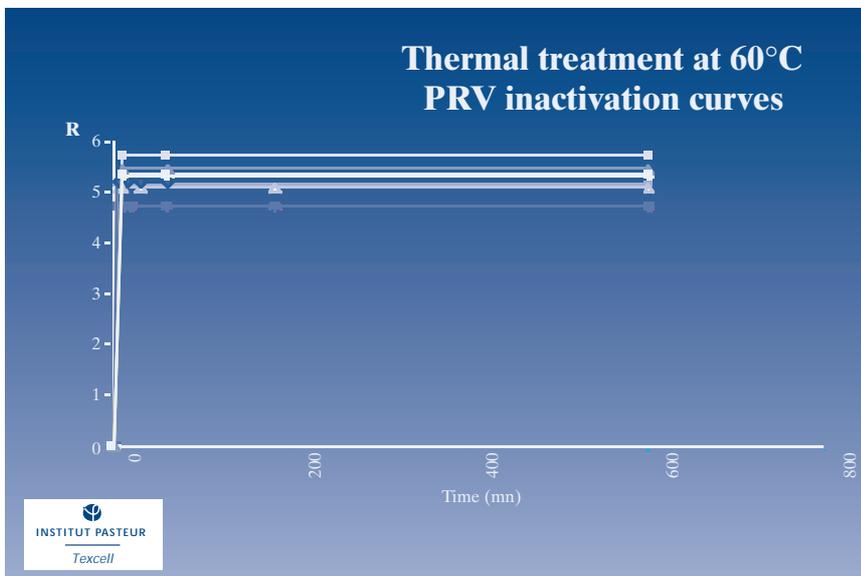




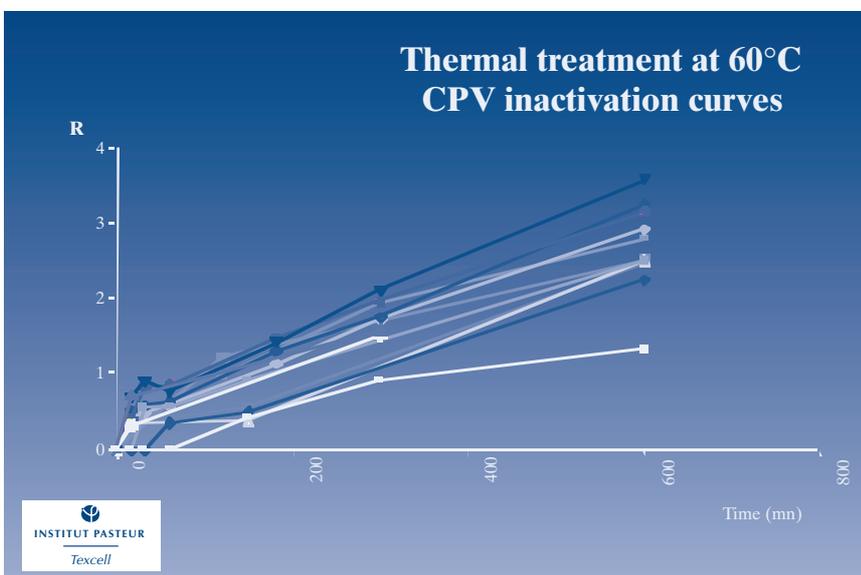
## RÉSULTATS

Les figures 5 et 6 montrent des courbes d'inactivation obtenues pendant une pasteurisation à 60° C pendant 10 heures. On peut observer que les virus sensibles (tel le PRV) sont fortement réduits de façon très précoce (< 20 minutes), tandis que les virus hautement résistants (tel le CPV) sont partiellement inactivés (2-3 log<sub>10</sub>) après 10 heures.

**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

# La manipulation des génomes peut-elle conduire à la réactivation de pathogènes endogènes ? <sup>1</sup>

Thierry HEIDMANN

UMR 1573 CNRS - Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, F- 94800 Villejuif

## Résumé

Il est clair que la manipulation des génomes peut conduire à des mutations ainsi qu'à des altérations de l'expression de gènes. Il a ainsi été estimé que 5 % des lignées de souris transgéniques sont porteuses de mutations par insertion.

Cette manipulation peut conduire à l'expression de gènes jusqu'alors silencieux, qui eux-mêmes sont susceptibles d'activer ou de réprimer des gènes résidants. Parmi les gènes dont l'activation peut être relativement mutagène, on peut citer les éléments transposables et les rétrovirus endogènes.

Ces éléments sont très nombreux dans les génomes mammifères (près de 10 % du génome) mais la plupart d'entre eux sont défectifs et silencieux. Ils ne sont cependant pas tous définitivement « morts », et des phénomènes d'activation massive et de mutagenèse subséquente peuvent être observés dans de nombreux cas.

Un certain nombre de ces éléments produisent des particules de type rétroviral, souvent strictement intracellulaires, et peu de cas ont été rapportés de rétrovirus endogènes capables de générer des particules virales véritablement infectieuses. Cependant, on ne peut ignorer un certain nombre de données expérimentales indiscutables, faisant état de la capacité de rétrovirus endogènes de souris, de singe ou de porc d'infecter des cellules humaines en culture.

Cette dernière donnée est d'ailleurs considérée avec grande attention dans le cadre de tentatives de xéno-greffes chez l'homme. Nous rappellerons également que l'introduction de séquences nucléotidiques — pas nécessairement codantes — dans un génome peut provoquer des « perturbations » épigénétiques dans plusieurs systèmes animaux « modèles ». Ainsi par exemple les phénomènes de cosuppression induits par l'introduction d'un simple fragment de gène, qui se traduisent par l'extinction des gènes résidants possédant une certaine homologie avec les séquences introduites.

Il sera aussi rappelé que des molécules d'ARNs semblent extrêmement efficaces pour induire cette régulation, et l'effet de l'ingestion de bactéries productrices de telles molécules par *Caenorhabditis elegans* sera présenté. Il va de soi que ces données — de type fondamental- ne peuvent servir que de base de réflexion pour l'estimation d'un risque éventuel lié à la consommation d'organismes génétiquement manipulés, et qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée sérieuse faisant référence à une quelconque pathologie associée.

## INTRODUCTION

Je voudrais vous apporter la vision un peu formelle et théorique d'un chercheur fondamentaliste sur le problème qui nous intéresse aujourd'hui, en vous indiquant un certain nombre de pistes, de domaines d'investigation, par lesquels on pourrait concevoir que la manipulation des génomes puisse avoir des effets sur les organismes consommateurs des animaux qui ont été manipulés.

Je voudrais vous préciser tout de suite que ce que je vais vous exposer ne fait que peu référence à des études sur l'homme, avec en géné-

ral des études menées chez la souris, qui constitue sans doute un bon modèle mammifère, et même des organismes beaucoup plus simples comme la drosophile et le nématode.

Donc comme vous le voyez des études et résultats encore très éloignés de ce qui nous intéresse aujourd'hui, mais quand même possiblement informatifs.

## 1. LA MUTAGENÈSE D'INSERTION

Une première conséquence possible de la manipulation des génomes, en particulier de la

1. Texte issu de la transcription de l'exposé oral revu par l'auteur.

transgénèse, est de produire, comme on vous l'a déjà dit tout à l'heure, de la mutagenèse d'insertion. Cette mutagenèse d'insertion est assez importante puisque chez la souris, on estime qu'un peu plus de 5 % des expériences de transgénèse conduisent à des mutations dont un certain nombre en fait sont létales à l'état homozygote, mais pas toutes. De fait, la transgénèse et la micro-injection sont des méthodes utilisées dans un certain nombre de cas pour, précisément, identifier des gènes nouveaux et caractériser leur fonction en les mutant.

Cette liste (tableau 1)<sup>2</sup> est, bien évidemment, non exhaustive, et est placée là pour montrer les différents types de mutagenèses associées à la manipulation des génomes. Des mutations peuvent être induites par l'insertion d'un ADN étranger dans les génomes mais également par l'infection directe, par exemple d'embryons à des stades très précoces, par des rétrovirus qui ont la capacité, eux aussi, de produire de la mutagenèse d'insertion, simplement en s'insérant de manière aléatoire dans le génome.

Ce tableau permet également de faire apparaître et d'introduire les rétrovirus endogènes évoqués précédemment. Un certain nombre de mutations, ici listées sur cette table, sont dues à l'activation et à l'insertion de rétrovirus endogènes de la souris qui se sont activés et qui sont venus s'insérer dans de nouveaux locus du génome souris.

## 2. LES RÉTROVIRUS ENDOGÈNES

Qu'est-ce qu'un rétrovirus endogène ? C'est un objet qui a vraiment une réalité.

Il s'agit (sur l'image projetée sur l'écran) de particules d'un rétrovirus endogène de la souris appelé particules IAP. Ce sont des particules très proches de la structure des rétrovirus, qui font 50 à 100 nanomètres de diamètre. Elles sont strictement intracellulaires et sont ici exprimées, comme vous le voyez, dans des cellules tumorales comme c'est souvent le cas dans les cellules de mammifères.

Ce type de particules existe également chez l'homme. Ici il s'agit d'un cliché (photo montrée sur l'écran) de cellules de tumeur germinale humaine. Vous voyez également des formes de particules de type viral. Ces particules sont en fait codées par des véritables gènes qui ont la structure de **provirus**, c'est-à-dire qui ont la structure que prennent précisément les rétrovirus lorsqu'ils s'intègrent dans

un génome. Ce sont des structures de 5 à 10 kilobases de long qui codent pour des gènes GAG, POL et ENV nécessaires à la formation des particules virales. Ces structures sont souvent extrêmement proches des structures des vrais virus infectieux, des rétrovirus classiques comme HIV, certaines mêmes sont effectivement assez complexes et codent même pour des petites protéines régulatrices, ici la protéine cORF qui a des homologies avec les protéines Tat et Rex des rétrovirus HTLV et HIV.

La diapositive suivante présente une analyse phylogénétique qui permet de placer un certain nombre de rétrovirus endogènes, dans le cas présent les rétrovirus endogènes humains, appelés HERV, au sein de la famille très multiple et variée des rétrovirus infectieux des vertébrés, qui peuvent se regrouper en trois grandes classes de rétrovirus : les oncovirus, les lentivirus avec HIV en particulier, et les foamyvirus.

Cette analyse phylogénétique fait apparaître, que dans la plupart des cas, sauf précisément dans celui des lentivirus, il existe des liens phylogénétiques importants entre des rétrovirus endogènes humains, c'est vrai aussi pour d'autres espèces, et des virus vrais au sens classique du terme, c'est-à-dire des rétrovirus infectieux exogènes.

## 3. LIENS ENTRE RÉTROVIRUS ENDOGÈNES ET EXOGENES

Quel est, en fait, le lien entre ces deux types d'objets biologiques, donc les rétrovirus endogènes et les rétrovirus infectieux exogènes ? Le lien est très fort en réalité. Le schéma qui est le plus vraisemblable est le suivant : c'est celui dans lequel en fait il existerait une sorte d'équilibre, ou de transfert continu, entre ce que l'on appelle les rétrovirus endogènes qui font donc partie du patrimoine génétique des animaux et des individus au sein d'une espèce définie et sont de véritables gènes endogènes, et les rétrovirus exogènes.

L'idée, en fait, c'est que les rétrovirus endogènes seraient en réalité le reliquat d'infections anciennes par des rétrovirus qui ont été exogènes et infectieux. Ces infections peuvent être extrêmement anciennes, et elles peuvent être datées dans un certain nombre de cas en analysant le contenu génomique des différentes espèces. Certaines infections datent de 40 millions d'années, mais d'autres sont beaucoup plus récentes. Les rétrovirus endogènes, reliquat d'infections anciennes, sont maintenant retrouvés dans les génomes en tant que gènes et hérités de manière mendélienne.

2. Tableaux non fournis par l'auteur.

Les rétrovirus endogènes, à l'inverse, constituent sans doute le réservoir permanent pour la formation de nouveaux virus, de virus exogènes infectieux, soit par des mécanismes de recombinaison qui permettent à partir de différentes séquences rétrovirales contenues dans les génomes, de générer de nouveaux virus qui auront la capacité d'être infectieux, de sortir des cellules et d'infecter des cellules voisines ou même des espèces voisines, soit, encore plus simplement, par la réactivation pure et simple de séquences rétrovirales endogènes qui sont directement infectieuses. C'est le cas d'un certain nombre de rétrovirus de la souris.

Ce tableau (tableau 2) montre la liste d'une partie des rétrovirus endogènes connus dans différentes espèces animales. Le nombre de copies de chacun de ces éléments est indiqué dans chacun des génomes, il varie de quelques copies à quelques centaines, voire quelques milliers de copies dans un génome donné.

Parmi l'ensemble de ces rétrovirus endogènes, un certain nombre sont effectivement capables, bien qu'ils soient endogènes, de devenir exogènes et infectieux. Un exemple classique est le virus MLV de la souris, qui est capable, surtout chez les souris âgées d'une certaine souche, de s'activer transcriptionnellement et de produire de véritables particules, la souris devenant alors virémique avec l'âge. Le fait qu'elle le devienne, fait qu'elle développe des tumeurs, des leucémies.

Un autre virus du même type est le virus MMTV de la souris qui est aussi activé transcriptionnellement et qui est capable de faire des particules infectieuses qui vont passer éventuellement dans le lait vers les souriceaux et qui est capable de produire, lui, des tumeurs mammaires.

Même chose pour un élément qui n'est pas sur cette liste. Il s'agit d'un virus endogène de porc, PERV, dont on a déjà parlé tout à l'heure. Il existe, en effet, chez le porc des rétrovirus endogènes dont il a été montré qu'ils étaient capables d'infecter, au moins *in vitro*, des cellules humaines en culture. Cela pose un problème considérable dans le cas des xénogreffes, bien entendu, puisqu'il est hors de question de laisser des virus porcins infecter et éventuellement se répliquer dans des cellules humaines.

#### 4. LE CONTRÔLE DES VIRUS ENDOGÈNES

Il est clair que cette vision serait apocalyptique si je n'ajoutais la donnée fondamentale suivante : les rétrovirus endogènes sont **extraordi-**

**nairement bien contrôlés et réprimés** dans un organisme, dans les conditions naturelles. Il existe en effet tout un système de régulations qui permet d'éteindre transcriptionnellement ces structures rétrovirales endogènes. La question qui se pose est de comprendre quels sont les mécanismes capables de « dompter » ces éléments et, déjà, d'essayer de comprendre quel est le statut de ces rétrovirus endogènes *in vivo*.

On peut répondre très simplement à cette question, par exemple dans le cas de la souris, en utilisant le rétrovirus endogène IAP murin décrit précédemment, et en le marquant avec un gène rapporteur qui va permettre la détection de son activité *in situ*. Le résultat de l'analyse, une fois que l'on a introduit cela dans des souris transgéniques, est très simple (diapositive ; Dupressoir *et al.*, 1996) : l'expression de ce rétrovirus endogène est complètement restreinte à la lignée germinale. Les cellules où ces séquences s'expriment sont les cellules germinales souches, indifférenciées, de la lignée germinale mâle. On arrive donc à une situation où il y a une répression complète (dans les situations naturelles, j'insiste encore une fois sur ce point, pas dans les tumeurs) de l'expression de ces structures dans les tissus somatiques, et il y a une petite fenêtre d'expression, très restreinte, dans la lignée germinale à certains stades du développement de ces cellules.

Au niveau évolutif, il y a une logique à cela car il est évident qu'une activation dans la lignée germinale est intéressante au niveau des espèces, car elle va permettre de générer par mutagenèse insertionnelle des variants susceptibles d'être sélectionnés, alors qu'une mutagenèse par transposition ou par activation des séquences dans des cellules somatiques pourrait être délétère, et c'est peut-être bien ce qui se passe dans les tumeurs.

Le problème est donc de savoir comment ces séquences sont contrôlées et réprimées aussi fortement dans les organismes vivants.

Un premier élément de réponse, mais qui n'est qu'un élément de réponse, est le niveau de méthylation. Ces séquences sont fortement méthylées et une expérience réalisée par le groupe de Bestor (diapositive ; Walsh *et al.*, 1998) permet d'illustrer assez simplement ce fait. Il a généré des souris knock-out pour un gène qui est celui de la méthyl-transférase responsable de la méthylation des séquences CpG. Dans cette souris knock-out, il a examiné le statut des séquences IAP. Le résultat est simple : il y a explosion de l'expression des séquences IAP, dans tous les tissus de l'embryon (la mutation est létale à des stades plus tardifs).

Un premier contrôle intervient donc au niveau de gènes qui sont impliqués dans la méthylation, mais en fait la situation est beaucoup plus complexe que cela et les mécanismes ne sont pas connus pour l'instant. Il existe très certainement dans les organismes vivants toute une série de gènes impliqués, non pas simplement dans le contrôle de l'état de méthylation, mais plus généralement dans celui de l'état de la chromatine. En fait, ce qui contrôle l'expression des gènes, c'est l'état de la chromatine et la méthylation ne fait que stabiliser, en quelque sorte, le niveau de compaction de la chromatine. Dans une chromatine compacte, les gènes ne sont pas exprimés, dans une chromatine relâchée ils le sont.

La question fondamentale est de pouvoir identifier ces gènes, ce n'est pas chose faite, de telle manière en fait que toutes expériences de transgénèse ou de manipulation des génomes ne touchent pas à l'un quelconque de ces gènes de régulation, dont la dérégulation pourrait être dramatique pour le niveau d'expression non seulement des gènes « normaux » d'une cellule, mais également des rétrovirus endogènes.

La cellule a mis au point un système de contrôle extrêmement puissant qui touche en particulier les séquences répétées. Ce mécanisme de répression s'appelle **la co-suppression**. C'est un système qui permet de repérer toutes séquences étrangères présentes en copie répétée dans un génome. Or, les rétrovirus sont précisément des objets biologiques qui sont capables d'entrer dans une cellule et de se répliquer à l'intérieur de celle-ci et de s'y retrouver en copie multiple.

Ce phénomène de contrôle, par la cellule, des séquences répétées permet l'extinction, le domptage de ces séquences répétées. Il peut être suivi, en quelque sorte en direct dans le laboratoire, chez la drosophile dont les temps de génération sont extrêmement courts, deux à trois semaines. Ce qui a été fait dans ce type d'expérience (diapositive ; Jensen *et al.*, 1999), c'est introduire dans des drosophiles à qui il manque un rétrovirus endogène défini, précisément ce rétrovirus endogène, par transgénèse. Quand vous faites cela, il se passe des catastrophes. Il y a des phénomènes d'invasion du génome de la drosophile par l'élément, qui se met à bouger à toute vitesse et induit une quantité de mutations énorme, à tel point d'ailleurs que les embryons issus de ces individus ne se développent plus. Il y a une létalité embryonnaire extrêmement forte, c'est ce que l'on appelle la dysgénèse des hybrides.

Avec le temps, va s'établir un phénomène de **répression**, c'est-à-dire que les éléments intro-

duits par transgénèse vont s'éteindre (diapositive ; même référence). Les phénomènes peuvent être extrêmement rapides, quelques générations, mais ils peuvent mettre aussi beaucoup de temps, c'est un paramètre qu'il faut garder en tête dans toutes les expériences qui nous concernent aujourd'hui. Dans certains cas, il faut en effet près de 50 générations pour avoir une répression de l'activité de ces éléments rétroviraux endogènes introduits. Des gènes, pour l'instant non-caractérisés, sont donc capables de contrôler les séquences répétées.

Dans le même ordre d'idée, une expérience intéressante qui mérite d'être mentionnée (diapositive ; Remus *et al.*, 1999) est celle où il a été montré que l'insertion d'un ADN étranger, cette fois-ci pas d'une séquence rétrovirale mais d'un ADN de phage lambda, dans une cellule de mammifère, est capable, par un mécanisme totalement inconnu, d'altérer le niveau de méthylation de gènes de la cellule de mammifère. Plus particulièrement, il a été montré que l'insertion de cette séquence étrangère est capable de démétyler les séquences IAP dont je vous ai parlé, donc d'activer finalement ces rétrovirus endogènes de la souris.

Vous comprenez l'importance de cette expérience puisque elle démontre que la simple introduction d'un ADN étranger dans une cellule a des effets importants sur le niveau d'expression des rétrovirus endogènes de cette cellule.

## 5. TRANSFERTS ÉVENTUELS D'AGENTS PATHOGÈNES PAR LES ALIMENTS

Jusqu'à présent, nous n'avons pas abordé le problème majeur, à mon sens, de cette réunion qui est celui du transfert d'éventuels pathogènes par les aliments, transfert à partir des aliments issus d'un animal manipulé génétiquement à l'homme. C'est un problème auquel je ne peux pas répondre de manière simple. Je vais donc poser deux questions plus simples qui sont celles du problème du transfert des protéines et du transfert des acides nucléiques. Un virus est l'ensemble des deux, et on peut donc estimer que c'est une première approche de la question, à laquelle je ne peux pas répondre pour l'instant.

Le problème est donc celui du transfert par l'alimentation de pathogènes éventuels.

### Transfert de protéines

On sait qu'il y a des transferts de protéines, nul n'ignore le problème des prions qui nous inci-

tent à la plus grande modestie et à la plus grande méfiance quant aux prédictions que nous sommes capables de faire.

### Transfert d'acides nucléiques

Quant aux problèmes des acides nucléiques, il y a deux types de transferts possibles : transfert d'ADN et transfert d'ARN (deux diapositives).

C'est un document qui date de 1997 où il a été montré (je ne rentrerai pas dans les détails de l'expérience) que l'ingestion par des souris, donc par la voie orale, d'ADN étranger (ADN nu de phage) conduisait à la récupération de cet ADN de phage dans un certain nombre de cellules de la souris, pas simplement sous forme épisomique, mais également sous forme intégrée dans son génome (diapositive ; Schubbert *et al.*, 1997). C'est peut-être pour l'instant anecdotique car il n'y a pas de données statistiques fortes sur la fréquence de l'événement, sur le nombre de cellules touchées, mais c'est un point qu'il faut garder en mémoire pour n'importe quelle expérience de transgénèse ou de manipulation.

Le document suivant (diapositive ; Timmons et Fire, 1998 ; Tabara *et al.*, 1998) fait état du transfert de molécules d'ARN, plus exactement de molécules d'ARN double-brin, à partir d'une bactérie qui les produit, à ce nématode (une sorte de ver de terre) qui mange la bactérie. Sans pouvoir entrer dans les détails de l'expérience, une bactérie a été manipulée pour produire un ARN double brin homologue d'un gène endogène du nématode. Si le nématode mange la bactérie en question, il va y avoir extinction du gène homologue à l'ARN double-brin produit par la bactérie-aliment. Ce passage, *via* l'alimentation, d'un effet biologique (l'extinction du gène résidant du nématode, extinction par ailleurs liée au processus de co-suppression décrit précédemment), est une illustration inattendue des possibilités de transfert par l'alimentation.

Le point intéressant est que ce phénomène intervient non seulement au niveau de la première génération mais se maintient dans la descendance du nématode. Ce phénomène peut perdurer un certain temps, il est extrêmement

efficace car il suffit de très peu de molécules d'ARN double brin pour produire l'effet.

### CONCLUSION

Compte tenu de l'état des connaissances, il est évidemment difficile de conclure. Ce que je peux dire c'est qu'il faut prendre garde, et on peut énoncer quelques « *caveats* » assez basiques qui permettent de rappeler les données présentées dans cet exposé. Il est évident qu'il faut faire très attention à la nature des séquences que l'on va transférer, il est hors de question de transférer un ADN qui contiendrait un rétrovirus endogène fonctionnel. Quand on sait que les rétrovirus endogènes occupent plusieurs pourcentages du génome en masse, il est clair que si on introduit dans un organisme plusieurs kilobases d'ADN pris au hasard, il y a une probabilité non nulle d'injecter sans le savoir un rétrovirus endogène.

La mutagenèse d'insertion, par exemple par la transgénèse, est un problème critique car elle peut activer ou inactiver des gènes : il serait maladroit d'activer un gène de prion ou d'autres gènes toxiques. Quant aux effets induits, il est important de s'assurer que l'on ne touche pas aux gènes, encore mal identifiés, qui contrôlent l'intégrité du génome, c'est-à-dire les gènes qui sont impliqués dans la structure de la chromatine, le maintien des séquences répétées dans un état non transcrit et de structure chromatienne fermée, qui contrôlent le niveau de méthylation, etc.

Dans les conditions d'élevage des animaux manipulés, la pression de sélection est sans doute beaucoup moins forte que celle intervenant dans les conditions naturelles. Par ailleurs, il y a un facteur dont il faut tenir compte, c'est le phénomène cinétique. Dans l'expérience décrite précédemment où l'on introduisait un rétrovirus endogène dans une drosophile « vierge » de cet élément, dans certains cas il faut 50 générations pour voir les effets de stabilisation s'établir. Clairement, l'introduction d'un corps étranger, d'un génome étranger, d'un ARN étranger, dans un organisme vivant peut mettre un certain nombre de générations à se manifester, et c'est un point dont il faut se souvenir.

**RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA CONFÉRENCE ET LA DISCUSSION**

- Dupressoir A. and Heidmann T. (1996) Germ Line-Specific Expression of Intracisternal A-Particle Retrotransposons in Transgenic Mice. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4495-4503.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. and Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Grindley T. (1991) Insertional versus targeted mutagenesis in mice. *The New Biologist* 3, 1025-1034.
- Jensen S., Gassama M.-P. and Heidmann T. (1999) Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nature Genet.* 21, 209-212.
- Löwer R., Löwer J. and Kurth R. (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5177-5184.
- Meisler M.H. (1992) Insertional mutation of classical and novel genes in transgenic mice. *Trends in Genetics* 8, 341-344.
- O'Neill R.J.W., O'Neill M.J. and Graves J.A.M. (1998) Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodeling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* 393, 68-72.
- Remus R., Kämmer C., Heller H., Schmitz B., Schell G. and Doerfler W. (1999) Insertion of Foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J. Virol.* 73, 1010-1022.
- Schubbert R., Renz D., Schmitz B. and Doerfler W. (1997) Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 961-966.
- Tabara H., Grishok A. and Mello C.C. (1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282, 430-431.
- Timmons L. and Fire A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Walsh C.P., Chaillet J.R. and Bestor T.H. (1998) Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genetics* 20, 116-117.
-

## DISCUSSION DE LA TROISIÈME SESSION

### a) Risques microbiologiques

**Ambroise Martin** — Cette première partie de la troisième session était particulièrement équilibrée, puisque nous avons eu deux exposés plutôt rassurants et deux exposés plus inquiétants. Si l'aspect macroscopique présenté par le Professeur M. Eloit semble indiquer la présence de mécanismes protecteurs au niveau de l'animal entier, les connaissances que l'on a maintenant au niveau cellulaire et moléculaire, présentées par MM. Horaud et Heidman, conduisent à bon nombre de questions. Qui souhaite s'exprimer ?

**Bernard Guérin** — J'adresserai mon premier commentaire à M. Horaud car lorsqu'il a fait cet exposé plein d'expérience qui a abouti à lister un nombre de risques incalculable, j'ai regretté qu'il n'ait pas également ouvert sur une des caractéristiques de son savoir. Autrefois, à l'Institut Pasteur de Paris, par son savoir, il m'a donné la possibilité de manipuler les cultures cellulaires sans avoir de problèmes ni de bactéries ni de virus ni de champignons.

Aujourd'hui, dans le cadre de la culture cellulaire, je suis en relation avec tous les laboratoires vétérinaire français, où il existe un cahier des charges relativement à la manipulation de ces cultures cellulaires qui implique justement des contrôles afin que ces cultures soient manipulées dans les meilleures conditions.

On peut donc utiliser toute cette expérience des risques auxquels on peut être confronté en donnant une liste de précautions à appliquer qui permettront de manipuler ces cultures cellulaires dans des conditions extrêmement satisfaisantes. Je voudrais également signaler qu'à ce jour, la tendance est de ne plus utiliser les cultures cellulaires pour co-cultiver les embryons. C'est un élément important à considérer car nous sommes maintenant dans le présent et non plus dans le passé, il faut considérer la maîtrise technique du présent et non pas les problèmes du passé.

Ma deuxième remarque concerne également M. Horaud au sujet des acides aminés d'origine animale qui étaient jusqu'à ce jour utilisés pour fabriquer les milieux de culture. Là encore et dans le milieu vétérinaire pour les biotechnologies de la reproduction qui nous intéressent, c'est le passé. Maintenant nous travaillons avec des milieux de cultures constitués d'acides aminés 100 % d'origine végétale.

J'aurai, enfin, une question adressée à tous les conférenciers.

Je souhaiterais qu'ils nous précisent si, à leur connaissance, il y a un exemple d'intégration du génome d'un rétrovirus animal dans les gamètes ? Les biotechnologies sont une chose, on associe le gamète mâle et le gamète femelle, puis on pense éventuellement à un danger de transmission. Faut-il encore qu'il y ait un rétrovirus dans les gamètes. Y a-t-il isolement ou non, une expérience de présence de génome viral, de rétrovirus animaux dans les gamètes ?

**Florian Horaud** — On se trouve dans la biotechnologie avec des situations nouvelles qui n'étaient pas prévisibles.

A l'agence européenne du médicament à Londres, il me semble qu'en France également, nous avons essayé d'avoir une transparence sur la source des acides aminés, nous avons appris des choses pas très rassurantes.

Les acides aminés dans le cadre de ces cultures sont désormais d'origine végétale, en grande partie obtenus par fermentation bactérienne mais transportés dans des containers dans les cales de bateau et c'est là que s'est produit la contamination, la seule possibilité est qu'une souris ait mangé de la glutamine, c'est imprévisible. Cela s'est produit au cours d'une amplification de ferment. Même chose avec le rhinovirus A ou si vous avez des cahiers des charges. Je ne voulais pas décourager les gens mais attirer leur attention sur le fait qu'il faut rester très vigilant en matière de contaminations virales.

Après tout ce que l'on a cumulé : la transmission HIV, l'hépatite A, la nouvelle variante de BSE, nous étions calmes et rassurés, pourtant un événement malheureux est arrivé. La moralité à en tirer est d'être prudent, de bien observer autour et ainsi naturellement aboutir à un succès parfait.

**Thierry Heidmann** — Tout d'abord une incidente sur les acides aminés, maintenant produits à partir des plantes : il y a aussi des rétrovirus endogènes et des virus chez les plantes !

Pour revenir à la question, il est clair qu'au sein d'une espèce donnée, il existe une certaine variabilité de la position et du nombre des rétrovirus endogènes. Les rétrovirus endogènes de la souris sont donc capables de bouger, et chez l'homme c'est la même chose. En général on les détecte car cela produit une mutation génétique germinale, comme par exemple une anomalie de coloration du poil chez la souris ou une hémophilie A chez l'homme.

Dans ce dernier cas, il a en effet pu être montré, par l'analyse des arbres généalogiques, que l'apparition de l'hémophilie A était liée à l'insertion *de novo* d'un rétroélément dans le gène du facteur 8 dans la cellule germinale d'un grand-parent parfaitement identifié. Donc au sein d'une espèce donnée, il y a des mouvements internes de séquences déjà présentes. Ces séquences sont d'ailleurs présentes en grand nombre puisqu'elles représentent près de 10 % du génome dans chaque espèce.

Maintenant, y a-t-il le passage inter-espèces ? Il est difficile de le savoir, mais nous avons des témoignages qu'il y en a eu.

**Bernard Guérin** — Pas seulement inter-espèces. Y a-t-il des exemples d'intégration chez les animaux dans les gamètes ?

**Thierry Heidmann** — Si on fait des analyses phylogénétiques de ce qu'il y a dans les gamètes de différentes espèces, on peut en déduire qu'il y a eu des transferts horizontaux, entre espèces, de séquences de type rétroviral. Ces événements ont eu lieu dans le passé, et on en a la trace aujourd'hui ; on sait que telle ou telle séquence de type rétroviral trouvée chez l'homme est probablement issue d'un transfert à partir de telle autre espèce. Cela est vrai pour un grand nombre de rétroéléments ou, plus généralement, d'éléments transposables. Nous n'avons aucune estimation réelle de la fréquence exacte de ces événements. Elle est vraisemblablement très faible puisque l'on peut quand même, au sein d'une espèce donnée, arriver à identifier un ensemble de séquences rétrovirales endogènes que l'on peut qualifier d'humaine, d'aviaire ou de murine. Il n'y a donc pas de passage permanent et brassage des séquences rétrovirales entre les espèces.

**Brigitte Le Guenne** — Ce n'est pas une question mais une précision par rapport à l'intervention de M. Horaud concernant les PMA. Comme mes collègues de FIV humaine ne sont pas présents dans la salle, il y a une lettre du Ministre de la santé qui interdit absolument à toutes les équipes de FIV humaine en France d'utiliser des produits d'origine animale. Cela signifie que le sérum de fœtus est proscrit et que les co-cultures sont également interdites. La seule possibilité pour une équipe de FIV humaine, si elle souhaite utiliser la co-culture, est de prendre les propres cellules de la patiente.

**Florian Horaud** — Je suis au courant.

**Brigitte Le Guenne** — Comme vous nous avez parlé de co-culture sur des cellules de souris..., il est bon qu'il n'y ait aucune ambiguïté.

**Florian Horaud** — Quand on se lance dans une approche nouvelle, il faut bien réfléchir à ce que l'on fait. Bien sûr, que la co-culture est terminée et c'est nous, lorsque nous avons été saisis pour cela, qui avons fait le nécessaire pour arrêter. Néanmoins, les gens se sont lancés dans cela sans trop réfléchir à ce qu'ils allaient faire. Lorsque j'ai discuté avec une personne qui était parfaitement de bonne foi, et que je lui ai demandé d'où viennent les cellules qui servent en co-culture, elle m'a répondu que c'était un de ses techniciens qui les avait rapportées de Villejuif !..

**Michel Thibier** — Un commentaire sur les exposés de MM. Horaud et Larzul, puis une question à M. Heidmann. Le commentaire est le suivant : dans nos biotechnologies de la reproduction, il n'en a pas encore été fait mention depuis ce matin, nous avons un atout. L'embryon se trouve au sein d'une zone pellucide et particulièrement chez les ruminants, c'est un peu différent chez les chevaux, mais cela existe quand même.

Cette membrane pellucide qui est acellulaire et qui est composée de quatre feuillettes est évidemment un atout car il semble que cela soit une membrane imperméable aux agents pathogènes exogènes. Seuls quelques-uns adhèrent, nous avons travaillé plusieurs années sur ce sujet précis pour le savoir, c'est un atout qui paraît bien être un élément réducteur de risque important.

Il n'est pas exclu que le gamète mâle, le spermatozoïde en l'occurrence, lorsqu'il pénètre cette zone pellucide avant de pénétrer lui-même à l'intérieur de l'ovocyte pour le féconder, puisse jouer le rôle d'un transporteur comme cela a été démontré dans des conditions particulières mais néanmoins réelles, pour du DNA exogène chez la souris par Lavitrano *et al.* <sup>1</sup> il y a quelques années et il y a quelques mois par l'équipe de Yanagimachi <sup>2</sup>. Il y a donc à la fois un élément positif très fort vis à vis des agents pathogènes « classique » et un élément négatif potentiel avec la pénétration du spermatozoïde éventuellement associé à du DNA exogène, sans compter la rupture de la membrane pellucide, par définition rompant l'intégrité protectrice, quand on fait des opérations de transfert nucléaire tout particulièrement.

Au sujet du transfert nucléaire, Monsieur Heidmann, vous avez parlé de la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes, de particules de type pro-virus, rétrovirus ou autres qui étaient des mécanismes de régulation génomiques essentiellement.

1. Lavitrano *et al.*, 1989, *Cell*, 57, 717.

2. Perry A.C.F. *et al.*, *Science*, 284, 1180.

Y a-t-il des mécanismes connus de régulation d'origine cytoplasmique ? C'est une question importante car dans le cadre du transfert nucléaire, vous rompez cette régulation, si elle existe, car pour la première fois dans l'histoire du monde, on se trouve dans une situation où le cytoplasme est étranger au noyau dans lequel il est intégré dans l'ovocyte énucléé receveur.

Donc, s'il y avait un mécanisme de régulation extra nucléaire d'origine cytoplasmique, et nous pouvons penser qu'il y en a, le fait que l'on rompe cette régulation cytoplasmo-nucléaire par l'introduction d'un noyau dans un cytoplasme d'ovocyte mûre et énucléé entraînerait, simple conséquence, une augmentation des risques, non précisés pour le moment, mais sur lesquels je souhaiterais avoir quelques avis.

**Thierry Heidmann** — C'est une question difficile car les mécanismes de répression dont je vous ai parlé sont encore mal caractérisés au niveau moléculaire. Nous avons cependant certaines indications sur la nature des mécanismes possibles.

Le phénomène de co-suppression est général, il a été découvert chez les plantes dans un premier temps, étendu à la drosophile et possiblement aux mammifères. Le mécanisme de co-suppression fait sans doute intervenir des molécules d'ARN double-brin donc pas spécialement nucléaires, néanmoins produites dans le noyau et exportées dans le cytoplasme, et qui probablement reviennent en partie dans le noyau.

Ces molécules d'ARN double-brin, si on les microinjecte dans un embryon, peuvent éteindre un gène résidant. En fait cette molécule va être capable de faire deux choses. D'une part dégrader les ARN messagers du gène endogène homologue, donc de manière post-transcriptionnelle, par un mécanisme encore mal caractérisé faisant sans doute intervenir des processus enzymatiques ou autocatalytiques. C'est un phénomène qui intervient dans le cytoplasme. D'autre part, ces ARN double-brin sont aussi capables de modifier la structure chromatinienne. Il a été démontré que ces molécules sont par exemple capables d'induire la méthylation d'un gène résidant. Il y a donc un double effet de ces molécules, qui sont les signaux de co-suppression, les médiateurs de ces effets répresseurs à la fois génétiques et épigénétiques : il y a un effet post-transcriptionnel au niveau cytoplasmique, et un effet au niveau du génome lui-même, c'est-à-dire de l'ADN nucléaire.

On retrouve en fait cette dualité quand on étudie les phénomènes de transmission de ces états réprimés. On s'aperçoit, chez la drosophile par exemple, que la transmission de ces facteurs répressifs se fait essentiellement par la lignée germinale femelle et pas par le mâle. La lignée germinale femelle transfère vraisemblablement un matériel à la fois cytoplasmique et sans doute des modifications au niveau de ses gènes, que la gamète mâle n'est pas capable de transférer. Il y a peut-être une combinatoire d'éléments cytoplasmiques et d'éléments strictement ADN. Donc phénomène complexe, mais le phénomène existe et est établi de manière non-ambiguë.

**Michel Thibier** — On peut donc penser, *a priori*, que l'association de deux éléments étrangers, l'un régulé l'autre régulateur, puisse entraîner des perturbations du système.

**Thierry Heidmann** — On ne peut pas exclure cette possibilité. Il y a aussi une donnée forte qui est que l'introduction dans un génome d'une séquence qui lui est étrangère, c'est vrai pour un virus qui n'a jamais vu le génome en question, c'est vrai aussi pour des ADNs étrangers ou même des ARNs, est en général catastrophique car tous les phénomènes de répression que la nature a mis au point pour précisément contrôler et empêcher l'intégration de matériel génétique étranger, en particulier de matériel étranger capable de réplication et de multiplication à l'intérieur d'un génome donné, ne s'établissent pas de manière instantanée. Chez la drosophile, l'introduction d'un matériel génétique qui se réplique activement, qui est capable de transposer et de s'insérer, ça fait des catastrophes, et chez les mammifères on a de bonnes raisons de supposer que cela entraîne aussi des catastrophes mais cela n'est pas encore formellement démontré.

**Un intervenant** — On parle de rétrovirus endogène, y a-t-il une raison de penser que, même en présence de signaux d'activation comme ceux décrits, les conséquences, non pas pour l'animal issu de la transgénèse, mais pour le consommateur, conduisent à un scénario du pire qui fasse qu'un nombre accru de copies d'un rétrovirus endogène puisse se révéler dangereux pour une autre espèce, en particulier une espèce consommant le produit de la transgénèse ?

**Thierry Heidmann** — Pour tenter de répondre à la question, je crois qu'on peut rappeler qu'il n'y a sans doute pas de différence fondamentale entre un rétrovirus endogène et un rétrovirus exogène infectieux. La seule est que l'endogène est déjà dans toutes nos cellules, où il est en général silencieux, alors que le rétrovirus infectieux n'est pas naturellement présent dans une espèce donnée, mais vient de l'extérieur. Ceci étant dit, pour ce qui concerne le risque relatif d'un rétrovirus endogène et d'un rétrovirus infectieux, j'aurais tendance à penser qu'il est moins dangereux de manger un animal qui a ses rétrovirus endogènes bien « calmes » que de manger un animal qui est hyper virémique, en train de produire des virus infectieux. Mais cela ne constitue pas un argument scientifique.



# Les risques pour l'environnement liés aux poissons transgéniques

Patrick PRUNET et Pierre-Yves LE BAIL

INRA/SCRIBE, Campus de Beaulieu, F- 35042 Rennes Cedex

## Résumé

L'intérêt de la transgénèse pour l'introduction de gènes d'intérêt chez les poissons d'élevage a donné lieu à de nombreux travaux durant ces dernières années. Les succès obtenus aussi bien pour la production de lignées stables de poissons transgéniques que pour l'amélioration des performances de croissance après surexpression du gène de l'hormone de croissance (GH) montrent que cette technologie peut avoir un intérêt à terme pour l'aquaculture. Dans leurs formes actuelles, les installations piscicoles ne permettent aucune garantie contre les risques d'échappement et sont soumis à des paramètres incontrôlables souvent d'origine climatique (crue, tempête...). Dans le cadre de cet exposé seront donc présentés les particularités biologiques de la transgénèse chez les poissons qui entraînent des interrogations spécifiques quant à l'impact sur l'environnement. En particulier, nous ferons le point sur les méthodes de stérilisation actuellement disponibles et de leurs limites d'utilisation pour la maîtrise des flux géniques en milieu naturel.

L'analyse des risques pour les écosystèmes naturels des poissons transgéniques n'a fait l'objet que de très peu de travaux. Cette absence de données solides constitue donc un problème pour l'élaboration d'une stratégie d'évaluation et de gestion du risque lié à l'interaction entre poissons transgéniques et poissons sauvages. Nos connaissances actuelles reposent en grande partie sur l'expérience acquise en évaluant l'impact de l'introduction d'espèces exotiques de poissons dans de nouveaux écosystèmes. En effet, le problème posé par les poissons transgéniques est tout à fait comparable à celui de l'introduction d'espèces étrangères. A l'aide d'exemples concrets montrant des exemples d'impact positif mais aussi négatif, nous analyserons les risques en terme d'altérations trophiques, de dégradations génétiques, d'altération de l'habitat et d'introduction de pathogènes. L'impact socio-économique de telles introduction ne doit pas non plus être négligé. L'ensemble de ces données et leur analyse doivent permettre de mettre en place une démarche cohérente (mise en place de différents « filtres ») destinée à minimiser les risques biologiques associés à l'élevage de poissons transgéniques.

## LA TRANSGÉNÈSE CHEZ LES POISSONS : ASPECTS POSITIFS

Depuis les premiers travaux de Zhu *et al.* (1985) et Chourrout *et al.* (1986) sur l'introduction de gènes codant pour l'hormone de croissance chez des poissons d'élevage, l'intérêt pour cette approche biotechnologique s'est largement développée comme l'atteste les nombreuses publications apparues dans la littérature durant la dernière décennie. Plusieurs arguments peuvent expliquer cet engouement pour la transgénèse chez les poissons. D'abord, la fécondation externe permet un accès aisé aux gamètes et à l'œuf et chez plusieurs espèces de poissons, l'incubation des œufs dans des conditions contrôlées est parfaitement maîtrisée en élevage. Ensuite, dans la plupart des espèces d'intérêt aquicole, la fécondité est importante, pouvant aller de quelques centaines d'œufs fécondés par kilogramme de poids vif chez le tilapia à 2 000 œufs

chez les salmonidés et plusieurs milliers d'œufs chez la carpe et la plupart des espèces marines.

Un autre élément favorable qui a poussé au développement de ces travaux a été le succès rapidement observé dans les premières expériences de transgénèse réalisées par microinjection directement dans l'œuf après fécondation. Cette stratégie a rapidement permis de produire des poissons transgéniques surexprimant le gène de l'hormone de croissance (GH). Ainsi, dans la continuité des travaux de Palminter *et al.* (1982) sur la souris, Zhu et collaborateurs en 1986 ont introduit le gène de l'hormone de croissance humaine (hGH) chez la loche et observé une croissance fortement stimulée chez les poissons transgéniques. Ces résultats préliminaires mais prometteurs ont été ultérieurement confirmés par d'autres travaux plus approfondis chez la carpe, les salmonidés, le tilapia (Du *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 1993 ; Zhu *et al.*, 1992 ; Devlin *et al.*, 1994 ; Rhaman et Maclean, 1998) : Ainsi, chez le saumon du

Pacifique, Devlin *et al.* (1995) ont obtenu des individus transgéniques de taille 10 à 30 fois supérieure à celle des témoins du même âge.

Les succès obtenus en laboratoire de recherche sont en train d'être développés par des entreprises privées : ainsi au Canada, la société A/F Protein propose des saumons atlantiques transgéniques (nom commercial : AquAdvantage™ Bred salmon) surexprimant le gène de la GH de saumon et présentant un taux de croissance 4 à 6 fois supérieur au témoin. A notre connaissance, aucun poisson transgénique n'a été commercialisé en vue de sa consommation en Amérique du Nord. Par contre, à Cuba, suite aux travaux en laboratoire (Hernandez *et al.*, 1997 ; Marinez *et al.*, 1996), l'élevage de tilapia transgéniques surexprimant la GH est en train d'être développé dans des structures aquacoles en vue d'une commercialisation.

Après une première période d'une dizaine d'années où l'objectif principal des études était l'obtention de lignées stables de poissons exprimant le transgène introduit, les laboratoires de recherche travaillant sur le poisson se sont heurtés aux mêmes difficultés que chez les vertébrés supérieurs pour le contrôle de l'expression du transgène. Ceci a conduit à développer de nouvelles stratégies de transgénèse (ex. utilisation de rétrovirus, de transposon) et à chercher à développer de nouveaux outils (ex. transfert de noyau, cellules totipotentes de type ES). Ces derniers travaux qui se poursuivent actuellement ont pour principal but de réaliser de nouveaux modèles de poisson pour la recherche (revue de Hackett et Alvarez, 1999).

### **LA TRANSGÉNÈSE CHEZ LES POISSONS : ASPECTS NÉGATIFS**

Du fait des conditions d'élevage en milieu aquatique, les risques d'échappement de poissons transgéniques ont été très rapidement pris en considération. Il est en effet très difficile de garantir l'étanchéité totale d'une structure d'élevage à moins d'imposer des normes très strictes et donc coûteuses de type « structure expérimentale ». Ce risque a donc été la première cause de non-développement de l'aquaculture des poissons transgéniques.

Du fait de la grande fécondité des espèces d'intérêt aquacole, ce qui constituait au départ un avantage s'avère aussi être un facteur très favorable pour la dissémination incontrôlée du patrimoine génétique de poissons transgéniques à partir d'animaux échappés d'élevage. La

dissémination du matériel génétique d'un poisson transgénique peut se réaliser non seulement au sein de la même espèce sauvage mais aussi par croisement entre espèces différentes. Ainsi, chez les Salmonidés, les essais de production d'hybrides ont montré que l'on pouvait obtenir des individus viables et souvent non stériles (Chevassus *et al.*, 1984). Ainsi, les différents hybrides de salmonidés se répartissent entre deux extrêmes. Des hybrides stériles mais présentant une survie précoce faible et des hybrides ayant un bon taux de survie et étant fertiles (en général, ce sont des hybrides entre espèces proches). L'ensemble de ces caractéristiques font que les risques de dissémination de transgène sont tout à fait réels chez les poissons.

Enfin, il a été montré que certaines populations de poissons (ex. truite fario) pouvaient être caractéristiques d'un bassin versant bien précis. Il est évident qu'une telle situation constitue un facteur de fragilité supplémentaire pour les populations sauvages concernées face à l'arrivée non contrôlée de poissons transgéniques.

Quelles pourraient être les conséquences d'une explosion démographique incontrôlée de poissons transgéniques dans un écosystème donné ? Au-delà des conséquences évidentes et désastreuses pour l'environnement, il ne faut pas négliger les risques que cela peut entraîner pour les populations sauvages qui pourraient être amenées à disparaître (situation de compétition interspécifique spatiale ou trophique) ou à intégrer les séquences de transgènes dans leur génome. Or, une telle situation n'est pas sans risque aussi bien pour la santé animale (ex. effet secondaire indésirable de l'intégration du transgène sur la résistance à des maladies) que pour la santé humaine. En effet, ces espèces sauvages peuvent être consommées par l'homme soit dans le cadre d'une activité récréative (pêche sportive) soit dans le cadre d'une activité de pêche professionnelle.

L'ensemble de ces considérations justifie donc les interrogations et les discussions autour de l'évaluation du risque associé aux poissons transgéniques.

### **LES RISQUES LIÉS À LA PRODUCTION DE POISSON : CONNAISSANCE DES EFFETS DU TRANSGÈNE SUR LA BIOLOGIE DU POISSON**

En premier lieu, il est important de rappeler que le poisson ne se différencie pas des autres vertébrés quant aux conséquences physiologiques de l'intégration d'un transgène au hasard

dans son génome. Des activations ou des inactivations intempestives de gènes de l'hôte peuvent avoir lieu et conduire à des perturbations plus ou moins prononcées de fonctions physiologiques. Pour détecter de telles situations, on se retrouve donc face au même type de réponse que pour les vertébrés supérieurs : un examen global des poissons transgéniques à défaut d'hypothèse plus précise sur les effets produits. De même, les produits issus de poissons transgéniques peuvent être toxiques ou allergènes et justifient donc des analyses classiques de toxicité et d'allergénicité. Enfin, les conditions de production du poisson se réalisant dans des sites aquacoles bien délimités et autorisés, il est tout à fait concevable d'appliquer une traçabilité des produits issus de l'élevage de poissons transgéniques.

La connaissance des effets du transgène sur la physiologie du poisson est une condition indispensable pour la bonne gestion du risque lié à l'élevage de poisson transgénique. Ainsi, dans le cas des saumons surexprimant le gène de la GH, on observe non seulement des effets sur la croissance mais aussi sur l'aptitude à smoltifier (acquisition en eau douce de la capacité à s'adapter au milieu marin) et sur la maturité précoce des géniteurs (Devlin *et al.*, 1995). De plus, le transgène s'exprimant dans de nombreux tissus du fait de l'utilisation d'un promoteur ubiquitaire, d'autres fonctions comme la réponse immunitaire peuvent être aussi modifiées (Mori et Devlin, 1999 ; Calduch-Giner *et al.*, 1995). Au-delà de ces fonctions physiologiques, d'autres aspects de la biologie du poisson peuvent être perturbés chez ces saumons transgéniques : ainsi, Farrell *et al.* (1997) ont montré que ces poissons présentaient des performances de nage inférieures à celles des témoins de taille identique. Pour les poissons transgéniques, ceci peut donc constituer un désavantage en milieu naturel par rapport à des animaux sauvages. Par contre, l'on sait qu'un traitement à la GH est capable de stimuler les niveaux plasmatiques de testostérone, hormone fortement impliquée dans l'agressivité, ce qui peut conférer un avantage à des saumons transgéniques GH échappés en milieu naturel (Danzmann *et al.*, 1990). Quand l'on sait enfin que la GH stimule les capacités d'adaptation des salmonidés à l'eau de mer (Almendras *et al.*, 1993), il apparaît bien difficile de prédire actuellement le comportement et le devenir de saumons transgéniques GH dans des cours naturels peuplés de populations sauvages de salmonidés. Cet exemple illustre combien il est important de bien connaître les effets du transgène GH sur tous les aspects de la biologie du

poisson si l'on veut pouvoir prédire et maîtriser l'impact sur le milieu naturel de l'échappement de poissons transgéniques de leur structure d'élevage.

### **LES RISQUES LIÉS À LA PRODUCTION DE POISSON : EFFETS DE L'INTRODUCTION DE POISSONS TRANSGÉNIQUES DANS LE MILIEU NATUREL**

Il existe malheureusement très peu de données recueillies jusqu'à maintenant sur l'incidence possible de poissons transgéniques sur les écosystèmes naturels. L'analyse de ce problème peut être abordée selon deux logiques différentes :

— Pour certains, le principal problème lié à la présence incontrôlée de poissons transgéniques dans le milieu naturel est le risque de transmission d'un matériel génétique nouveau (le transgène intégré dans le génome de l'hôte) au sein d'une population sauvage. Cette situation n'est cependant pas réellement comparable au problème des repeuplements et à l'impact génétique de l'introduction d'une espèce d'élevage au sein de populations naturelles. Dans ce cas, des risques d'introggression entre génomes des deux populations mis en contact (élevage et sauvage) ont été décrits et peuvent conduire à l'extinction du génome de la population réceptrice (Berreri, 1997). Cependant, nous sommes alors en présence de deux « pools » génétiques différents alors que dans le cas de poissons transgéniques, une infime partie du génome a été modifiée. Les premiers travaux réalisés en laboratoire sur le devenir d'une population de poissons transgéniques qui présenterait une croissance accélérée et serait mélangée avec une population sauvage suggèrent, à terme, une disparition des individus non-transgéniques. Cet effet serait principalement dû à l'augmentation des performances de reproduction de ces animaux transgéniques (Muir *et al.*, 1996). Ces résultats obtenus en condition d'élevage restent cependant préliminaires et des études similaires en conditions naturelles devront être réalisées. De plus, il est probable que toute généralisation sera délicate, les effets observés étant fonction du transgène intégré et du fond génétique qui le porte.

— Une autre manière d'aborder ce problème à partir de données écologiques est de prendre en considération les travaux réalisés sur le devenir de populations naturelles de poissons suite à l'introduction d'espèces exotiques. L'introduction de nouvelles espèces est un problème important que l'on retrouve dans la plupart des pays du monde et qui concerne plus de

300 espèces. En Europe, la France constitue le 3<sup>e</sup> pays ayant introduit le plus d'espèces exotiques (11 répertoriées). Dans la grande majorité des cas, l'impact de telles introductions n'est estimé ni *a priori* ni *a posteriori*. Les motivations de ces introductions sont multiples : elles peuvent être socio-économiques comme le développement de la pêche ou de la pisciculture, la résolution d'un problème sanitaire (ex. utilisation du guppy pour la démoustification) ou d'un problème de gestion de l'environnement (utilisation de la carpe pour contrôler la végétation aquatique). Cependant, des raisons plus subjectives sont parfois à l'origine de telles introductions (ex. pratique ancienne donc légitime, raisons politiques...). Dans un certain nombre de cas, des études d'impact ont été réalisées et différents scénarios semblent exister. Ainsi, dans le cas de l'introduction du clupéidé pélagique *Limnothrissa miodon* dans le lac Kariba sur le zambèse, on observe environ 10 ans après l'introduction des premiers poissons une augmentation des prises de poissons par pêche et qui se concrétise après 20 ans par une augmentation d'un facteur 10 du tonnage de poisson pêché dans ce lac. Le scénario peut cependant se révéler plus complexe et moins positif. Après l'introduction de Latès dans le lac Victoria (Kenya), on observe 20 ans plus tard, une augmentation des captures commerciales de ce poisson mais aussi une disparition d'autres espèces. Ainsi, l'évolution de la chaîne trophique suite à l'introduction du Latès s'est faite dans le sens d'une simplification. Enfin, dans certains cas, ces introductions d'espèces nouvelles se sont révélées catastrophiques : ce fut le cas avec la Grémille introduite en 1986 dans les Grands lacs (Amérique du Nord). Ce poisson est considéré comme le principal compétiteur des espèces locales et à ce titre responsable de la diminution des prises par les pêcheries (coût estimé : 90 millions de dollars/an).

En conclusion, l'ensemble de ces données met en relief la complexité de l'analyse de l'impact écologique de l'introduction d'espèces nouvelles dans un écosystème donné. Ces effets sont très variables, difficilement prévisibles *a priori* et nécessitent un suivi écologique sur plusieurs dizaines d'années pour pouvoir être correctement analysés.

### **GESTION DU RISQUE POUR L'ENVIRONNEMENT LIÉ À L'ÉLEVAGE DES POISSONS TRANSGÉNIQUES**

L'ensemble des informations disponibles sur les effets possibles de l'échappement de poissons

transgéniques de leur structure d'élevage suggère d'adopter sur ce problème une démarche prudente. Plusieurs arguments supportent cette analyse :

- La technologie de la transgénèse chez les poissons est en train d'évoluer et devrait permettre rapidement de beaucoup mieux maîtriser les sites d'intégration et l'expression des transgènes. Or, comme nous l'avons indiqué, la connaissance de tous les effets du transgène et de son intégration dans le génome sont capitales pour l'évaluation du risque.
- Les études sur populations naturelles sont longues et prennent 10 à 30 ans avant de pouvoir apporter des conclusions.
- Trop peu de travaux de recherche se sont véritablement penchés sur les interactions entre poissons transgéniques et poissons non-transgéniques aussi bien pour étudier d'éventuel flux de gènes que pour étudier l'impact en terme de comportement ou de compétition pour les ressources trophiques.

Ainsi, l'urgence se situe plus actuellement dans l'accroissement de nos connaissances sur ces différents points que dans des prises de décisions réglementaires. Cependant, l'analyse des données disponibles permet déjà de suggérer un certain nombre de stratégies pour la gestion du risque lié à l'élevage de poissons transgéniques. Il est vraisemblable que la mise en place de structures d'élevage garantissant un confinement physique, associée à l'utilisation de poissons stériles (confinement biologique) seront requis dans les élevages de poissons transgéniques. En outre, compte tenu de la complexité et de la diversité des situations, une évaluation sur la base de différents filtres d'analyse pourra être imposée à chaque projet d'élevage.

### **La stérilisation des poissons transgéniques**

L'hybridation inter-spécifique ne s'avérant pas efficace pour la stérilisation chez les poissons, les recherches se sont orientées depuis 20 ans vers les techniques de triploïdisation. Comme chez les amphibiens mais aussi les plantes, la triploïdisation conduit à la présence d'un jeu chromosomique surnuméraire qui est de nature à perturber le déroulement normal de la méiose (Chevassus *et al.*, 1984 ; Breton *et al.*, 1996). Chez les poissons, les individus triploïdes peuvent être viables et même pour certaines espèces, des populations naturellement triploïdes ont été décrites. Les techniques d'induction de la triploïdie ont été développées

chez certaines espèces (ex. tilapia, Salmonidés). Pendant la période de maturation sexuelle, les triploïdes sont inaptes à produire des gamètes viables. Cependant, cette stérilité se traduit différemment chez les mâles et chez les femelles. Alors que les triploïdes femelles se comportent comme des poissons immatures, les mâles triploïdes présentent un développement plus ou moins important du testicule et l'ensemble des caractères sexuels associés, même s'ils restent génétiquement stériles. Le principal problème avec la triploïdisation reste que les techniques actuelles ne permettent pas de garantir 100 % d'individus triploïdes et donc ne garantissent pas une stérilité totale de la population de poissons traitées (Breton *et al.*, 1996).

Récemment, une nouvelle stratégie de stérilisation utilisant la transgénèse a été envisagée. Si elle s'avérait efficace, elle pourrait être associée à l'introduction d'un gène d'intérêt aquacole (ex. gène de la GH). Le projet développé vise à bloquer par transgénèse, au niveau cérébral, l'expression du gène du GnRH qui contrôle la mise en activité de l'axe hypothalamo-hypophyse-gonades. Un blocage total de cette expression conduirait à une stérilité qui cependant pourrait être débloquée chez certains individus mâles, par injection périphérique d'hormones gonadotropes (pour en faire des reproducteurs destinés à assurer la production d'une nouvelle génération). Cette approche, qui

a fonctionné chez la souris, est en cours d'étude chez la truite mais nécessitera encore des efforts importants de recherche.

### Mise en place de filtres d'analyse

Compte tenu de la diversité des conditions d'élevage de poissons, il serait important de mettre en place une démarche destinée à minimiser les risques d'impact sur l'environnement. Cette démarche pourrait s'appuyer sur l'analyse critique du projet de production de poissons transgéniques à travers un certain nombre de filtres. Ce pourraient être des filtres de pertinence du projet (intérêt socio-économique, absence de solution alternative...) mais aussi des filtres de connaissances (connaissance des effets de l'expression du transgène, de son intégration dans le génome, mais aussi connaissance de l'écosystème dans lequel le projet sera développé...). Enfin, on peut aussi envisager un filtre de précaution destiné à analyser les précautions sanitaires proposées pour l'élevage, l'utilisation d'animaux complètement stériles ou non, le suivi des impacts possibles au niveau du milieu naturel... Enfin, si l'on veut arriver à une maîtrise efficace du risque, il sera souhaitable que ce travail d'analyse critique d'un projet de production de poissons transgéniques puisse être réalisé par une instance d'évaluation indépendante.

### RÉFÉRENCES

- Almendras J.M.E. et Prunet P. (1993) *Aquaculture* 114, 169-179.
- Berreri P. (1997) *Bull. Fr. Pêch. Piscic.* 344/345, 471-487.
- Calduch-Giner J.A., Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P. et Perez-Sanchez J. (1995) *J. Endocrinol.* 146, 459-467.
- Chen T.T., Kight K., Lin C.M., Powers D.A., Hayat M., Chatakondi N., Ramboux A.C., Duncan P.L. et Dunham R.A. (1993) *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 2, 88-95.
- Chevassus B., Quillet E. et Chourrout D. (1984) *La Pisciculture Française* 78, 10-19.
- Chourrout D., Guyomard R. et Houdebine L.M. (1986) *Aquaculture* 51, 143-150.
- Danzmann R.G., Van Der Kraak G.J., Chen T.T. et Powers D.A. (1990) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1292-1301.
- Devlin R.H., Yesaki Y., Donaldson E.M., Jun Du S. et Hew C.L. (1995) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1376-1384.
- Du S.J., Gong Z., Tan C.H., Fletcher G.L. et Hew C.L. (1992) *Bio/Technology* 10, 176-181.
- Farrell A.P., Bennett W. et Devlin R.H. (1997) *Can. J. Zool.* 75, 335-337.
- Hernandez O., Guillen I., Estrada M.P., Cabrera E., Pina J.C., Abad Z., Sanchez V., Hidalgo Y., Martinez R., Leonart R. et de la Fuente J. (1997) *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6, 364-375.
- Martinez R., Estrada M.P., Berlangue J., Guillen I., Hernandez O., Cabrera E., Pimentel R., Morales R., Herrera F., Morales A., Pina J.C., Abad Z., Sanchez V., Melamed P., Leonart R. et de la Fuente J. (1996) *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 5, 62-70.
- Mori T. et Devlin R.H. (1999) *Mol. Cell. Endocrinol.* 149, 129-139.
- Muir W.M., Howard R.D., Martens R. et Bidwell C. (1996) 126th Annual Meeting of the American Fisheries Society, Dearborn, USA.
- Palminter R.D., Brinster R.D., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Birnberg N.E. et Evans R.M. (1982) *Nature* 300, 611-615.
- Rahman A. et McLean N. (1998) *Transgenic Res.* 7, 357-369.
- Zhu Z. (1992) In Hew C.L. and Fletcher G.L. (eds.) *Transgenic Research*. World Scientific Publishers, Singapore. pp. 92-119.
- Zhu Z., Li G., He L. et Chen S. (1985) *Z. Angew. Ichthyol.* 1, 31-34.
- Zhu Z., Xu H.M., Li G., Xie Y. et He L. (1996) *Kexue Tongbao* 31, 988-990.



# Analyse du risque nutritionnel et toxicologique lié à la consommation de produits animaux issus de nouvelles biotechnologies

Pierre BESANÇON

Université Montpellier 2 - Unité de nutrition, Place Emile Bataillon, F- 34060 Montpellier

## Résumé

Les produits animaux issus de nouvelles biotechnologies relèvent du champ d'application du Règlement Européen sur les Nouveaux aliments. A ce titre, leur sécurité d'emploi en alimentation humaine repose sur une évaluation préalable du risque toxicologique et de la qualité nutritionnelle. Les nouvelles biotechnologies pouvant s'appliquer à des objectifs très divers — amélioration de performances zootechniques, de l'aptitude à la transformation des produits, de la valeur nutritionnelle voire obtention de molécules à activité pharmacologique — les risques se situent à des niveaux très différents.

Quel que soit le cas, l'objectif est d'évaluer la qualité nutritionnelle et l'innocuité des produits (viande, produits laitiers, ovoproduits, poisson...) en démontrant qu'il y a ou non équivalence en substance avec un produit traditionnel de référence. L'équivalence en substance se conçoit en termes analytiques (composition en nutriments, présence de molécules à activité antinutritionnelle, pharmacologique ou toxique), ou fonctionnels au sens biologique (biodisponibilité, dégradabilité) ou technologique (aptitude à la transformation). L'absence d'équivalence en substance pourrait provenir de la présence de molécules nouvelles, de modifications de composition voire d'altérations métaboliques au niveau cellulaire.

Enfin dans le cas de modifications du génome, l'analyse de la construction génétique doit permettre d'avoir une connaissance aussi précise que possible des produits d'expression (nouvelles protéines, dérivés métaboliques, sites d'expression, valeurs résiduelles dans les produits transformés, toxicité, allergénicité) ainsi que des effets indirects, par exemple de nature pléiotropique. Les réponses ne pourront être données qu'au cas par cas.

Les produits animaux issus des nouvelles biotechnologies de la reproduction sont-ils des aliments nouveaux, au sens du Règlement Européen (CE 258-97) ? Si oui, leur sécurité d'emploi en alimentation humaine repose sur une évaluation préalable d'une part des risques toxicologiques et d'autre part de leur qualité nutritionnelle. Cette évaluation du risque ne peut s'envisager qu'au cas par cas, soit en fonction du type de biotechnologie pratiquée soit en fonction des objectifs recherchés. *A priori*, on peut admettre que compte tenu du recul, les biotechnologies de 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> générations (insémination artificielle et transfert embryonnaire) ne posent pas de problème majeur au plan alimentaire et les produits qui en sont issus peuvent difficilement être considérés comme de nouveaux aliments. En revanche les produits issus des 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> générations (fécondation *in vitro*, clonage, transgénèse) méritent une attention particulière. L'analyse du risque peut aussi différer selon les objectifs recherchés : la recherche d'une amélioration des performances de reproduction n'aura que des effets indirects

sur la qualité des produits tandis que la recherche d'une amélioration des qualités nutritionnelles, organoleptiques ou technologiques aura un impact direct.

Le cas des **organismes animaux génétiquement modifiés** est le plus évident à examiner au départ. Les principales étapes de l'évaluation du risque sont les suivantes :

- une analyse de la construction génétique et de ses produits d'expression ;
- la caractérisation moléculaire, fonctionnelle et toxicologique de toute nouvelle protéine exprimée ;
- la détermination de la valeur nutritionnelle des produits alimentaires issus de l'animal (lait, viande, œufs...) ;
- la recherche d'effets indirects, non intentionnels (effets de nature pléiotropique).

**L'analyse de la construction génétique**, de la nature et des caractéristiques du transgène, des séquences régulatrices, des marqueurs puis des modalités d'insertion du transgène constitue une étape capitale pour orienter la suite des

séquences de l'analyse du risque. En effet il est indispensable de connaître tous les **produits d'expression** (c'est-à-dire toute nouvelle protéine exprimée). Ces protéines doivent être caractérisées au plan fonctionnel (activité enzymatique, hormonale...); on doit en connaître les lieux, la cinétique et les niveaux d'expression dans les différents organes, tissus qui deviendront des produits alimentaires. Il faut également documenter l'analyse sur les voies métaboliques, d'excrétion et les effets métaboliques induits plus ou moins directement.

La caractérisation toxicologique d'une protéine, considérée à ce stade, comme un xénobiotique repose sur des tests de toxicité *in vivo* sur l'animal de laboratoire (on s'accorde à préconiser des tests de 13 semaines) ainsi que sur des tests de dégradabilité en système *in vitro* simulant les conditions digestives (digestion gastrique en présence de protéases acides puis digestion intestinale en présence de protéases pancréatiques).

L'allergénicité constitue un autre volet d'appréciation de l'innocuité qui doit être considéré séparément des aspects toxicologiques.

La **valeur nutritionnelle** d'un produit alimentaire peut se concevoir en terme de composition en nutriments, en facteurs antinutritionnels, en molécules à activité biologique (peptides). Elle doit être abordée aussi en terme de biodisponibilité, laquelle va dépendre des structures physico-chimiques des macromolécules (structure triglycéridique, structures secondaire, tertiaire des protéines, structure des glucides complexes), de l'environnement physicochimique des nutriments (complexes, chélates...), des traitements technologiques appliqués aux produits en particulier pour le cas des produits animaux (lait, viande...), des traitements thermiques et/ou enzymatiques. La démarche analytique peut être sans limites. Le concept **d'équivalence en substance** pourrait apporter une certaine clarification, sachant que tout produit nouveau considéré comme équivalent en substance à un produit de référence traditionnel n'a pas de raison d'être traité différemment. La difficulté est de définir et valider les paramètres analytiques et/ou fonctionnels qui serviront de base à la détermination de l'équivalence en substance. Pour les produits animaux, l'équivalence en substance doit se concevoir :

- en termes analytiques : composition en nutriments, en métabolites, résidus de xénobiotiques, structures physicochimiques, biodisponibilité ;
- en termes fonctionnels :
  - soit au sens biologique : activités enzymatiques dans les tissus et organes destinés à la consommation, métabolisme cellulaire, maturité cellulaire... ;

- soit au sens technologique : quelles sont les propriétés fonctionnelles des macromolécules constituant les produits alimentaires (protéines myofibrillaires, collagène, protéines laitières), quel est le comportement de ces macromolécules au cours des procédés de transformation (coagulation des caséines...)?

La dernière étape de l'évaluation porte sur la recherche **d'effets non intentionnels**. Les uns pourraient être dûs à une modification non voulue du génome par mutagenèse insertionnelle ; dans ce cas il faut rechercher soit la production de nouveaux métabolites (lesquels ?) ou détecter ce qui est réprimé (quoi ?). Les autres pourraient être dus à des modifications des mécanismes de régulation posttraductionnelle (glycosylation) qui conduiraient à des altérations métaboliques cellulaires non prévisibles. La démarche analytique peut recourir à des techniques d'empreintes métaboliques ou nucléiques. Le recours à des méthodes globales *in vivo* sur l'animal de laboratoire s'avère intéressant : on peut alors préconiser des tests de tolérance de 90 jours permettant cette fois d'évaluer l'innocuité des produits alimentaires éventuellement transformés. La démarche n'est plus à ce stade de tester une molécule qui se trouve à l'état de trace ou de résidu mais bien un aliment complexe ; l'approche toxicologique classique ne s'applique pas.

**En conclusion**, on pourrait tenter de hiérarchiser les risques additionnels liés aux nouvelles biotechnologies de la reproduction, à deux niveaux nutritionnel et toxicologique. Il ne semble pas que l'insémination artificielle ni les transferts embryonnaires posent de problèmes.

Pour ce qui est des aspects toxicologiques toute protéine nouvelle et ses métabolites, même à l'état de traces résiduelles dans les tissus et organes qui seront consommés doivent être évalués pour leur innocuité (toxicité, allergénicité) : c'est le cas des produits issus de technique du génie génétique qui conduisent à exprimer de nouvelles protéines. En revanche, la plus grande prudence doit prévaloir sur les conséquences du clonage tant que l'on n'aura pas une connaissance parfaite des modifications cellulaires. La démarche expérimentale est peut-être encore à trouver.

Pour ce qui est des **aspects nutritionnels** (qualité nutritionnelle, biodisponibilité), l'équivalence en substance en termes analytiques et fonctionnels est à démontrer pour tous les produits issus de la FIV, du clonage et bien sûr de la transgénèse : dans ce dernier cas la recherche

d'effets pleïotropes, susceptibles de modifier insidieusement les qualités nutritionnelles est à envisager ; dans ce cas aussi la démarche expérimentale est à valider.

Le risque serait aussi de schématiser à l'extrême des situations biologiques complexes ; à ces nombreuses questions, il ne peut être répondu qu'au cas par cas.



# Analyse du risque allergique des (nouveaux) aliments

Jean-Michel WAL

*INRA - Laboratoire immuno-allergie, CEA Saclay/BP 136, F- 91191 Gif sur Yvette Cedex*

## Résumé

La prise en compte du risque allergique est devenue une préoccupation majeure dans l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments.

Bien que peu de données objectives soient disponibles, il apparaît que la prévalence des allergies alimentaires augmente de même que le nombre d'aliments incriminés et que la gravité des symptômes observés.

Les allergènes alimentaires sont très nombreux et largement distribués y compris parmi les produits animaux (lait, œufs, viandes). Les constituants responsables sont essentiellement des glycoprotéines. Dès lors qu'une protéine est ingérée il y a donc un risque allergique potentiel.

L'évaluation du risque allergique lié à une (bio) technologie consiste donc à déterminer si un aliment produit par cette technologie est plus allergénique que l'aliment correspondant produit par des méthodes conventionnelles. Ce peut être notamment le cas si cet aliment est modifié dans sa composition ou sa présentation. L'évaluation du risque allergique peut donc faire appel au concept de « substantielle équivalence » tel qu'il est défini dans le règlement « Nouveaux Aliments ».

Dans le cas des biotechnologies de reproduction animale on peut distinguer :

- 1) des techniques désormais classiques pour lesquelles on dispose en principe d'un volume de production important et d'un recul suffisant dans l'utilisation et la consommation, pour détecter d'éventuels effets secondaires sur la santé des consommateurs.
- 2) des techniques plus limitées dans leur développement et/ou plus récentes pour lesquelles un tel recul n'existe pas.

Il faut en outre s'interroger si ces biotechnologies de la reproduction sont ou non associées à une démarche d'amélioration génétique et de sélection pour faire la part entre l'effet lié à chacun des deux aspects.

Dans un cas on peut penser que les produits issus des animaux produits par ces technologies devenues banales ne se différencient plus des produits conventionnels correspondant. La composition corporelle des animaux n'est pas modifiée et leurs produits ne sont pas « substantiellement » différents des produits traditionnels. Ils peuvent donc être considérés de la même manière que ces derniers pour l'évaluation de leur potentiel allergène : ils ne sont vraisemblablement ni plus ni moins allergéniques.

Dans l'autre on peut supposer que l'utilisation des biotechnologies s'accompagnerait de modification dans la texture et/ou dans la composition chimique des produits qui ne seraient alors plus équivalents à ceux obtenus par les méthodes traditionnelles.

Ces modifications peuvent concerner la présence d'une protéine nouvelle ou des changements dans la structure d'une protéine existante. La modification peut être génétique et entraîner des mutations ponctuelles dans la séquence primaire de la protéine ou être post traductionnelle et affecter par exemple les niveaux de glycosylation ou de phosphorylation. Cependant les mécanismes pathogéniques de l'allergie alimentaire sont encore trop mal connus pour qu'il soit possible d'établir une relation claire entre la structure et le potentiel allergène d'une protéine.

Ces modifications peuvent également concerner une protéine existante, non modifiée mais qui serait surexprimée.

Un autre facteur lié aux conditions socio-économiques peut faire varier la nature du risque en intervenant sur le niveau de consommation du produit alors que sa composition resterait inchangée.

Dans chacun de ces cas, une évaluation spécifique peut alors s'avérer nécessaire. Faute de données épidémiologiques et cliniques, elle mettra en œuvre plusieurs types d'approches indirectes comportant notamment une analyse fine de la composition du produit (analyse chimique, analyse du transcriptome, du protéome), l'analyse de la structure et des propriétés physico-chimique des « nouvelles » protéines présentes et éventuellement l'utilisation de modèles animaux.

Chacune de ces approches reste par elle-même limitée mais leur association permet d'accumuler un faisceau de présomptions de (non) allergénicité du nouvel aliment.

## INTRODUCTION

L'incidence des allergies alimentaires est en constante et rapide augmentation. Des études récentes l'évaluent à plus de 3 % de la population générale (1). C'est une fraction non négligeable de la population qui est ainsi touchée et qui constitue un groupe à risque important, d'autant que la gravité des accidents observés est elle-même en augmentation. Le nombre de chocs anaphylactiques répertoriés comme étant consécutifs à une allergie alimentaire, a été multiplié par 5 en 10 ans (Moneret-Vautrin et Kanny, 1995). Beaucoup d'entre eux sont maintenant mortels, notamment ceux provoqués par l'ingestion de produits dérivés de l'arachide. L'allergie alimentaire qui avait longtemps été considérée comme une curiosité est maintenant devenue un des aspects les plus graves et préoccupants de la toxicologie alimentaire.

Le nombre d'aliments incriminés est, lui aussi, en expansion et de plus en plus de phénomènes de réactivité croisée entre allergènes de différentes origines, parfois même éloignées, apparaissent dus à des épitopes communs c'est à dire à des fragments de leur molécule présentant des propriétés immunologiques et des caractéristiques de structure voisine. Les « aliments nouveaux » apparaissent donc comme des allergènes potentiels. Même si peu de cas bien documentés ont été rapportés jusqu'ici, il faut donc s'interroger sur les risques d'émergence de nouvelles structures immuno-réactives jusque là inapparentes ou non biodisponibles, ou de surexposition à des substances déjà réactives, du fait du développement des nouvelles technologies de production et de transformation des aliments et notamment le transfert de gènes dans les plantes et les animaux et la production de protéines recombinantes.

## CARACTÉRISTIQUES DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

Lors d'un premier contact, l'allergène, c'est-à-dire l'aliment sensibilisant ou l'un de ses constituants, est plus ou moins complètement dégradé par les enzymes digestives et absorbé tel quel ou sous forme de fragments à travers la muqueuse intestinale. Il est remanié par les cellules compétentes qui le présentent au système immunitaire. Chez les individus atopiques, c'est-à-dire génétiquement prédisposés à développer une allergie, la réponse immunitaire est alors dérégulée vers une production excessive d'anticorps spécifiques de type réaginique : les IgE.

Un contact ultérieur avec le même allergène ou avec d'autres aliments qui partagent avec lui des structures immuno-réactives communes, déclenche la réaction allergique et les manifestations cliniques provoquées par la libération des médiateurs pharmacologiques actifs (histamine, prostaglandines, leucotriènes...).

Il faut donc souligner que : 1) l'allergie alimentaire ne touche qu'une fraction génétiquement prédisposée de la population et se distingue donc ainsi de la toxicité, de l'intolérance et des pseudo allergies alimentaires qui peuvent provoquer les mêmes symptômes mais ne sont pas médiées par les IgE. Elle se déroule en deux phases distinctes, séparées dans le temps : une première de sensibilisation, puis, plus tard, une phase de déclenchement ; 2) les symptômes ne sont pas spécifiques du tractus digestif, mais au contraire se manifestent le plus souvent au niveau cutané ou respiratoire ; 3) le même aliment ou le même allergène n'est pas indispensable pour chacune des phases de la réaction allergique, la spécificité n'est pas stricte et des réactions croisées entre allergènes différents sont souvent observées ; 4) la réaction allergique est en fait la résultante d'interactions complexes entre un terrain allergique, un aliment et des facteurs environnementaux qui peuvent jouer le rôle d'adjuvant.

L'allergénicité peut se définir comme l'aptitude pour un composé à induire la synthèse d'IgE spécifiques et à être reconnu par ces IgE.

La liste des principaux aliments allergéniques n'est pas figée. Elle varie selon les habitudes alimentaires des populations concernées et donc à la fois dans le temps et en fonction des zones géographiques. Elle évolue également avec l'âge des patients. Alors que les jeunes enfants sont surtout sensibilisés aux allergènes animaux, les adultes sont plus généralement sensibles aux allergènes végétaux (Moneret-Vautrin et Kanny, 1995). Huit groupes d'aliments restent cependant en permanence impliqués dans 90 % des cas reconnus d'allergies alimentaires. Ce sont : arachide, soja, noix/noisettes, lait, œufs, poissons, crustacés, blé. Cette liste n'est cependant pas exhaustive et d'autres aliments peuvent également être des allergènes importants pour des fractions notables de la population.

La méthode de référence pour l'identification de l'allergène responsable est le test de provocation orale en double aveugle contre placebo. Ce test *in vivo* est bien évidemment limité dans son usage, de même que les tests cutanés. Des techniques d'analyse immuno-chimiques *in vitro* sont plus couramment mises en œuvre à l'aide de sérums de patients allergiques donc riches en IgE spécifiques.

L'allergénicité d'un aliment complexe est rarement, pour ne pas dire jamais, due à un constituant unique, mais au contraire, à un grand nombre de protéines, pouvant elles-mêmes présenter de multiples isoformes ; elle peut également être due à des fragments peptidiques qui en sont issus. Cet ensemble constitue le répertoire des allergènes pouvant être reconnus par les IgE d'individus sensibles. Tous ne sont pas toujours reconnus par l'ensemble de la population d'allergiques. Selon la fréquence de reconnaissance, on parle d'allergène majeur (c'est à dire avec lequel plus de 50 % de la population d'individus sensibles réagit) ou d'allergène mineur (avec lequel moins de 50 % de la population d'individus sensibles réagit). Notons que le terme mineur ne se réfère qu'à une fréquence de sensibilisation. Pour une personne sensibilisée, la gravité des symptômes d'une réaction allergique à la suite de l'exposition à un allergène peut être la même, que l'allergène soit considéré comme majeur ou mineur. L'affinité de liaison aux IgE et la fréquence de reconnaissance varient selon les individus et selon les groupes d'allergènes envisagés.

De la même manière, il n'existe pas une région ou une structure unique, bien caractérisée qui, au sein d'une molécule protéique, serait responsable de l'allergénicité. Ainsi donc l'extrême diversité et la variabilité individuelle de la réponse IgE humaine aux allergènes ne facilite pas l'évaluation et la prédiction du caractère allergène d'une protéine ou d'un fragment qui en est issu.

Les allergènes alimentaires sont très généralement des glycoprotéines de masse molaire comprises entre 12 et 30–40 kDa. Ils sont très largement répandus, et toute protéine est un allergène potentiel. Dès lors qu'une protéine est ingérée, il y a donc risque d'allergie. La question qui se pose est alors 1) de pouvoir évaluer ou même prédire le risque allergique de cette protéine à partir de sa structure, de sa fonction, de son origine, de ses propriétés physico-chimiques,... et 2) de savoir si une protéine issue des (bio)technologies modernes (par exemple une protéine recombinante) risque d'être plus allergénique qu'une protéine « naturelle » ou traditionnelle.

## **ÉVALUATION DU RISQUE ALLERGIQUE**

L'évaluation du risque allergique d'une protéine ne dispose pas de test universel fiable et pertinent et fait appel à différentes approches selon les cas.

Une démarche proposée récemment pour les Nouveaux Aliments et notamment pour les aliments issus d'organismes génétiquement modifiés (OGM), se fonde en premier lieu sur l'origine de la protéine (ou du peptide qui en est dérivé) (Metcalf *et al.*, 1996). C'est le premier aspect à prendre en compte dans l'identification et la maîtrise des points critiques pour la sécurité alimentaire.

Rappelons que le terme « Nouveaux aliments » se réfère à des aliments consommés jusqu'ici de manière confidentielle au niveau de l'Union européenne et pour lesquels nous n'avons donc pas une masse de données cliniques et épidémiologiques permettant d'établir avec certitude l'absence d'effets potentiels à long terme du fait d'un manque de recul suffisant. Dans le cas des biotechnologies de la reproduction animale, il faut donc distinguer :

- 1) les techniques désormais classiques pour lesquelles on dispose en principe d'un volume de production d'animaux important et d'un recul suffisant dans l'utilisation et la consommation de leurs produits. Il s'agit des techniques d'insémination artificielle et de transplantation embryonnaire,
- 2) les techniques plus limitées dans leur développement et/ou plus récentes pour lesquelles un tel recul n'existe pas et pour les produits issus desquelles la notion de « Nouveaux aliments » peut s'appliquer. Il s'agit des techniques de nouvelles générations telles que la fécondation *in vitro*, le sexage, le transfert nucléaire et surtout la transgénèse.

Il faut en outre savoir si ces biotechnologies de la reproduction sont ou non associées à une démarche d'amélioration génétique et de sélection pour faire la part entre l'effet lié à chacun des deux aspects.

Dans un cas, on peut penser que les aliments issus des animaux produits par ces technologies devenues banales ne se différencient plus des produits conventionnels correspondants. La composition corporelle des animaux n'est pas modifiée et leurs produits ne sont pas « substantiellement » différents des produits traditionnels. Ils peuvent donc être considérés de la même manière que ces derniers pour l'évaluation du risque allergique.

Dans l'autre cas, on peut supposer que l'utilisation des biotechnologies s'accompagnerait de modification dans la structure et/ou dans la composition des produits qui ne seraient alors plus équivalents à ceux obtenus par les méthodes traditionnelles.

Ces modifications peuvent concerner la présence d'une protéine nouvelle ou des change-

ments dans la structure d'une protéine existante. La modification peut être génétique et entraîner des mutations ponctuelles dans la séquence primaire de la protéine ou être post traductionnelle et affecter par exemple les niveaux de glycosylation ou de phosphorylation.

Ces modifications peuvent également concerner une protéine existante, non modifiée mais qui serait surexprimée.

Un autre facteur lié aux conditions socio-économiques peut faire varier la nature du risque en intervenant sur le niveau de consommation du produit alors que sa composition resterait inchangée.

Dans le cas des « Nouveaux aliments », l'évaluation de l'allergénicité de la protéine étrangère (c'est à dire nouvelle ou modifiée) exprimée dans l'aliment s'articule sur un arbre de décision fondé sur l'origine de cette protéine ou du transgène qui la code.

Il convient alors de distinguer si elle (ou il) provient : 1) d'un aliment reconnu comme allergénique, 2) d'aliment(s) dont l'allergénicité est rarement évoquée ou pour le quel aucun cas d'allergie n'a été décrit.

### **La protéine est issue d'un aliment reconnu comme allergène**

Dans la mesure où la protéine est issue d'un aliment reconnu comme allergène, des patients sensibles doivent pouvoir être recrutés et utilisés pour des tests *in vivo* et *in vitro*.

C'est ainsi qu'un substitut de matière grasse obtenu à partir de protéines de lactosérum microparticulées a été proposé (Simplese). La demande d'autorisation de commercialisation a donné lieu à des études spécifiques du risque allergique et il a été montré que l'allergénicité de ce substitut était comparable à celle des protéines du lait qui ont servi à sa préparation et qu'en conséquence cette mention devait être portée sur l'étiquette afin d'avertir de ce risque les consommateurs allergiques au lait (Sampson et Cooke, 1992).

Dans le cas des aliments transgéniques, si le transgène introduit code un allergène connu, il est tout à fait probable que la plante transgénique va exprimer la protéine exogène avec son potentiel allergénique. C'est ce qui s'est passé lorsque la Société Pioneer Hi-Bred a voulu intégrer dans le soja l'albumine 2S de la noix du Brésil. C'est une protéine de réserve riche en méthionine et cystéine et dont l'introduction dans le soja visait logiquement à rééquilibrer la composition protéique de la graine (naturellement pauvre en acides aminés soufrés) et donc

à augmenter la valeur biologique du soja pour l'alimentation animale. Malheureusement, l'albumine 2S est un allergène reconnu par les IgE sériques des patients sensibles à la noix du Brésil, et ces mêmes patients reconnaissent tout autant cette protéine lorsqu'elle est exprimée non plus par la noix du Brésil, mais par le soja transgénique, sous une forme équivalente à celle présente naturellement dans la noix du Brésil (Nordlee *et al.*, 1996).

La  $\beta$ -lactoglobuline bovine est un allergène majeur du lait de vache, reconnu par plus de 60 % des patients allergiques. Nous-mêmes avons montré que la  $\beta$ -lactoglobuline recombinante, exprimée dans *E. coli* possédait les mêmes caractéristiques immunologiques (en particulier la même immunoréactivité vis-à-vis d'IgE de patients allergiques au lait de vache) que la molécule native présente naturellement dans le lactosérum (Chatel *et al.*, 1996). Il n'y a donc vraisemblablement pas de différence d'allergénicité entre une protéine recombinante et la protéine conventionnelle correspondante qui lui est équivalente.

### **La protéine est issue d'un aliment non reconnu pour son allergénicité**

L'évaluation de l'allergénicité éventuelle d'une nouvelle protéine reste une question primordiale mais complexe. Pas ou peu de données historiques cliniques ou épidémiologiques sont disponibles, les cas d'allergie sont peu ou mal répertoriés et les sérums de patients sensibilisés sont rares voire inexistantes. Il faut donc se tourner vers d'autres méthodes indirectes d'évaluation, voire de prédiction de l'allergénicité. Ces méthodes, bien que pertinentes, doivent faire l'objet d'une application et d'une interprétation critiques, au cas par cas (Wal, 1998).

#### **Modèles animaux**

L'expérimentation animale ne permet pas de fournir, pour l'instant, de modèles pertinents extrapolables à l'homme, en raison à la fois de la spécificité et des importantes variations de la réponse anticorps observée chez l'animal en fonction de l'espèce, de l'individu, du mode de sensibilisation, de la nature de l'allergène..., et de la diversité de la réponse IgE humaine liée elle-même à la variabilité génétique de la population. Dans le cas de l'étude de l'allergénicité de la noix du Brésil, les essais sur animaux avaient même conduit à considérer la « fameuse » albumine 2S comme un allergène mineur, voire un tolérogène (Melo *et al.*, 1994) ! Cependant malgré ces difficultés, de nombreuses recherches visent à développer des modèles animaux

appropriés, c'est-à-dire mimant la réponse anti-corps, voire même les symptômes, observés chez les patients allergiques.

### **Analyse de la structure de la protéine**

Une approche complémentaire se fonde sur l'analyse des homologies de séquences pouvant exister entre la protéine étrangère introduite ou présente dans l'aliment et des allergènes reconnus, dont la structure est connue et répertoriée dans des banques de données accessibles sur l'Internet. Des programmes de comparaison de séquences permettent d'identifier des fragments homologues, plus ou moins longs. L'existence de tels fragments comportant une succession de 8 (ou plus) résidus d'acides aminés identiques ou chimiquement similaires témoignerait de l'existence d'épitopes communs et est considérée comme une présomption d'allergénicité. *A contrario*, l'absence de telles structures homologues témoignerait de l'absence de risque allergénique.

Cette approche permet d'éliminer rapidement des constructions à risque potentiel. Par contre, l'absence de séquences communes ou voisines d'une telle longueur ne constitue pas une garantie formelle d'innocuité en raison 1) de la pauvreté des informations disponibles dans les banques de données où seule une petite fraction des allergènes sont répertoriés comme tels. C'est le cas de la  $\beta$ -lactoglobuline qui n'est pas répertoriée comme allergène dans les banques de données. Elle ne serait pas non plus retrouvée comme allergène à partir de sa séquence selon les critères d'homologie proposés ; 2) du fait que des alignements de séquences homologues, beaucoup plus courts que 8 résidus d'acides aminés consécutifs peuvent se rapprocher lors du repliement de la molécule et participer à la formation de structures immunoréactives (épitopes conformationnels) suffisamment similaires pour provoquer une cross-réactivité immunologique. On peut noter à ce propos que des familles de protéines comme les lipocalines et les calycines, caractérisées par une structure tertiaire commune très conservée, dite en « barril  $\beta$  », et constituée d'arrangements de 8 ou 10 feuillets  $\beta$  anti parallèles, regroupent un grand nombre d'allergènes très puissants : pneumallergènes tels que les allergènes majeurs présents dans la salive, les phanères ou les poils de souris, de chat, de cheval, de bovins, allergène de la blatte, ou trophallergènes comme la  $\beta$  lactoglobuline du lait de vache (Dandeu *et al.*, 1995).

### **Analyse des propriétés physico-chimiques de la protéine**

Il n'existe pas de lien étroit actuellement bien établi entre la structure d'une protéine, sa fonc-

tion, et son caractère allergène éventuel, même si de nombreux allergènes se retrouvent dans des familles telles que : enzymes, protéines de réserve, protéines de transport, protéines de stress... Cependant les allergènes, en tant qu'entité chimique, pourraient se caractériser par un certain nombre de propriétés physico chimiques comme la stabilité à la température, aux pH acides et plus généralement aux traitements subis lors des procédés technologiques industriels, la résistance à la dégradation par les enzymes digestives.

Partant du postulat que l'allergénicité est essentiellement le fait de la molécule protéique intacte, et que plus une protéine sera résistante à l'hydrolyse lors de la digestion gastrique et intestinale, plus elle aura de chance d'être absorbée intacte par la muqueuse intestinale, et ainsi d'exercer son immunoréactivité au niveau des cellules immuno compétentes, Astwood *et al.* (1996) ont proposé un modèle de digestion *in vitro* pour mesurer la résistance à la protéolyse. Appliqué aux principaux allergènes alimentaires, ce test fait apparaître une certaine corrélation : la stabilité est supérieure à 2 minutes, voire même à 1 heure pour des allergènes importants, alors que des protéines non reconnues comme allergènes seraient dégradées dans les 15 secondes

Ces critères sont pertinents, mais pas absolus d'autant que les conditions du test et notamment le pH du milieu (pH 2) sont très drastiques et ne correspondent pas aux conditions réelles de la digestion et à la variabilité individuelle : évolution du pH gastrique au cours du temps, gradient et répartition de l'acidité du milieu, cinétique de sécrétion des enzymes protéolytiques et de la vidange des produits. Par ailleurs, une protéine alimentaire comme la caséine du lait, très sensible aux attaques enzymatiques et dégradée lors de la digestion, se révèle être un allergène aussi puissant que la  $\beta$ -lactoglobuline, protéine globulaire résistante aux protéases. De plus il est maintenant bien démontré que des fragments peptidiques, même de relativement courte longueur (une douzaine de résidus d'acides aminés) conserve une partie non négligeable de l'allergénicité de la molécule entière et qu'il n'est donc pas indispensable qu'une fraction importante de la protéine franchisse la barrière intestinale sous sa forme native, intacte, pour qu'il y ait manifestation allergique (Wal, 1998).

### **Interactions potentielles entre expression d'un transgène et de gènes codant pour les allergènes naturels endogènes**

Un possible effet « pléiotropique » est évoqué dans le cas des plantes et des animaux

transgéniques. En effet, le point d'insertion du transgène dans le génome est aléatoire, du moins pas contrôlé. Il est donc possible que la simple insertion interfère avec le fonctionnement d'autre(s) gène(s) régulant des fonctions tout à fait différentes de celles concernées par la transgénèse et affecte de nombreuses caractéristiques phénotypiques, non attendues, non contrôlées, non reliées à l'expression propre du transgène, et qui peuvent avoir une incidence sur la santé des consommateurs.

Du fait de l'origine multigénique des allergènes alimentaires, on peut ainsi craindre que le transgène inséré entraîne par de tels effets pléiotropiques une modification du niveau d'expression de certaines protéines endogènes, allergènes, normalement présentes dans les lignées traditionnelles.

## CONCLUSIONS

Les aliments allergéniques sont très nombreux et très variés. Dans chaque aliment, les constituants responsables de l'allergénicité sont eux-mêmes multiples. De nouveaux allergènes apparaissent constamment et il n'est pas aisé de répondre à la question « What makes an allergen an allergen ? » soulevée par Aas (1992) et de comprendre les mécanismes par lesquels une glycoprotéine banale, inoffensive pour la plupart des gens, est allergénique pour certains individus ou par lesquels (cas des allergènes de l'arachide) elle devient progressivement ou soudainement un allergène beaucoup plus agressif et dangereux qu'auparavant.

Des facteurs génétiques, environnementaux, des modifications dans les habitudes alimentaires interviennent dans cette recrudescence des allergies alimentaires, mais les caractéristiques de structure et de présentation des allergènes alimentaires sont certainement un élément déterminant. On ne peut cependant pas identifier une structure particulière qui serait intrin-

sèquement responsable de l'allergénicité d'une protéine. Pour chaque allergène, les épitopes apparaissent eux aussi nombreux et largement répartis au niveau moléculaire, les mêmes épitopes n'étant pas reconnus par tous les patients allergiques. Il est donc essentiel pour l'industrie agro-alimentaire de s'assurer qu'elle ne génère pas de nouveaux épitopes ou qu'elle ne développe pas des produits d'allergénicité accrue par les nouveaux procédés de reproduction des animaux et des plantes, de fabrication, de transformation et de présentation des aliments. Cette très grande diversité et variabilité des allergènes, à tous les niveaux, et le fait également que des allergènes très éloignés peuvent également présenter des homologies de séquence ou de structure correspondant à des sites privilégiés de reconnaissance par les IgE, rendent difficile et aléatoire l'évaluation *a priori* du risque allergénique d'un aliment ou d'un composant de cet aliment.

A ce jour, on ne peut évaluer ni prédire de manière totalement fiable et objective l'allergénicité des aliments.

Les méthodes indirectes de reconnaissance de structures allergènes, d'évaluation et *a fortiori* de prédiction des risques potentiels n'étant encore pas totalement fiables et validées, une évaluation au cas par cas, en fonction des caractéristiques propres de chaque aliment ou de chaque protéine nouvelle introduite est nécessaire. De plus, les approches de type prédictif devraient obligatoirement s'accompagner de la mise en place de mesures et de réseaux de surveillance de l'impact éventuel à long terme des nouveaux aliments sur l'émergence de nouvelles allergies, après la mise sur le marché. Cette « allergeo-vigilance » ne peut s'appuyer que sur l'organisation et le développement de procédures de traçabilité rigoureuse de ces produits tout du long de la filière agro-alimentaire, qui devraient s'intégrer dans une démarche globale d'assurance qualité.

## RÉFÉRENCES

- Scientific Cooperation Programme in the EU. The occurrence of severe Food Allergies in the EU. Report of experts participating in Task 7.2. April 1998.
- Moneret-Vautrin D.A., Kanny G. (1995) L'anaphylaxie alimentaire. Nouvelle conquête multicentrique française. *Bull Acad Med.* 179, 161-184.
- Metcalf D.D., Astwood J.D., Townsend R, Sampson HA., Taylor SL., Fuchs RL. (1996) Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 36 (S), S165-S186.
- Sampson HA., Cooke S. (1992) The antigenicity and allergenicity of microparticulated proteins: Simplex. *Clin Exp Allergy.* 22 (10), 963-969.
- Nordlee J.A., Taylor S.L., Townsend J.A., Thomas L.A., Bush R.K. (1996) Identification of a Brazil nut allergen in transgenic soybeans. *New Eng J Med.* 334, 688-692.
- Chatel J.M., Bernard H., Clément G., Frobert Y., Batt C., Gavalchin J., Peltre G., Wal J.M. (1996) Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant  $\beta$ -Lactoglobulin, a major cow milk allergen. *Mol Immunol.* 33, 1113-1118.
- Wal J.M. (1998) Strategies for assessment and identification of allergenicity in (Novel) Foods. *Int Dairy J.* 8, 413-423.
- Melo V.M.M., Xavier-Filho J., Silva-Lima M., Prouvost-Danon A. (1994) Allergenicity and tolerance to proteins from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Food Agric. Immunol.* 6, 185-195.
- Dandeu J.P., Rabillon J., David B. (1995) Structure et fonction de quelques protéines allergéniques d'origine animale et végétale. *Rev Fr Allergol.* 35 (6), 519-523.
- Astwood J.D., Leach J.N., Fuchs R.L. (1996) Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnol.* 14, 269-273.
- Wal J.M. (1998) Cow's milk allergens. *Allergy* 53, 1013-1022.
- Aas K. (1978) What makes an allergen an allergen? *Allergy* 33, 3-14<sup>e</sup> discussion.



## DISCUSSION DE LA TROISIÈME SESSION

### b) Autres risques

**Michel Thibier** — Ma question s'adresse à Patrick Prunet. J'ai cru comprendre que certains transgénètes avaient des performances inférieures, ils sont donc en position défavorable par rapport à la population initiale, je pense donc qu'à terme, la population de transgénètes s'éteindra... Par ailleurs, il me semble qu'une étude récente sur le tilapia, évoquait qu'au bout d'une douzaine de générations, les transgènes disparaissaient complètement.

Pensez-vous d'une façon générale que l'équilibre issu de la dynamique de ces populations mélangées ne soit pas :  
1) d'abord, essentiellement tributaire des conditions d'environnement qui peuvent varier dans le temps et dans l'espace, ou bien,

2) au contraire, si rien n'est changé dans le milieu environnant, soumis à l'aléa complet, empêchant de préjuger si la population transgénétique va se maintenir ou, au contraire, si elle sera défavorablement affectée par le transgène.

En bref, quelles sont les règles que l'on peut tenter d'énoncer quant au futur de l'établissement de telles populations transgénètes ?

**Patrick Prunet** — Concernant le maintien du transgène, nous manquons énormément d'informations solides sur ce dossier. Il y a des informations préliminaires rapportées récemment par Louis-Marie Houdebine où plusieurs équipes de recherches commencent à se préoccuper sur le devenir du transgène sur le long terme dans des populations plus naturelles qu'un bac d'élevage. Ce sont des axes de recherches qu'il faudrait développer.

Au sujet de l'impact physiologique, les données présentées sont contradictoires. Un animal qui nage moins vite mais qui est plus agressif va-t-il subsister ou disparaître en milieu naturel ? Je suis incapable de vous répondre.

L'hormone de croissance (GH) joue sur la fécondité en favorisant vraisemblablement les maturations précoces. Quel sera l'impact lorsque l'on se retrouvera en milieu naturel ? Ce sont des expériences à mener qui seront assez importantes si l'on veut pouvoir maîtriser le risque sur des dossiers complexes.

**Bernard Chevassus-au-Louis** — Les ichtyologues ont l'habitude de mesurer les vitesses de nage en longueur de poisson... (pour information).

**M. Séralini - Université de Caen** — Je comprends bien que si la société décide qu'elle a besoin de poissons transgénétiques, il est préférable de les avoir stériles.

Cette façon de penser, est-elle plus éthique, à votre avis, que le gène « terminator » chez les végétaux dans la mesure où nous aurons toujours des animaux brevetés qui ne se reproduiront pas pour l'éleveur ?

**Patrick Prunet** — C'est un débat de fond qui n'est pas simple. Ce que vous dites est d'autant plus vrai que je ne l'ai pas explicité dans la stratégie générale sur laquelle nous travaillons. On bloque par des manipulations génétiques, le GnRH au niveau central, mais on est capable ponctuellement, en laboratoire, de débloquent, au niveau périphérique, le fonctionnement de la gonade par des injections d'hormones.

Donc, l'intérêt de ces transgénétiques GnRH stériles, est qu'une population non manipulée reste stérile pour l'éleveur et pour une population manipulée (injectées avec des hormones gonadotropes) en conditions connues, on débloquent la reproduction des poissons mâles. Nous favorisons effectivement une stratégie de contrôle d'une diffusion d'un matériel biologique.

**Florian Horaud** — Pourriez-vous m'expliquer comment vous mettez en évidence que c'est la transgénèse qui a un impact sur la population ?

**Patrick Prunet** — Les travaux présentés dans mon exposé se réfèrent à l'introduction d'une espèce nouvelle dans un écosystème donné. Ainsi, par exemple sur le lac Victoria, ce sont des analyses de populations de poissons faites sur vingt ans suite à l'introduction d'une espèce nouvelle, le latès. Au bout de 10 ans, on commence à observer une explosion de la population de latès au dépend d'autres populations qui disparaissent progressivement. Les conditions environnementales n'ayant pas significativement évolué pendant cette période, ces observations suggèrent que c'est bien l'introduction de l'espèce nouvelle qui induit la disparition d'autres espèces de poisson. Il est important de noter que ces conséquences peuvent être dramatiques et souvent ne sont observables qu'après de nombreuses années.

**Bernard Chevassus-au-Louis** — Si on applique le principe d'équivalence en substance avec les méthodes classiquement utilisées aujourd'hui, pourrait-on par exemple distinguer une souris virémique d'une souris de la même souche mais non virémique ?

**Pierre Besançon** — Vous posez le problème de la notion d'équivalence en substance et surtout de ses limites.

**André Parodi** — L'état d'allergie vis-à-vis d'un aliment varie. Il y a des allergies plus importantes chez l'enfant, d'autres chez l'adulte. Ces allergies alimentaires sont associées à trois groupes de facteurs : génétique, le contact avec l'allergène et les facteurs environnementaux.

Lorsqu'un individu révèle son allergie à une période de la vie déterminée, chez l'adulte par exemple, alors qu'il ne l'a pas été dans son enfance, que va-t-il se produire ? Est-ce des facteurs environnementaux ? Les connaît-on mieux ?

**Jean Michel Wal** — Ce que je vous ai dit à propos de l'évolution de la spécificité des allergies avec une part prépondérante des allergènes d'origine animale dans l'enfance et leur substitution par les allergènes d'origine végétale chez l'adulte, provient de résultats de l'équipe du Professeur Moneret-Vautrin à Nancy.

L'explication avancée est que ce sont les allergies au pollen qui font le nid des allergies alimentaires ultérieures du fait des allergies croisées que l'on voit de plus en plus entre pneumallergènes et allergènes alimentaires, c'est à dire de l'existence d'une réactivité croisée entre les structures des pollens et d'aliments ; la plus connue est celle entre le pollen de bouleau et la pomme.

Une allergie au pollen, chez les grands enfants et chez les adultes va ouvrir la voie à une allergie alimentaire à des fruits ou à des légumes. C'est une des explications, ce n'est pas la seule.

**Joël Guillemin** — Dans le domaine de la toxicologie, la pertinence de la réponse est liée à celle du choix de l'espèce. Cela a été souligné dans un document de lignes directrices consacré aux médicaments issus des biotechnologies où le législateur insiste sur ce choix de l'espèce en vue des applications à l'homme.

Dans le cas du médicament, cela paraît plus facile puisque pour sélectionner l'espèce on a recourt à une activité pharmacologique liée à la présence de récepteurs ou d'épitopes dans le cadre d'anticorps.

Concernant l'aliment, on n'a pas tout à fait ces mêmes critères de réflexion. Pensez-vous que l'on puisse envisager l'utilisation d'une autre espèce que le rat dans certains cas particuliers ?

**Pierre Besançon** — En matière alimentaire, le rat présente l'avantage d'avoir des besoins et des comportements sur le plan physiologique qui ne sont pas tellement éloignés de ceux de l'homme. Nous avons une situation facilement transposable, à cela près qu'il a une durée de vie beaucoup plus courte.

Un test de toxicité de 90 jours équivaut à un essai qui correspondrait, compte tenu de la durée de vie de l'espèce humaine, à l'expérimentation chez l'homme de 10 ans à peu près. Nous avons des métabolismes qui ne tournent peut-être pas tout à fait de la même façon. Le rat n'est pas une espèce à rejeter, nous le connaissons parfaitement.

Peut-être avez-vous une idée particulière sur la sensibilité de certaines espèces ? Il est préférable de travailler sur une espèce validée comme le rat.

**M. Séralini - Université de Caen** — Je déplore qu'aujourd'hui, en matière de traçabilité comme en matière de test de tolérance en ce qui concerne les OGM importés, on soit « à côté de la plaque ».

Au sujet des OGM commercialisés en France, par exemple, quels tests pourrait-on préconiser pour l'insecticide produit par le maïs ? L'insecticide produit se retrouve-t-il dans le pollen de maïs ? Cela va-t-il introduire à terme des allergies sur le maïs insecticide ? Pourrait-on avoir des tests cutanés comme il en est fait pour les poils de chat ou de lapin chez tous les pédiatres ?

La question pour Monsieur Besançon concerne les tests de tolérance de 90 jours que vous préconisez chez le rat. Ils ne sont pas faits de cette manière pour les OGM d'aujourd'hui. Nous avons des données comparatives, nous ne pouvons pas chercher tout et n'importe quoi, mais en fonction des transgènes, et au cas par cas il est possible d'avoir des idées en fonction des toxicités publiées pour tel résidu métabolique que la présence du transgène pourrait entraîner, je pense au résidu d'herbicide ou à autre chose.

Quels tests de tolérance pourriez-vous préconiser sur les OGM en les comparant aux tests faits pour les additifs alimentaires ?

**Jean Michel Wal** — Je n'ai pas évoqué la question que vous avez posée car elle est typique des plantes transgéniques plutôt que des produits animaux.

Les plantes transgéniques qui sont actuellement sur le marché ont été modifiées à des fins agronomique ou technologique qui se traduit par la présence d'une protéine étrangère qui est généralement une enzyme de tolérance à un herbicide ou de résistance à un insecte.

Ces protéines ont un certain nombre de caractéristiques au regard des tests dont j'ai parlé qui font qu'*a priori*, elles ont peu de chances d'être allergéniques ; elles sont présentes en très faible quantité dans l'aliment, elles sont peu glycolysées et rapidement dégradées. Ce n'est pas une preuve absolue, mais c'est tout de même un faisceau de présomptions.

Mon souci est beaucoup plus dans les nouveaux aliments à visées nutritionnelles, c'est-à-dire ceux qui ont exprimé les protéines étrangères en quantités plus importantes comme apports pour augmenter la « valeur santé ». Il se réfère également à la nouvelle génération de plantes transgéniques développées qui expriment plusieurs caractéristiques donc plusieurs protéines étrangères à la fois. Là, le problème sera beaucoup plus ardu et important qu'il ne l'est actuellement.

Au sujet de la traçabilité, une importante évolution se met en place. Auparavant, les gens disaient traçabilité égale étiquetage, et étiquetage égale gestion du risque. La gestion du risque n'est pas le problème des scientifiques c'est celui des administratifs et des politiques avec toutes les luttes d'influence commerciales et autres qu'il peut y avoir.

Petit à petit, les positions évoluent dans les esprits. Il est vrai que l'étiquetage reste un outil de gestion du risque, mais la traçabilité est également un élément d'évaluation du risque, dans la mesure où c'est un outil absolument indispensable pour pouvoir évaluer les effets potentiels à long terme et notamment les effets non-intentionnels donc non-recherchés.

Pour appréhender l'évaluation de ces risques, on peut développer des méthodes sophistiquées, mais finalement il faudra bien faire des enquêtes de type épidémiologique sur le terrain. Pour faire de l'épidémiologie, on a besoin de savoir ce que les gens mangent et pour ce faire on a besoin d'une traçabilité. Peu à peu cela va rentrer dans les esprits et dans les textes.

**Pierre Besançon** — Je vais d'abord répondre à la deuxième partie de la question de M. Séralini.

Dans le cas du maïs, il n'est pas sûr qu'il ait été fait un test de tolérance de 90 jours sur le rat. Nous avons parfois l'opportunité d'avoir accès à des résultats d'essais zootechniques en vraie grandeur qui valent un test de 90 jours sur le rat.

Donc, vaut-il mieux avoir un test sur le rat ou un test sur des animaux domestiques à condition de pratiquer des protocoles d'expérimentations rigoureuses ?

Concernant les insecticides, il y a deux problèmes différents. Nous nous interrogeons sur le fait de savoir comment évaluer la sécurité, pour ne pas dire la toxicité, d'un aliment dans lequel on ne sait pas où chercher un produit toxique, s'il y en a un par hasard. Dans ce cas, on a recourt à un test de tolérance. Il est évident que si on a accès à des essais zootechniques et une expérience de longue durée sur poulets, porcins ou autres animaux qui ont consommé ces produits, cela vaut un certain nombre de tests de tolérance réalisés en laboratoire.



## DISCUSSION GÉNÉRALE – CLÔTURE DU SÉMINAIRE

**Bernard Chevassus-au-Louis** — Je vous propose maintenant d'élargir la discussion à l'ensemble de la journée, en particulier sur le thème : « *Y a-t-il un certain nombre de recommandations, d'études à promouvoir, d'orientations à faire connaître pour aller vers une meilleure évaluation des risques dans ce domaine ?* »

De manière générale et par rapport aux missions de l'agence, y a-t-il des interventions sur l'ensemble de cette journée ?

**Marie-Hélène Vergot - Centre d'Information des Viandes** — A l'AFSSA, envisage-t-on de développer la problématique suivante ?

Y a-t-il des projets de développer les questions que l'on pourrait se poser autour des animaux d'élevage qui consomment des produits OGM et les répercussions sur la qualité de leur viande ?

**Bernard Chevassus au Louis** — Désormais, l'AFSSA aura à connaître des dossiers OGM sous l'angle alimentaire. Effectivement la question, « que se passe-t-il quand des animaux vont consommer des OGM ? », rentrera dans les questions qui devront être examinées. Cela rejoint le débat qui s'est récemment tenu, à savoir « quels modèles d'animaux faut-il tester directement sur des animaux de rente ? » « Y a-t-il des modèles animaux qui permettraient d'aller plus vite ? »

Autant la toxicologie a ses animaux et ses méthodes de référence, autant les tests *in vivo* sur des aliments doivent trouver de nouvelles normes et références. Nous aurons probablement à travailler sur ce sujet de manière plus approfondie que le bref échange qui a eu lieu.

**Jean-Michel Wal** — La CIAAA, qui maintenant est rattachée à l'agence, a proposé des lignes directrices pour l'évaluation des OGM en tant qu'aliments pour animaux qui sont un peu le pendant des lignes directrices présentées par Pierre Besançon pour l'alimentation humaine. Cette question a donc été prise en compte.

Nous sommes même plus en avance au niveau français qu'on ne l'est à celui de Bruxelles où il y a un règlement « novel food », c'est-à-dire pour les nouveaux aliments destinés à l'alimentation humaine, mais pas encore un règlement « novel feed », c'est-à-dire pour l'alimentation **des** animaux. Un tel règlement est en préparation.

**Marc Férous** — Il est évident que les effets que nous allons rechercher sont subtils ; les gros effets ont été éliminés. Nous allons donc chercher des effets subtils, variables dans la quantité et d'un individu à l'autre. Cela fera appel à l'outil d'épidémiologie et j'ignore si vous avez ces outils. L'INSERM a soulevé la question sur l'effet d'environnement sur les risques de cancers dans les populations. Aujourd'hui, nous n'avons pas les moyens de prédire si l'augmentation de cancers dans les populations est liée à quelque chose due à l'environnement, médicaments, irradiations, etc.

Avez-vous prévu ces outils d'épidémiologie à développer, et même s'ils sont prévus, va-t-on pouvoir répondre à nos interrogations ?

La réponse que je peux vous donner au sujet de l'environnement et cancer, est qu'à ce jour les épidémiologistes disent ne pas avoir les outils pour les analyser tellement les effets sont subtils.

**M<sup>me</sup> Monier - Ministère de l'Agriculture et de la Pêche/DGER** — Compte tenu de la présentation faite aujourd'hui, êtes-vous en mesure d'identifier des priorités en termes de travaux scientifiques à conduire et si oui, qui est en mesure, d'après vous, de les conduire ?

**Michel Thibier** — Je reviendrai sur ce point dans la conclusion que je me proposais de vous présenter dans un instant, sur les différentes réflexions que m'ont inspirées les diverses présentations de la journée.

Ce séminaire entre dans la mission que m'a confiée Martin Hirsch. Dans cette mission, il y aura effectivement un certain nombre de recommandations. A l'évidence, je peux, sans avoir encore écrit la moindre ligne en termes de recommandations, prévoir qu'il y en aura visant à diversifier la nature des investigations à mettre en route pour répondre aux questions posées cette après-midi.

**M<sup>me</sup> Delabrose - Confédération du Logement et de la Consommation/Maison de Rennes** — Je suis au titre de membre de la cohorte qui répond depuis 10 ans aux enquêtes et aux questions posées par M<sup>me</sup> Clavel-Chaplon dans le cadre de la recherche « EPIC » *European Prospective Investigation* pour le cancer.

Avec les huit autres pays européens, nous répondons à des questions. Il y a six ans, j'ai personnellement répondu aux questions portant sur l'alimentation, nous avons répondu à celles sur le cancer, mais aussi pour d'autres maladies.

Nous avons eu à répondre à un questionnaire très long sur l'alimentation. Par département, nous avons été convoqués pour dire si nous acceptions de donner de notre sang pour qu'il parte par container à Lyon et nous avons encore des entretiens avec des diététiciennes sur l'alimentation.

Quand on répond à ces questionnaires, des questions portent sur les aliments que l'on consomme, à savoir si ce sont des aliments de type alimentation méditerranéenne ou autres et s'ils sont équilibrés. On ne se soucie jamais des résidus qu'il y a dans nos aliments.

J'ai envoyé à M<sup>me</sup> Clavel-Chaplon à Villejuif une photocopie de tous les articles de journaux que j'ai trouvés dans la presse car je vis en Bretagne où nous sommes abreuvés de résidus phytosanitaires dans les plantes. Notre eau, notre air, nos sols sont pollués en nitrate, en pesticides, et nous les consommateurs sommes sensibles au fait que nous sommes une des régions de France où il y a le plus de cancer.

Avec de nombreuses autres associations bretonnes, j'ai demandé qu'un registre épidémiologique pour l'ensemble des cancers soit fait pour la Bretagne, quelques registres se mettent en place mais c'est récent.

**Bernard Chevassus-au-Louis** — Un des problèmes que nous aurons dans l'agence est d'avoir des tables de composition des aliments qui soient plus fines que le fait de dire que la pomme de terre partout en France a telle composition. Si on veut commencer à faire de l'épidémiologie dans ces domaines, nous aurons besoin de ces informations.

**Pierre Besançon** — Pour reprendre la remarque de M. Félous, l'approche épidémiologique est capitale et très puissante dans ce domaine. Si le C2I2A ou l'EPIC se penchent sur ce sujet, c'est que l'on n'est pas sûr actuellement que la prévalence de certains cancers soit plus due à des résidus de xénobiotiques qui seraient toxiques et cancérigènes ou à des modes et déséquilibres alimentaires. Les réponses au plan épidémiologique montrent que les déséquilibres nutritionnels devraient plus souvent être mis en cause que les seuls résidus de xénobiotiques. C'est l'intérêt de cette étude épidémiologique. Elle n'exclut pas de revoir des tables de composition, de revoir nos connaissances sur les substances considérées comme des xénobiotiques dans l'alimentation, mais il faut remettre également en cause ce que l'on va découvrir sur le rôle des équilibres alimentaires dans certains phénomènes de pathologies, maladies cardio-vasculaires et phénomènes de cancérogenèse.

**Daniel Peper** — Nous avons parlé de test de tolérance, de dose journalière admissible, d'équivalence en substance, de seuil pour étiqueter les OGM. On voit bien qu'il y a un conflit économique au regard d'une attente des consommateurs, nous semble-t-il, que l'on veut taire quoi qu'il arrive.

Nous sommes sensibles au fait que la recherche va pouvoir permettre des progrès et faire cette continuité de progression d'humanité, mais à un moment donné un consensus doit se faire entre les consommateurs et les chercheurs pour qu'à un moment donné, la recherche, qui consulte en amont et qui intègre l'avis des consommateurs, fasse que les efforts économiques faits par tous les acteurs produisent des résultats car justement les consommateurs vont répondre positivement à tous les efforts réalisés.

Il y a deux domaines de recherches qu'il faudrait développer :

Premièrement, celui de la traçabilité. La traçabilité telle qu'on la pratique est très lourde et complexe. Il y a donc de la recherche à faire dans ce domaine pour faire en sorte que l'on puisse identifier le cheminement des produits dans une économie mondialisée.

Deuxièmement, celui de l'épidémiologie, il s'avère que l'on manque cruellement en France d'endroits où l'on centralise les données statistiques. Pourtant dans ce domaine de l'épidémiologie, il y a des choses extraordinaires à réaliser. J'ai proposé que l'on fasse des suivis de population dans beaucoup de domaines. Cela pourrait faire des sujets de recherches fabuleux si on prenait des populations géographiquement localisées ou pas et qu'on les suive pendant 20 ans, 30 ans ou 50 ans. Là, des travaux considérables pourraient permettre de répondre à un certain nombre de questions, à des affirmations considérées comme des *a priori*. Quand au bout d'un séminaire ou pour clôturer 20 ou 25 ans de recherche on dit que scientifiquement, ce n'est pas répétable, ce n'est donc pas démontré.

Il faut sortir de ces conclusions qui ne satisfont personne et effectuer des travaux très lourds, je l'avoue, mais il en va de nos économies et de la crédibilité des consommateurs vis-à-vis du monde scientifique.

**Bernard Chevassus-au-Louis** — Cette agence est au service de l'ensemble de ses consommateurs. L'objectif est de leur assurer le maximum d'informations et d'évaluations et pas du tout de faire un forcing technologique. Le dialogue qui s'amorce aujourd'hui va s'amplifier, c'est dans notre philosophie.

**Marie-Christine Delmas - I V S** — La surveillance épidémiologique existe en France et produit des résultats.

**Michel Thibier** — Un des objectifs de la journée était d'identifier certaines questions dont les réponses étaient ou non acquises.

Nous sommes dans un espace très dynamique, qui est celui des biotechnologies de la reproduction. On s'aperçoit qu'au fur et à mesure que se déroulent les générations, à chacune d'entre elles, il y a un petit « plus » technologique maîtrisé et utilisé par l'homme. On voit la progression de l'acquis et en même temps l'ampleur des questions qui restent posées sans réponse pertinente pour le moment.

Les deux premières générations, qui sont celles de l'insémination artificielle et du transfert embryonnaire, sont très largement utilisées. Cela a été clairement montré ce matin. Cela a été un bienfait indiscutable pour l'humanité et par ailleurs a fortement contribué à assainir la population animale des espèces considérées en contribuant à l'éradication d'un certain nombre de maladies dont certaines contaminantes pour l'Homme (zoonoses).

On arrive alors, au début de la troisième génération avec, en particulier, la fécondation *in vitro* et le transfert nucléaire qui recourent à une culture *in vitro* pendant quelques jours de ce produit de conception particulier qu'est le conceptus. Puis, pour le transfert nucléaire, on assiste à ce changement drastique d'environnement du génome et du noyau qu'est le nouveau cytoplasme qui lui est étranger.

Concernant la fécondation *in vitro*, étant donné l'ordre de grandeur des embryons et des produits déjà consommés, on voit que c'est désormais largement diffusé sans aucun caractère alarmiste. La Hollande, qui est un des pays d'Europe qui utilise le plus largement ces techniques, a donné dans sa réglementation, la faculté de l'introduire dans la chaîne alimentaire.

Concernant le transfert de noyau, à l'évidence il y a là une problématique tout à fait passionnante et que Thierry Heidmann en particulier a souligné lorsqu'il a évoqué les problèmes de rétrovirus endogènes (attention à ne pas les confondre avec les rétrovirus exogènes, dits classiques, il m'a paru au cours de la discussion de cette après midi avoir cerné quelques confusions). Le scénario catastrophe est extrêmement peu probable, cependant cette technique n'en est encore qu'au stade de recherche. Le transfert nucléaire semble être promis à un développement, en dehors de ses vertus pour la recherche pure, intimement lié à l'outil de la quatrième génération qui est la transgénèse. Par conséquent, c'est l'évaluation des risques liés au couple de ces deux techniques, qui délimitera les conditions dans lesquelles cela pourrait être utilisé.

Nous avons noté l'application très rigoureuse du « concept de précaution » de la part de l'INRA qui, compte tenu des circonstances socio-politiques, a estimé nécessaire d'éviter de faire entrer dans la chaîne alimentaire les produits dérivés du clonage de cellules somatiques, qui sont en effet issus de cellules reprogrammées.

Je le comprends, mais pour moi cela n'a pas de valeur scientifique, *stricto sensu*, quant aux risques ou aux précautions à prendre. C'est sans doute sage mais cela n'implique pas une crainte particulière. En revanche, il y a plusieurs interrogations posées et largement évoquées au cours de ce colloque quant à l'évaluation des risques. Donc sûrement, Madame Monnier, pour répondre à votre question, des investigations seront à conduire pour pouvoir éclairer les zones qui ne sont pas encore pleinement explorées. Il est encore trop tôt pour les désigner distinctement et encore plus pour les « prioritariser », disons hiérarchiser, pour ne pas de créer de néologisme inutile.

Au sujet de la transgénèse, c'est un secteur enthousiasmant qui verra le jour dans les trois directions évoquées ce matin qui sont, tout d'abord, le « biopharming », c'est-à-dire la production de molécules à activité pharmacologique ou pharmaceutique sécrétées par des glandes efficaces en quantité de matière sécrétée, comme la mamelle ou l'œuf. Deuxième piste particulière que sont les xénogreffes, et les greffes d'organes ou de cellules ou de collection d'organes qui seront des applications particulières dans le domaine médical et dont on peut penser que la valeur de l'animal, en tant qu'animal consommé, sera tellement négligeable qu'elle n'entrera pas en ligne de compte.

Il y a aussi les applications zootechniques. Des poissons seraient déjà prêts à être mis sur le marché dans certains pays (Cuba, par exemple). Il y a d'intéressantes pistes concernant les porcs. Pour ce qui a trait à la filière des oiseaux, il y avait des études initiales, relatives à la résistance aux maladies qui semblaient également très intéressantes et qui n'ont malheureusement pas progressé ces derniers mois, semble-t-il. Toutefois, on peut penser qu'elles ont un intérêt important, par exemple si on trouvait un gène de résistance à la salmonelle, ce serait bien...

Je pense aussi à des voies non évoquées aujourd'hui et tout à fait innovatrices et qui pourraient consister à renforcer la sécurité sanitaire des aliments, par exemple par l'insertion de gènes susceptibles d'engendrer l'expression de protéines particulières du groupe des défensines et autres molécules dont on sait qu'elles contribuent à réduire la pollution bactériologique dans son environnement immédiat, depuis l'abattoir jusqu'aux usines de transformations.

Il y a là de nombreuses et diverses applications qui feront que, de toute façon, ces techniques arriveront. Nous avons la chance d'être en avance sur les événements, ces produits ne seront pas livrés sur le marché avant quelques années, voire quelques décennies... Nous avons donc le temps d'apprendre et de mettre en œuvre les leçons que nous pouvons retirer de nos collègues qui ont travaillé sur les végétaux, de façon à ce qu'il n'y ait pas ce décrochage observé ces derniers mois.

L'AFSSA s'est saisie de cette problématique, elle a commencé à réfléchir en toute transparence. Cela devrait contribuer à un rapport qui lui-même sera, non seulement rendu public, mais aussi fera l'objet j'en suis sûr, d'investigations, de réflexions et de commentaires complémentaires avant que la société ne puisse bénéficier, avec des risques réduits au minimum, de ce mode de production.

Merci à tous les participants, en particulier à tous ceux encore présents à cette heure avancée de la journée. Merci aux conférenciers et Merci à l'équipe de la communication de l'AFSSA pour son aide efficace tout au long de ce colloque. Merci à Madame la Secrétaire d'État à la Santé, de nous avoir offert l'opportunité de travailler dans le superbe amphithéâtre de son Ministère.



