



Organisation des Nations Unies
pour l'alimentation et l'agriculture



Organisation mondiale de la Santé

**Consultation d'experts FAO-OMS
sur l'évaluation de la sécurité sanitaire
des aliments d'origine animale dérivés des biotechnologies**

**Siège de l'Organisation mondiale de la Santé,
Genève, Suisse, 26 février – 2 mars 2007**

RAPPORT

Le présent document ne constitue pas une publication officielle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) ni de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), qui s'en réservent tous les droits. Il peut cependant être librement analysé, résumé, reproduit et traduit, en tout ou en partie, à l'exclusion de toute vente ou de tout usage de nature commerciale.

Les vues exprimées dans ce rapport sont celles des participants à la Consultation, et n'impliquent aucune opinion de la part de l'OMS ou de la FAO.

© FAO et OMS 2007

Table

	Page
Résumé d'orientation	iii
1. Introduction.....	1
2. Contexte.....	1
3. Champ de la Consultation.....	2
4. Gènes marqueurs et rapporteurs	3
4.1 Introduction.....	3
4.2 Discussion principale.....	4
5. Applications non héritables.....	9
5.1 Introduction.....	9
5.2 Contexte.....	9
5.3 Discussion principale.....	10
6. Conclusions.....	23
6.1 Conclusions concernant les gènes marqueurs et rapporteurs.....	23
6.2 Conclusions concernant les applications non héritables.....	24
7. Recommandations.....	25
7.1 Recommandations concernant les gènes marqueurs et rapporteurs.....	25
7.2 Recommandations concernant les applications non héritables.....	25
8. Références.....	27
9. Glossaire.....	30
ANNEXE 1: Liste des participants.....	32
ANNEXE 2: Liste des documents.....	34

Résumé d'orientation

Une réunion mixte d'experts FAO-OMS sur la sécurité sanitaire des aliments d'origine animale dérivés des biotechnologies s'est tenue au Siège de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), à Genève, du 26 février au 2 mars 2007. Cette réunion avait pour objectif d'apporter à la FAO, à l'OMS et à leurs États membres des avis scientifiques sur deux ensembles de questions concernant : 1) les gènes marqueurs et rapporteurs; et 2) les applications non héritables. Le Groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies avait spécifiquement demandé des avis à ce propos. La présente Consultation s'est appuyée sur les conclusions et recommandations émises par la Consultation mixte d'experts FAO-OMS sur la sécurité sanitaire des aliments issus d'animaux génétiquement modifiés, y compris les poissons (FAO/OMS 2003).

Nombre de gènes marqueurs (rapporteurs et de sélection) sont couramment employés sur les végétaux et les animaux de laboratoire, et désormais dans les produits alimentaires d'origine animale. On utilise aujourd'hui quelques gènes marqueurs et rapporteurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques afin de produire des animaux à ADN recombiné destinés à la consommation, et on ne dispose d'aucune étude portant sur leur sécurité sanitaire. Il serait souhaitable de développer de nouveaux gènes marqueurs de sélection qui ne confèrent pas de résistance à des antibiotiques.

On sait comment éliminer certaines séquences précises de l'ADN, à l'aide de "systèmes d'excision de l'ADN"; ces techniques sont efficaces, et après avoir été utilisées sur l'animal de laboratoire elles commencent aujourd'hui à être mises en œuvre sur l'animal de consommation. Il est fermement conseillé de poursuivre la validation et le développement des techniques d'excision de l'ADN. Les animaux à ADN recombiné destinés à l'alimentation devraient être exempts des gènes introduits pour induire l'excision des gènes marqueurs, afin de réduire à un minimum le risque d'effets inattendus. Il est nécessaire de pousser plus avant la recherche en matière de sécurité sanitaire des gènes marqueurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques, ainsi que celle concernant les systèmes d'excision de l'ADN.

Les constructions d'ADN recombiné apportées aux animaux peuvent être à but héritable ou non-héritable. On peut ainsi employer des constructions non héritables pour améliorer la production ou la santé animales, ou pour la prévention de maladies par l'administration de vaccins utilisant de l'ADN recombiné. Les constructions héritables peuvent être intégrées au génome des cellules somatiques.

À l'égard de la sécurité sanitaire des aliments, les différences entre les constructions d'ADN recombiné ne se définissent pas selon leur caractère héritable ou non héritable, mais selon qu'elles s'intègrent au génome ou demeurent épisomiques. La différence de qualité fondamentale pour les risques de consommation alimentaire que présentent les animaux génétiquement modifiés, comportant des séquences héritables ou non héritables, réside dans le maintien ou non chez ces animaux d'excipients facilitant la transmission de constructions non héritables.

Les différences quantitatives pour la santé animale et la consommation alimentaire sont liées au potentiel accru que possèdent les constructions maintenues au niveau épisomique de participer à une transmission horizontale des gènes, et éventuellement de se recombiner pour engendrer des séquences virales fonctionnelles. Les récentes évolutions concernant les vecteurs épisomaux non viraux fournissent les moyens de surmonter un grand nombre des problèmes liés aux systèmes de vecteurs à base virale.

Il est recommandé de poursuivre les recherches visant à apprécier si la sécurité sanitaire des aliments est affectée par l'emploi de séquences virales dans les constructions, et par les effets potentiels des transferts horizontaux de matériel génétique. Il conviendrait d'élaborer une directive encadrant les questions de santé animale concernées, et notamment la sûreté d'utilisation des vecteurs dérivés des virus. L'Organisation internationale des épizooties (OIE) serait une instance adaptée à l'élaboration d'une telle directive.

Il existe une interdépendance entre la santé animale et la sécurité sanitaire des aliments pour la consommation humaine ou pour les animaux, en ce qui concerne les animaux à ADN recombiné. Une importance particulière doit être accordée à résoudre d'urgence et pleinement les problèmes de santé animale et de sécurité sanitaire des aliments que posent les applications potentielles des vaccins à ADN recombiné, qui constituent un type de construction non héritable. Il est donc essentiel que les organismes compétents tels que la FAO, l'OMS et l'OIE travaillent en collaboration pour traiter de façon adéquate les relations mutuelles qui régissent ces questions.

1. Introduction

Une réunion mixte d'experts FAO-OMS sur la sécurité sanitaire des aliments d'origine animale dérivés des biotechnologies s'est tenue au Siège de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), à Genève, du 26 février au 2 mars 2007. Dix-huit experts au total ont pris part à cette consultation. La liste complète des participants figure en Annexe 1.

Mme Susanne Weber-Mosdorf, Sous-Directeur général, Groupe Développement durable et milieux favorables à la santé (OMS), ouvre la Consultation au nom du Directeur général de l'OMS et de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).

Dans ses remarques préliminaires, elle rappelle que l'OMS et la FAO apportent des avis scientifiques et des conseils techniques aux États Membres et à la Commission du Codex Alimentarius en vue d'améliorer globalement la sécurité sanitaire des aliments et de protéger la santé humaine, tout en renforçant la confiance des consommateurs envers l'innocuité des produits alimentaires.

Il est indiqué que, si l'on reconnaît que les biotechnologies modernes pourront contribuer directement et indirectement à favoriser la santé humaine et le développement, leur utilisation pourrait aussi présenter des risques éventuels pour la santé humaine et/ou pour le milieu. Il est donc nécessaire de mettre en place un système commun, à bases factuelles, en vue de faciliter une évaluation cohérente de la sécurité sanitaire des aliments dérivés des biotechnologies modernes.

La Consultation élit le Professeur Anne R. Kapuscinski à la présidence, et désigne le Dr Lisa Kelly en tant que Rapporteur. Elle décide en outre de créer deux groupes de travail pour la session : un Groupe de travail A sur les questions relatives aux gènes rapporteurs et marqueurs, et un Groupe de travail B traitant des problèmes liés aux applications non héréditaires.

Pour le Groupe de travail A, la Consultation désigne le Professeur Heiner Niemann en tant que Modérateur, et le Professeur Kaare M. Nielsen en tant que Rapporteur. Pour le Groupe de travail B, la Consultation désigne le Dr Larisa Rudenko en tant que Modérateur, et le Professeur Martin O. Makinde en tant que Rapporteur.

Tous les participants ont déposé une Déclaration d'intérêts, conformément aux procédures définies par la FAO et l'OMS.

2. Contexte

À sa 27^{ème} session, la Commission du Codex Alimentarius a reconstitué le Groupe spécial intergouvernemental sur les aliments dérivés des biotechnologies (Groupe spécial du Codex), chargé d'élaborer des normes, directives ou autres principes, selon le cas, pour les aliments issus de biotechnologies modernes.

Le Groupe spécial du Codex, à sa sixième session tenue du 27 novembre au 1er décembre 2006, s'est penché sur un projet de directive provisoire régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés d'animaux à ADN recombiné" ("Proposed Draft Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals"), et est convenu de demander à la FAO et à l'OMS un avis scientifique sur deux ensembles de questions¹ :

¹ ALINORM 07/30/34

- **Gènes marqueurs et gènes rapporteurs**
 - *Quels sont les faits nouveaux concernant la mise au point et l'utilisation de gènes marqueurs et de gènes rapporteurs sélectionnables?*
 - *Y a-t-il des gènes marqueurs ou rapporteurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques dont l'innocuité pour l'homme dans les aliments a été démontrée, et dans l'affirmative, quels sont-ils?*
 - *Lorsque l'on entend éliminer des séquences spécifiques d'ADN, existe-t-il des techniques fiables et sans danger pour le faire systématiquement ?*
- **Applications non héritables²**
 - *Y a-t-il des différences importantes du point de vue de la sécurité sanitaire des aliments entre les animaux ayant des caractères héréditaires et ceux qui n'en présentent pas, et si oui, quelles sont-elles?*
 - *Y a-t-il des questions spécifiques concernant la sécurité sanitaire des aliments (par exemple concernant les types de vecteurs) qui devraient être examinées par rapport à l'évaluation de la sécurité sanitaire d'aliments contenant des caractères héréditaires par rapport à ceux qui n'en ont pas?*

La FAO et l'OMS, tout en reconnaissant l'utilité des résultats obtenus par la Consultation mixte d'experts FAO-OMS sur la sécurité sanitaire des aliments issus d'animaux génétiquement modifiés, y compris les poissons (FAO/OMS 2003), ont décidé de procéder à cette consultation afin d'approfondir les questions directement liées aux travaux entrepris par le Groupe spécial du Codex, et de répondre à chacune des questions posées ci-dessus.

Le mandat de la Consultation consistait à apporter une réponse aux questions ci-dessus, et à traiter de sujets relatifs à l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments d'origine animale issus des biotechnologies modernes, d'un point de vue scientifique.

3. **Champ de la Consultation**

La Consultation s'est avant tout attachée à répondre aux questions ci-dessus, soulevées par le Groupe spécial du Codex. Ce faisant, la Consultation s'est penchée sur les utilisations connues des gènes marqueurs et rapporteurs, et sur les différences entre les applications héritables et non héritables chez les animaux à ADN recombiné susceptibles d'entrer dans la chaîne alimentaire humaine. Les débats ont pris en compte les données scientifiques concernant l'emploi de ces techniques sur les animaux terrestres, tels que la volaille et le bétail, et sur les animaux aquatiques tels que les poissons d'élevage. À propos des applications non héritables, la Consultation s'est principalement efforcée de présenter une approche pour l'évaluation de la sécurité sanitaire de différentes applications, étape préliminaire à toute évaluation du risque. Elle ne s'est livrée à l'évaluation complète d'aucune application spécifique.

La Consultation a pris note des résultats de la précédente Consultation d'experts sur les animaux génétiquement modifiés (FAO/OMS 2003) et s'est appuyée sur ses conclusions et recommandations. Ainsi, l'approche globale de la sécurité sanitaire des animaux à ADN recombiné implique une évaluation comparée de la sécurité de l'animal à ADN recombiné par rapport à un comparateur approprié, comprenant une appréciation de l'apport alimentaire et une évaluation nutritionnelle et toxicologique intégrée, suivies d'une caractérisation complète des risques.

² Le terme d'"applications non héritables" recouvre l'introduction directe d'acides nucléiques dans le tissu non germinale d'animaux qui entreront dans les rations alimentaires.

La Consultation a observé que certaines applications de gènes marqueurs et rapporteurs et de constructions génétiques non héréditaires pourraient poser la question de leurs effets sur la santé ou le bien-être de l'animal à ADN recombiné, ou sur la sécurité pour la santé animale d'aliments pour animaux eux-mêmes issus d'animaux à ADN recombiné (par exemple dans le cas des aliments pour poissons dérivés de poissons génétiquement modifiés). Ces sujets étant hors du champ de la Consultation, ils devraient être traités par les organismes compétents tels que l'OIE et la FAO. La Consultation a également pris note, sans tenter de la résoudre, de la question de la sécurité sanitaire des animaux nourris à l'aide d'aliments eux-mêmes dérivés d'animaux à ADN recombiné.

Les définitions des termes importants aux fins de cette Consultation sont énumérées dans le glossaire.

4. Gènes marqueurs et rapporteurs

4.1 Introduction

Les premiers animaux domestiques à ADN recombiné ont été produits voici plus de 20 ans, par des micro-injections d'ADN étranger dans les pronuclei du zygote. En dépit d'importantes difficultés, comme leur faible efficacité, leur intégration aléatoire et les niveaux variables de l'expression génétique, des modèles d'application prometteurs ont été développés dans les domaines de l'agriculture et de la biomédecine (Niemann *et al.*, 2005). Parmi les diverses alternatives méthodologiques élaborées en vue de surmonter les limites de la technologie par micro-injection, c'est le transfert nucléaire de cellules somatiques (SNCT) qui présente le plus fort potentiel pour améliorer de façon sensible, en qualité et en quantité, la production d'animaux domestiques à ADN recombiné. Il s'agit en particulier ici d'une présélection des cellules transfectées avant leur utilisation pour le SNCT, et de la possibilité d'obtenir une modification génétique ciblée grâce à une recombinaison homologe. À ce jour, le SNCT s'est montré efficace sur onze espèces animales (Niemann et Kues, 2001; Niemann *et al.*, 2005). Cette technologie s'améliore constamment depuis une dizaine d'années, et on l'emploie aujourd'hui pour produire à l'aide d'ADN recombiné des bovins, des porcins, des caprins et des ovins. L'efficacité globale en demeure toutefois insuffisante, et un certain nombre des clones, notamment chez les bovins et ovins, souffrent de pathologies ("syndrome du gros veau" ou LOS, par exemple) dont on pense qu'elles seraient provoquées par des échecs dans la reprogrammation épigénétique du noyau somatique transféré. On n'observe pas ces pathologies chez le rejeton de l'animal cloné.

Il existe aujourd'hui plusieurs technologies qui permettent d'introduire ou de supprimer des gènes comportant des fonctions et produits connus chez les animaux domestiques à ADN recombiné, qui seront prochainement à même d'entrer dans la chaîne alimentaire. Avec l'avènement du SNCT, il est devenu possible d'employer des outils moléculaires qui autorisent des modifications précises du génome. Parmi ces technologies figurent l'intégration chromosomique ciblée par des recombinases sur des sites d'ADN spécifiques, et même des méthodes compatibles avec une expression transgénique contrôlée dans le temps et dans l'espace chez les animaux domestiques destinés à la production alimentaire. Ces instruments moléculaires ont été bien décrits au travers d'études approfondies menées sur la souris et d'autres systèmes biologiques (Niemann et Kues, 2003). Les premières séquences provisoires des génomes de certains animaux domestiques (canidés, bovidés, gallidés, équidés) sont d'ores et déjà disponibles, et d'autres devraient suivre sous peu.

La production réussie d'animaux à ADN recombiné à l'aide de techniques comme le SNCT dépend avant tout de la sélection des cellules transfectées, fondée sur l'emploi de gènes marqueurs et/ou rapporteurs appropriés. La précédente Consultation d'experts sur les animaux génétiquement

modifiés (FAO/OMS 2003) a recommandé d'éviter l'utilisation de séquences d'ADN non nécessaires dans la construction génétique, y compris pour les gènes marqueurs.

Le but de la présente Consultation était d'élargir cette évaluation et de traiter des questions suivantes relatives à la production alimentaire issue d'animaux à ADN recombiné :

- *Évolutions et utilisations récentes de gènes rapporteurs et sélectionnables dans la production alimentaire issue d'animaux à ADN recombiné;*
- *Disponibilité de gènes marqueurs ou rapporteurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques, et leur sécurité sanitaire dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine;*
- *Fiabilité et sécurité des techniques employées pour supprimer certaines séquences d'ADN déterminées.*

4.2 Discussion principale

4.2.1 Évolutions et utilisations récentes de gènes marqueurs rapporteurs et sélectionnables chez les animaux à ADN recombiné

Selon les espèces, on emploie des méthodes différentes pour produire des animaux à ADN recombiné. Ces méthodes sont les suivantes : 1) l'injection directe d'ADN dans les pronuclei ou le cytoplasme de l'embryon; 2) le transfert d'ADN à l'aide de vecteurs d'éléments transposables ou de vecteurs lentiviraux; 3) le transfert d'ADN par l'intermédiaire de sperme incubé avec de l'ADN; 4) le transfert d'ADN dans des cellules pluripotentes afin de produire des animaux transgéniques chimériques 5) le transfert d'ADN dans des cellules somatiques, afin de produire des animaux transgéniques clonés. Les méthodes de transfert d'ADN peuvent comprendre l'addition aléatoire ou ciblée de gènes, ou leur remplacement par recombinaison homologue. Par les méthodes 1, 2 et 3, l'efficacité pourra être telle que l'emploi de gènes marqueurs sélectionnables ne soit pas nécessaire. Ces derniers sont cependant indispensables pour cibler l'addition ou la substitution génétiques, ou lorsque de l'ADN étranger est transféré vers un grand nombre de cellules (méthodes 4 et 5).

Le transfert ciblé de gènes est rare, et exige souvent une sélection cellulaire à la fois positive et négative. La sélection positive consiste à éliminer les cellules dans lesquelles le gène auquel on s'intéresse n'est pas présent, et se réalise en général à l'aide de gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques. La sélection négative consiste à éliminer les cellules dans lesquelles le gène auquel on s'intéresse n'est pas intégré spécifiquement sur le site visé, et est facilité par des gènes qui expriment des substances cytotoxiques.

Dans le cadre de la présente Consultation, on a utilisé les définitions suivantes :

- a) On utilise un **gène marqueur** pour déterminer si une séquence d'ADN a été introduite avec succès dans la cellule animale. On emploie les gènes marqueurs aussi bien pour la sélection que pour le criblage.

b) Le gène **marqueur sélectionnable** est introduit dans les cellules animales pour leur conférer un trait permettant la sélection artificielle. Il protège la cellule contre les effets d'un agent sélectif qui, normalement, devrait la tuer ou empêcher sa croissance. Parmi les agents de sélection positive, on utilise le plus souvent des antibiotiques pour les cellules animales. Des exemples courants en sont la puromycine, l'hygromycine, la phléomycine (en sélection positive). Dans la sélection négative, on emploie des substances cytotoxiques telles que les dérivés du gancyclovir produit par thymidine kinase de l'*Herpès simplex*, ou la sous-unité A de la toxine cholérique.

On peut aussi trouver chez les animaux à ADN recombiné des gènes marqueurs engendrant une résistance à des antibiotiques comme l'ampicilline ou le chloramphénicol, en raison de leur usage fréquent dans la construction des vecteurs bactériens.

c) Les gènes marqueurs employés pour le criblage ou comme **rapporteurs** codent un produit aisément identifiable en nature et/ou en quantité. Les plus classiques sont la protéine à fluorescence verte (GFP), la bêta-galactosidase (bêta-gal), la phosphatase alcaline sécrétée (SEAP), les luciférases et la chloramphénicol acétyltransférase.³

Une autre classe de gènes **rapporteurs** est celle des gènes qui modifient la couleur de l'individu lorsqu'ils sont employés dans une démarche transgénique. Chez les vertébrés, la pigmentation visible résulte de la synthèse et de la répartition de la mélanine dans la peau et les yeux. La tyrosinase est un enzyme intermédiaire dans la production de mélanine par les mélanocytes. La mutation du gène tyrosinase est couramment la cause d'un phénotype que l'on rencontre de façon semblable chez tous les vertébrés, l'albinisme, lié à l'absence de pigment mélanique. Le phénotype de l'albinos a donc été corrigé avec succès par transfert du gène de la tyrosinase, en mesure d'exprimer de la tyrosinase active chez la souris et le lapin transgéniques (Beermann *et al.*, 1990; Aigner et Brem, 1993).

Une autre approche qui permet d'identifier et/ou de discriminer les cellules animales comportant de l'ADN introduit ou des protéines recombinées consiste à employer des séquences identifiées uniques d'ADN ou de protéines (séquences étiquettes, épitopes ou poly-histidines).

Les gènes marqueurs sont de plus en plus souvent employés chez les animaux à ADN recombiné destinés à l'alimentation. Les applications les plus récentes en sont les suivantes :

- Bovins à ADN recombiné dont le lait présente une composition en bêta et kappa caséine altérée, après sélection de cellules donneuses appropriées à l'ADN recombiné (Brophy *et al.*, 2003). On a employé une stratégie similaire pour produire des porcins à ADN recombiné présentant des altérations dans les acides gras, avec une tendance marquée vers un accroissement des acides gras poly-insaturés (Lai *et al.*, 2006). On a en outre produit des bovidés dépourvus par invalidation du gène du prion.
- Des constructions génétiques hébergeant un gène sélectionnable, gènes de résistance à la néomycine ou à la puromycine, et un gène marqueur (GFP), ont été transférés dans les cellules germinales primordiales (PGC) du poulet. Les cellules sélectionnées ont été injectées à des embryons précoces de poulets, donnant naissance à des animaux fluorescents (van de Lavoie *et al.*, 2006). Cette première tentative aboutie de produire des poulets à ADN recombiné ouvre la voie à des applications dans le domaine de l'élevage des volailles.

³ Le gène CAT confère aux bactéries une résistance au chloramphénicol, mais ne s'emploie que comme rapporteur dans la cellule animale.

- Le gène qui induit l'hormone de concentration de la mélanine (MCH) chez le saumon a été employé comme gène rapporteur pour produire du medaka à ADN recombiné dont le corps est de couleur blanche par amélioration de l'expression de la MCH (Kinoshita *et al.*, 2001). La MCH est un heptadécapeptide cyclique qui est produit par la glande pituitaire, elle concentre les granules de mélanine dans les mélanophores, et éclaircit la couleur du poisson. On a de même utilisé avec succès le gène marqueur de la tyrosinase pour produire des poissons à ADN recombiné (Hyodo-Taguchi *et al.*, 1997; Inagaki *et al.*, 1998).

4.2.2 Disponibilité des gènes marqueurs ou rapporteurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques, et leur sécurité sanitaire dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine

4.2.2.1 Disponibilité

La Consultation d'experts de 2003 sur les animaux génétiquement modifiés (FAO/OMS 2003) a recommandé d'éviter l'utilisation de séquences d'ADN non nécessaires dans la construction génétique, y compris pour les gènes marqueurs. Mais l'utilité avérée et les résultats constants des gènes de résistance aux antibiotiques ont amené à s'intéresser peu aux gènes marqueurs de substitution qui permettraient l'identification et la sélection positive des cellules transfectées. On dispose aujourd'hui d'une gamme de gènes marqueurs criblables (gènes rapporteurs) qui autorisent l'identification, mais non pas la sélection positive, de cellules animales à ADN introduit.

Parmi les plus classiques figurent la protéine à fluorescence verte (GFP), la bêta-galactosidase (bêta-gal), la phosphatase alcaline sécrétée (SEAP), les luciférases et le chloramphénicol acétyltransférase (CAT). Le gène de la GFP code une protéine qui émet un signal fluorescent sous des éclairages d'une longueur d'onde précise, *in vivo* ou *in vitro*, sans causer de dommages à la cellule. On utilise couramment les luciférases, qui nécessitent des substrats pour émettre des signaux lumineux. On peut les appliquer soit à des extraits cellulaires, soit à des cellules intactes, soit même à des tissus. En revanche, l'analyse de l'activité des bêta-galactosidases implique en général de fixer et de détruire les tissus.

4.2.2.2 Questions de sécurité

L'un des aspects importants dans l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments issus d'animaux à ADN recombiné est celui de la sécurité de toute protéine nouvellement exprimée, y compris celles qui sont exprimées par les gènes marqueurs subsistant dans l'organisme. Pour les gènes marqueurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques, l'évaluation se concentrera en général sur la sécurité sanitaire de la protéine exprimée, qui devra être déterminée au cas par cas. Selon la connaissance dont on dispose de la protéine exprimée, l'évaluation pourra varier entre une analyse limitée des données existantes concernant la fonction biochimique de la protéine et de son expression chez l'animal à ADN recombiné, et à l'autre extrême, dans le cas de protéines moins bien connues, une recherche de toxicité approfondie comprenant des études sur l'animal (FAO/OMS, 2003). Ces informations seront alors utilisées dans le cadre d'une évaluation globale de la sécurité sanitaire comparée afin de parvenir à une conclusion quant à la sécurité de l'aliment issu de l'animal génétiquement modifié.

L'évaluation courante de la sécurité sanitaire d'une protéine recombinée d'expression nouvelle comprendra les points suivants :

- composition et fonction biochimiques de la protéine;
- expression de la protéine chez l'animal à ADN recombiné (site d'expression, niveau d'expression, intégrité de la protéine exprimée);
- stabilité de la protéine vis-à-vis de la chaleur, et de la transformation du produit et de la digestion;
- évaluation toxicologique;
- allergénicité.

En fonction des résultats de l'évaluation, des études supplémentaires pourront être requises (études immunologiques par exemple).

On dispose d'un certain nombre d'études portant sur la famille de gènes rapporteurs GFP, notamment sur les végétaux à ADN recombiné, dont il est possible d'extrapoler certaines informations concernant la sécurité sanitaire des aliments. Quelques données sur la toxicité de la GFP ont été publiées. Quelques expériences sur des cellules animales transfectées (plasmides exprimant le gène de la GFP) tendent à indiquer que la GFP présente une certaine cytotoxicité (Liv *et al.*, 1999). On a pu obtenir des lignées d'animaux exprimant le gène de la GFP dans la plupart des espèces animales où la transgénèse est possible. Toutes ont survécu sans effets indésirables observés. La cytotoxicité de la GFP constatée in situ n'implique pas nécessairement que cette protéine soit toxique en administration orale. Chez des rats alimentés pendant 26 jours à l'aide de GFP pure ou de canola exprimant le gène de la GFP, on n'a observé aucune différence significative par rapport à un groupe contrôle en termes de croissance ou d'autres paramètres. La GFP se dégradait rapidement en présence de pepsine, et le rat la digérait presque complètement. Dans la séquence de la GFP, on n'a trouvé aucune ressemblance significative de séquence des acides aminés avec des allergènes connus, mais la Consultation a remarqué que la comparaison n'a été effectuée qu'avec environ la moitié des allergènes connus. Cette étude concluait que le gène de la GFP constituait un substitut en mesure de remplacer les gènes sélectionnables de résistance aux antibiotiques (Richards *et al.*, 2003). La Consultation est toutefois convenue qu'il serait nécessaire de mener d'autres études sur les fonctions et l'expression biochimiques de la GFP dans les tissus animaux, avant de tirer des conclusions fermes concernant sa sécurité sanitaire chez l'animal à ADN recombiné destiné à la consommation.

La Consultation n'a pu parvenir à aucune conclusion ferme non plus concernant la sécurité sanitaire de la bêta-galactosidase, de la phosphatase alcaline, de l'enzyme CAT ni de la luciférase exprimés dans les animaux à ADN recombiné, en raison du peu d'études publiées. Il est manifestement nécessaire de disposer de données sur la sécurité sanitaire de ces protéines, si l'on veut employer de tels gènes marqueurs pour développer des animaux à ADN recombiné destinés à la consommation.

Dans le cas des séquences peptidiques incorporées à des constructions génétiques afin de servir d'identifiants ou étiquettes spécifiques à la protéine recombinée, la Consultation a pris note que les études à entreprendre concernant la sécurité sanitaire de telles séquences doivent porter sur l'ensemble de la protéine de fusion, et non pas sur la seule séquence peptidique elle-même.

4.2.3 *Fiabilité et sécurité des techniques employées pour supprimer des séquences d'ADN spécifiques*

On connaît bien certains systèmes de recombinaison dans divers complexes bactériens ou fongiques, où des enzymes comme Cre, flippase ou R agissent sur des séquences cibles précises, telles que lox, FRT ou RS respectivement. Ces systèmes ont été adaptés à d'autres complexes biologiques; ils jouent déjà un rôle dans la production de végétaux à ADN recombiné, et commencent à être employés sur des cellules animales dans le but de fabriquer des animaux à ADN recombiné destinés à la consommation alimentaire. De tels systèmes de recombinaison se composent le plus souvent de trois éléments majeurs : deux paires de courtes séquences d'ADN (les séquences de recombinaison spécifiques du site) et un enzyme spécifique, à savoir la recombinase spécifique de ces séquences. Les modifications d'ADN par l'intermédiaire de recombinaisons comprennent l'excision spécifique au site, l'intégration, l'inversion et la recombinaison interchromosomique, ce qui ouvre la voie à une large gamme d'applications. On dispose ainsi de systèmes fonctionnels pour supprimer des séquences d'ADN non nécessaires, qui peuvent s'appliquer aux cellules animales.

Des informations ont été publiées sur la fonction du système recombinase Cre-lox. Les données concernant d'autres recombinaisons spécifiques de sites sont trop restreintes pour permettre d'évaluer leur efficacité et leur sécurité. On s'est interrogé sur les effets préoccupants non désirés de ces systèmes dans les cas où des niveaux élevés d'expression de la recombinase pourraient se traduire par des modifications du génome sur des sites cibles cryptiques. L'effet non désiré le plus important associé à l'emploi du Cre-lox est la tendance de la recombinase à induire des recombinaisons entre sites cryptiques lox dans les génomes des mammifères. On a trouvé des relations entre une forte activité de la recombinase et des aberrations chromosomiques (Loonstra *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2000). En outre, l'excision défectueuse de très grands morceaux d'ADN peut entraîner un autre ensemble de recombinaisons non ciblées. Ces effets non désirés peuvent également être associés à d'autres systèmes de recombinaison spécifiques de sites.

L'association d'éléments promoteurs spécifiques aux tissus avec la recombinase d'ADN Cre permet de réduire l'invalidation de gènes à un certain tissu ou type de cellule, et devrait donc jouer un rôle dans la production future de certains produits alimentaires. De fait, de récentes recherches montrent que l'excision des gènes peut se contrôler de façon plus précise en utilisant des promoteurs inductibles (par exemple un système inductible par la tétracycline) pour le gène de recombinase Cre ainsi que des formes actives inductibles de recombinase Cre (par exemple inductible par le 4-hydroxy tamoxiphène).

L'exemple suivant illustre la capacité du système Cre-lox à éliminer des gènes marqueurs sélectionnables chez l'animal à ADN recombiné. Les deux allèles de la PNRP et de l'immunoglobuline (Mu) ont été éliminés dans des cellules somatiques ensuite utilisées pour procéder à des SCNT afin de produire des bovins à ADN recombiné n'exprimant plus les gènes ciblés. Deux gènes marqueurs sélectifs positifs flanqués de séquences lox et d'un gène de sélection négative ont été employés pour obtenir les cellules nécessaires au SCNT. Les tests de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) ont confirmé que les gènes marqueurs étaient efficacement éliminés par le système de recombinaison spécifique au gène (Kuroiwa *et al.*, 2004). On n'a pas décelé d'effets nuisibles à la santé sur les bovins examinés par la suite (Richt *et al.*, 2007).

5. Applications non héritables

5.1 Introduction

Ces dernières années, des évolutions majeures sont intervenues dans la production d'animaux à ADN recombiné destinés à la consommation à l'aide de constructions héritables (HC) et de constructions non héritables (NHC).

Les animaux à ADN recombiné pourvus de constructions héritables sont produits par introduction de constructions d'ADN recombiné dans des embryons primitifs, des gamètes, et des cellules somatiques employées pour le transfert nucléaire de cellules somatiques, ou clonage (SCNT). En revanche, les animaux à ADN recombiné non héritable sont produits par introduction directe d'acides nucléiques dans les cellules somatiques de l'animal. Du fait que ces deux classes de constructions emploient des composantes et technologies différentes, elles peuvent engendrer des types de dangers différents et donc requérir des stratégies d'évaluation différentes de la sécurité sanitaire des aliments.

Comme l'impliquait le champ de cette Consultation, celle-ci a étudié si les animaux de consommation pourvus de constructions héritables et non héritables présentaient des risques différents pour la sécurité alimentaire, et le cas échéant la nature de ces différences.

Se fondant sur une évaluation des données scientifiques disponibles concernant les méthodes actuellement employées pour produire des animaux à ADN recombiné destinés à l'alimentation pourvus de constructions héritables et non héritables, ainsi que sur une analyse des méthodes présentées dans le Projet de directive provisoire pour la conduite des évaluations de la sécurité sanitaire des aliments dérivés d'animaux à ADN recombiné, en cours d'élaboration par le Groupe spécial du Codex, la Consultation s'est efforcée d'établir si des évaluations différentes de la sécurité sanitaire devraient être menées sur les aliments issus d'animaux à ADN recombiné produits par HC et NHC.

5.2 Contexte

Bien que l'on puisse utiliser des instruments moléculaires et éléments génétiques similaires dans des applications génétiques héritables et non héritable, il existe d'importantes différences entre les deux classes.

En général, les animaux à ADN recombiné pourvus de HC sont produits à l'aide de l'une des trois méthodes qui se caractérisent dans leurs grandes lignes comme suit : la micro-injection dans des embryons primitifs, le SCNT de cellules donneuses transgéniques, ou l'introduction d'ADN recombiné dans les gamètes (le plus souvent dans les spermatozoïdes) (Smith, 2002; Lavitrano, et al. 2003; Sorrell *et al.*, 2005; Wheeler, 2007). Les animaux à HC sont souvent produits afin de renforcer leurs caractéristiques de production telles que la croissance, de modifier leurs besoins nutritionnels, d'améliorer la composition des carcasses ou la production de lait ou de laine, d'améliorer l'efficacité de la conversion des aliments pour animaux, de la cicatrisation ou des traitements, et pour développer des résistances à certaines maladies animales, notamment celles susceptibles de provoquer chez l'homme des maladies d'origine alimentaire (recension de Kopp *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006; Kochhar and Evans, 2007; Wheeler, 2007).

Les animaux à ADN recombiné pourvus de NHC peuvent être produits par des moyens physiques et chimiques (par exemple la micro-injection, l'électroporation, les méthodes de bombardement génétique (biolistique), les liposomes). La plupart de ces méthodes supposent la présence d'excipients (matériaux servant de vecteurs) associés à leur administration. Par exemple, les moyens chimiques tels que la transfection par liposomes implique par définition la présence de liposomes; les bombardements génétiques impliquent d'associer les constructions d'ADN

recombiné à des particules métalliques souvent en or. Ces applications d'animaux recombinés à NHC sont semblables à celles des animaux à HC, et portent sur les caractéristiques de production, de traitement, et d'acquisition de résistances aux maladies animales (Draghia-Akli *et al.*, 1997; Southwood *et al.*, 2004; Thacker *et al.*, 2006; Richt *et al.*, 2007).

Parmi les méthodes biologiques, on compte l'utilisation de séquences virales associées aux fonctions d'empaquetage, d'entrée cellulaire, et de ciblage nucléaire. Ces séquences sont en général dérivées de rétrovirus, lentivirus, adénovirus, virus associés aux adénovirus, ou du virus Herpès (voir Tableau 1). De récentes évolutions s'observent en outre sur les vecteurs non viraux qui permettent d'introduire de l'ADN recombiné dans les tissus d'animaux destinés à la consommation (Manzini *et al.*, 2006).

On peut considérer que les vaccins à ADN recombiné forment une classe des NHC. Le matériel génétique des vaccins à ADN recombiné peut être constitué de plasmides, de vecteurs à base virale, ou de fragments d'ADN codant des peptides antigènes dérivés de l'agent pathogène visé (Pachuk *et al.*, 2000). Le vaccin est globalement destiné à induire chez l'animal une réaction immunitaire spécifique aux antigènes de type cellulaire ou humorale (Jechlinger, 2006). Si l'administration effective de vaccins à ADN recombiné est toujours en cours de développement, on étudie des méthodes prometteuses comme les aérosols transdermiques, l'électroporation et les liposomes. On a ainsi constaté que l'injection intramusculaire était un moyen relativement inefficace d'administrer aux bovins des vaccins à ADN recombiné (Hurk *et al.*, 1998), alors que l'administration intradermique par jet à haute pression semblait plus efficace (Carter et Kerr, 2003). Jecklinger *et al.* (2006) ont montré que les vaccins à ADN recombiné pouvaient subsister un certain temps au niveau épisomique dans les tissus des animaux traités.

5.3 Discussion principale

Si les questions portent sur les "traits" héritable et non héritable, il est préférable pour répondre aux exigences de cette discussion d'évoquer les "constructions" héritable et non héritable. En effet, les "traits", tels qu'ils sont définis par la FAO, désignent le phénotype ou l'une des nombreuses caractéristiques qui définissent un organisme, cette analyse se fondant sur la description des véritables gènes d'ADN recombiné eux-mêmes. Les constructions héritable (HC) se définissent comme des constructions qui sont intégrées de façon stable dans le génome et se transmettent de génération en génération, alors que les constructions non héritable (NHC) peuvent être intégrées au génome des cellules somatiques sans nécessairement se transmettre de façon verticale.

Lorsque l'on introduit chez l'animal des constructions d'ADN recombiné, de multiples effets peuvent survenir. On les qualifie souvent de "désirés" ou "non désirés", ou de "directs" ou "indirects". Par effets désirés ou non désirés, on désigne les résultats en rapport avec l'objectif de la modification. Les effets désirés (recombinaisons ciblées) sont les changements introduits de façon volontaire dans l'animal à ADN recombiné, par introduction d'une construction d'ADN recombiné, ainsi que leurs effets phénotypiques prévus (rythme de croissance accru, résistance aux infections, par exemple). Ces effets peuvent eux-mêmes entraîner ou non des conséquences directes ou indirectes sur la sécurité sanitaire des aliments. Les effets non désirés (recombinaisons non ciblées) peuvent se produire à la suite de multiples changements chez l'animal à ADN recombiné, consécutifs à l'interaction entre la construction d'ADN recombiné ou de ses produits génétiques, et la physiologie de l'animal. Il peut y avoir là, ou non, des effets directs ou indirects sur la sécurité sanitaire des aliments.

On peut considérer les effets directs posant des problèmes de sécurité sanitaire des aliments comme des effets indésirables résultant de la consommation humaine de produits comestibles issus d'animaux à ADN recombiné pourvus de la construction d'ADN recombiné ou des produits qui en dérivent. Les effets indésirables indirects peuvent provenir de la consommation humaine de produits comestibles issus d'un animal à ADN recombiné présentant des dangers en raison de la construction ou des produits dérivés qui perturbent la physiologie de l'animal liée à la production de nourriture. On en trouve des exemples dans ceux qui affectent la synthèse d'un nutriment prévu, ou dans l'altération de la concentration d'une protéine séquestrant un métal qui peut ne présenter aucun danger pour l'animal à ADN recombiné, mais pourrait présenter un risque pour la consommation humaine. Ou au contraire, ces effets indirects peuvent être néfastes pour l'animal à ADN recombiné, mais être neutres pour la consommation alimentaire humaine (par exemple en stimulant une irritation locale dans un tissu non comestible qui, du fait que l'homme n'y est pas exposé dans la consommation alimentaire, ne présente pas de risques pour l'homme).

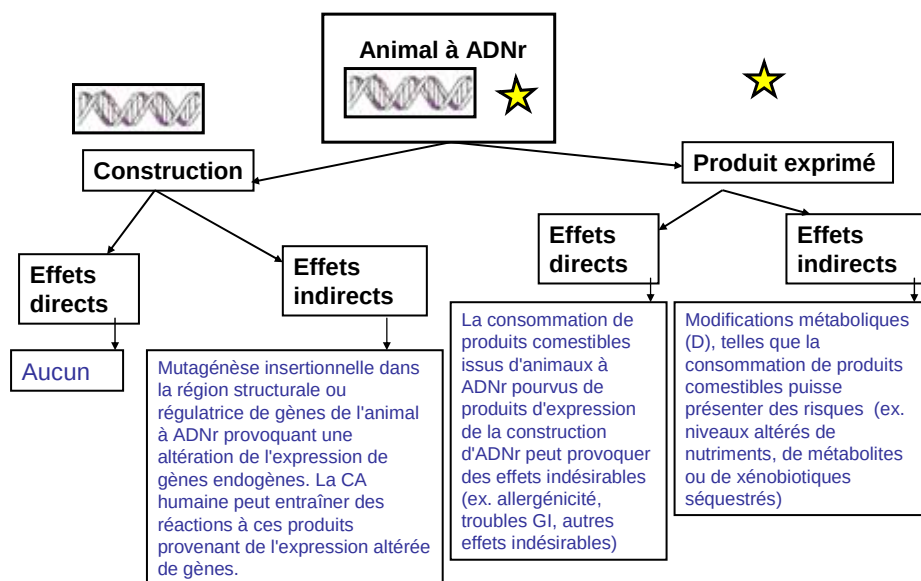


Figure 1. Présentation schématique des paramètres pris en compte pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des animaux à ADN recombiné (ADNr) pourvus de constructions hérissables (CA, GI et Δ sont respectivement les abréviations de consommation alimentaire, gastro-intestinaux, et modifié).

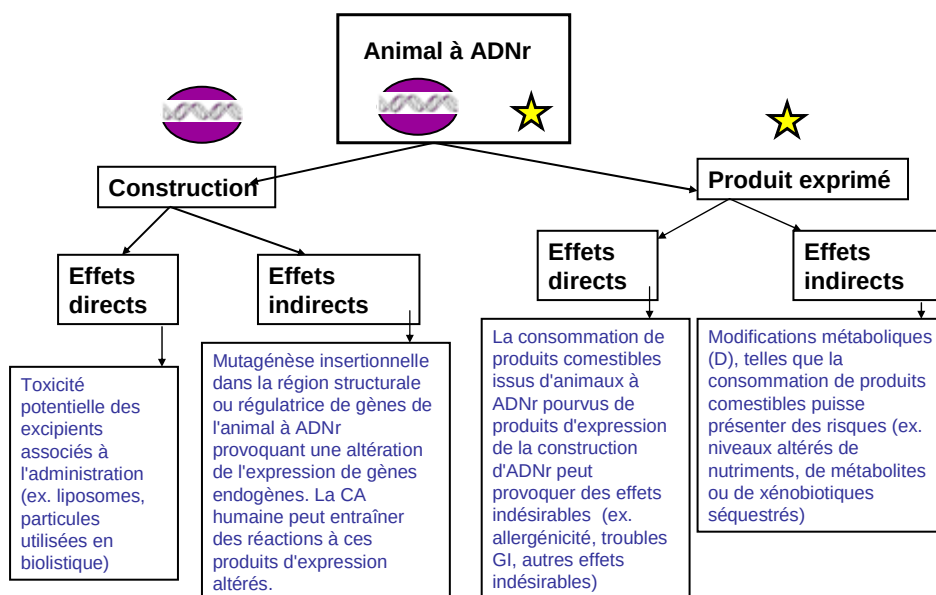


Figure 2. Présentation schématique des paramètres pris en compte pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des animaux à ADN recombiné (ADNr) pourvus de constructions non hérissables (CA, GI et Δ sont respectivement les abréviations de consommation alimentaire, gastro-intestinaux, et modifié).

Les Figures 1 et 2 résument la démarche théorique suivie pour élaborer la méthodologie permettant de recenser les dangers et les risques susceptibles de se présenter dans la consommation d'animaux à ADN recombiné destinés à l'alimentation pourvus respectivement de HC et de NHC. Elles ne constituent pas un recensement complet des dangers, ni une évaluation exhaustive des risques. Par construction, elles distinguent entre les effets qui dérivent de la construction d'ADN recombiné elle-même et de ses produits d'expression, et entre les effets directs et indirects.

Afin de déterminer si les HC et les NHC présentent des risques différents pour la consommation alimentaire humaine, il importe de caractériser les types de constructions utilisés, leur devenir et leur persistance chez l'animal à ADN recombiné, leurs profils d'expression, et les dangers éventuels qu'ils peuvent présenter pour les animaux à ADN recombiné eux-mêmes. Les risques pour la santé humaine ne surviennent pas avant la consommation des produits effectivement issus de ces animaux à ADN recombiné. Le Tableau 1 rassemble les principaux types de HC et NHC actuellement employés dans de telles applications. On remarquera cependant que cette analyse des NHC se fonde en grande partie sur les expériences provenant de la thérapie génique humaine, directement extrapolées aux animaux destinés à la consommation, et qu'elle exige une démonstration empirique. Pour identifier les dangers potentiels pour l'homme dans le cadre de la consommation alimentaire, le Tableau 1 tient compte des méthodes esquissées aux Figures 1 et 2.

L'un des risques pour la consommation alimentaire liés à la consommation d'animaux à ADN recombiné pourvus de NHC est désigné par le terme d'"effet excipient". Les effets excipients désignent la toxicité directe et indirecte susceptible de résulter de la consommation de tissus où sont présents ces matériaux. Le niveau d'exposition peut varier entre zéro et la totalité du produit administré à l'animal à ADN recombiné, en fonction du tissu consommé et de la répartition et du devenir de la construction d'ADN recombiné et de ses excipients chez l'animal à ADN recombiné.

Comme le montre le Tableau 1, il est important de noter que de nombreuses NHC sont intégrées aux chromosomes de cellules somatiques. Celles qui sont dérivées de rétrovirus ou d'éléments transposables en sont des exemples (revue de Kay *et al.*, 2001). Parmi les NHC qui demeurent épisomiques figurent celles qui sont dérivées d'adénovirus ou du virus Herpès (revue de Thomas *et al.*, 2003). Les constructions d'ADN recombiné dérivées de virus associés aux adénovirus sont en général considérées comme épisomiques, bien que certaines données semblent indiquer qu'une intégration peut se produire (Recchia *et al.*, 1999).

Si la plupart de ces données sont issues de la thérapie génique humaine, il est important de souligner que le développement de cette technologie s'est accompagné d'une action internationale concertée visant à assurer que ces vecteurs dérivés de virus soient "aussi sûrs que possible", pour reprendre les termes de l'American Society for Gene Therapy (<http://www.asgt.org/>) et de l'European Society for Gene and Cell Therapy (<http://www.esgt.org/>). Cette action tend à limiter la recombinaison homologue avec des virus endogènes, qui pourrait conduire : 1) à une insertion dans des régions du génome de nature à nuire à la croissance et au développement; 2) à une recombinaison conduisant à la reconstitution de particules virales actives et infectieuses; ou 3) à une instabilité de la construction intégrée. Un autre motif de préoccupation qui a fait l'objet de recherches et développements intenses a été l'élimination de l'expression de protéines virales susceptibles de provoquer des réactions inflammatoires. Il est prévu d'entreprendre des actions semblables pour les vecteurs employés chez l'animal à ADN recombiné destiné à l'alimentation (voir Section 7: Recommandations).

Une complication est apparue dans la définition de l'animal à ADN recombiné telle qu'elle figurait lors de la précédente Consultation d'experts (FAO/OMS, 2004), qui laissait entendre que ce terme ne s'appliquerait qu'aux animaux dont les cellules contiennent des constructions hérissables (HC). On produit des animaux destinés à l'alimentation ou à d'autres fins en utilisant des constructions non hérissables (NHC). Les différences en nature et en niveau des risques pour la consommation alimentaire que présentent les animaux à ADN recombiné produits à l'aide de constructions hérissables et non hérissables se manifestent principalement lorsqu'on emploie des excipients pour introduire des NHC chez l'animal destinataire, et lorsque les constructions d'ADN recombiné sont destinées à demeurer épisomiques. De récentes données scientifiques montrent que des vaccins à ADN recombiné peuvent subsister un certain temps au niveau épisomique dans les tissus des animaux traités (Jecklinger *et al.*, 2006).

Le Tableau 2 résume les différences entre les animaux à ADN recombiné HC et NHC qui concernent l'évaluation de leur sécurité sanitaire de consommation. Ce tableau a pour but d'indiquer les principales caractéristiques de construction qui diffèrent entre ces animaux et ont des conséquences sur les diverses manières de mener les évaluations de sécurité sanitaire des aliments. Il importe de souligner que le but du tableau n'est pas de déterminer les risques éventuels que pourraient présenter les animaux à ADN recombiné pour la sécurité sanitaire des aliments, mais d'indiquer s'il faudrait procéder à des évaluations de type différent concernant la sécurité sanitaire de consommation que présentent les animaux à ADN recombiné munis de ces deux classes de constructions.

En fonction de ces distinctions effectuées entre les animaux à ADN recombiné HC et NHC, les conclusions et recommandations concernant les applications non hérissables figurent respectivement aux sections 6 et 7.

Tableau 1: Caractéristiques des méthodes de production d'animaux à ADN recombiné, et leurs dangers éventuels pour la consommation alimentaire (adapté de Thomas et al. 2003)							
Type de construction	Intégrée/Épisomique	Introduction initiale	Transmissibilité*	Devenir/Persistance		Dangers pour l'animal	Dangers pour la consommation alimentaire
				Construction	Produit		
Dérivée de rétro/lentivirus* (Kay et al., 2001, Park et al. 2000; Naldini et al. 1996)	Intégrée	Les rétrovirus ont besoin de cellules en division. Les lentivirus n'ont pas besoin de cellules en division	Non attendue au-delà des cellules cibles	Stable dans la cellule cible, mais les cellules cibles peuvent être détruites	Peut décroître dans le temps par inactivation	Mutagenèse insertionnelle par la construction au niveau des cellules cibles; toxicité locale ou systémique par interaction avec les produits d'expression	Aucun par le vecteur. Dangers directs et indirects dérivant du produit d'expression ou d'une perturbation de la physiologie de l'animal..
Dérivée d'un élément transposable*	Intégrée	Introduction chimique ou physique uniquement; cellules indifféremment division ou quiescentes	Non attendue au-delà des cellules cibles	Stable dans la cellule cible, mais les cellules cibles peuvent être détruites	Souvent stable sauf inactivation. Les cellules peuvent être détruites.	Mutagenèse insertionnelle par la construction au niveau des cellules cibles; toxicité locale ou systémique par interaction avec les produits d'expression	Aucun par la construction; excipient(s) persistants possibles. Dangers directs et indirects dérivant du produit d'expression ou d'une perturbation de la physiologie de l'animal.
ADN nu ***	Intégrée	Introduction chimique ou physique uniquement; cellules indifféremment en division ou quiescentes	Non attendue au-delà des cellules cibles	Stable dans la cellule cible, mais les cellules cibles peuvent être détruites	Souvent stable sauf inactivation. Les cellules peuvent être détruites.	Mutagenèse insertionnelle par la construction au niveau des cellules cibles; toxicité locale ou systémique par interaction avec les produits d'expression	Aucun par la construction; excipient(s) persistants possibles. Dangers directs et indirects dérivant du produit d'expression ou d'une perturbation de la physiologie de l'animal.
Dérivée d'adénovirus*	Épisomique	Récepteurs intermédiaires.	Non attendue	Pas de stabilité	Liés à la persistance	Pas de mutagenèse insertionnelle.	Immunogénicité transitoire (par exposition orale) en

Tableau 1: Caractéristiques des méthodes de production d'animaux à ADN recombiné, et leurs dangers éventuels pour la consommation alimentaire (adapté de Thomas et al. 2003)

Type de construction	Intégrée/Épisomique	Introduction initiale	Transmissibilité*	Devenir/Persistance		Dangers pour l'animal	Dangers pour la consommation alimentaire
				Construction	Produit		
(Kafri et al.1998)		Cellules en division ou non.	au-delà des cellules cibles	connue à long terme; la construction disparaît de la cellule, les cellules peuvent être détruites	de la construction sauf inactivation	Toxicité locale ou systémique par interaction avec les produits d'expression. Possibilité de réponse immunitaire potentiellement importante aux protéines virales.	cas de consommation de produits comestibles contenant des vecteurs d'administration appliqués dérivés de virus (effet excipient). Dangers directs et indirects dérivant de la construction ADN _r , du produit d'expression ou d'une perturbation de la physiologie de l'animal.
Dérivée de virus associés aux adénovirus* Nakai et al. 2001	90% épisomique / 10% intégrée†	Récepteurs intermédiaires. Cellules en division ou non.	Non attendue au-delà des cellules cibles	Pas de stabilité connue à long terme; la construction disparaît de la cellule, les cellules peuvent être détruites	Liés à la persistance de la construction sauf inactivation	Pas de mutagenèse insertionnelle. Toxicité locale ou systémique par interaction avec les produits d'expression. Moins inflammatoire que les vecteurs d'administration dérivés des adénovirus.	Immunogénicité transitoire (par exposition orale) en cas de consommation de produits comestibles contenant des vecteurs d'administration appliqués dérivés de virus (effet excipient). Dangers directs et indirects dérivant de la construction ADN _r , du produit d'expression ou d'une perturbation de la physiologie de l'animal.
Dérivée du virus de l'Herpès*	Épisomique	Fortement neurotrophique	Non	Persistante	Liés à la persistance de la	Pas de mutagenèse insertionnelle. Toxicité locale ou	Limités à la consommation de tissus dérivés de neurones. Dangers directs

Tableau 1: Caractéristiques des méthodes de production d'animaux à ADN recombiné, et leurs dangers éventuels pour la consommation alimentaire (adapté de Thomas *et al.* 2003)

Type de construction	Intégrée/Épisomique	Introduction initiale	Transmissibilité*	Devenir/Persistance		Dangers pour l'animal	Dangers pour la consommation alimentaire
				Construction	Produit		
					construction sauf inactivation	systémique par interaction avec les produits d'expression. Peut être inflammatoire en raison de la présence de protéines virales persistantes.	et indirects dérivant de la construction ADN _r , du produit d'expression ou d'une perturbation de la physiologie de l'animal.
Chromosomes artificiels	Sans objet	Habituellement vers des cellules employées comme donneuses dans le transfert nucléaire	Pas aux cellules environnantes; peut être héritable	Persistante	Liés à la persistance, sauf inactivation	Pas de mutagenèse insertionnelle. Toxicité locale ou systémique par interaction avec les produits d'expression.	Aucun par le vecteur. Dangers directs et indirects dérivant du produit d'expression ou d'une perturbation de la physiologie l'animal.
Construction héritable		Implique de produire un nouvel animal	Sans objet	Stable, sauf perte	Stable, sauf inactivation	Mutagenèse insertionnelle. Toxicité locale ou systémique par interaction avec les produits d'expression.	Dangers directs et indirects dérivant du produit d'expression ou d'une perturbation de la physiologie de l'animal.
* En supposant que la capacité de réplication du virus soit supprimée au cours de la construction du vecteur. ** Des cellules ou tissus cibles aux cellules ou tissus environnants. *** En supposant que l'ADN soit administré par des moyens chimiques ou physiques (liposomes, transfection, techniques biolistiques, etc.) et ne contienne pas de structures nécessaires à la réplication (voir Chromosomes artificiels). ‡ Nombre des caractéristiques décrites ici se fondent sur des observations sur l'homme (Thomas <i>et al.</i> 2003). Chacune des références renvoie à des citations décrivant une caractéristique particulière concernant ce type de vecteur.							

Tableau 2: Résumé des différences entre les animaux à ADNr pourvus de constructions héritables (HC) et de constructions non héritables (NHC) : conséquences pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments			
Caractéristiques de la construction d'ADNr	HC	NHC	Conséquences pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments
Nature de la construction	Habituellement, ADN linéarisé contenant des régions régulatrices et le gène d'intérêt. Peut également contenir des séquences provenant du squelette du vecteur de propagation, par exemple origine de répllication, marqueur(s) sélectionnable(s) ou autres séquences procaryotiques ou eucaryotiques.	Peut être de l'ADN linéarisé, une unité à répllication autonome, ou autre chose (voir Tableau 1). Peut également contenir des séquences provenant du squelette de vecteur de propagation, par exemple origine de répllication, marqueur(s) sélectionnable(s) ou autres séquences procaryotiques, virales ou eucaryotiques.	Pas de différence.
Méthode d'introduction de la construction	Transfert direct par liposomes et autres vecteurs non biologiques, ou par micro-injection.	Peut faire usage de vecteurs d'origine biologique, mais le transfert direct par des liposomes ou autres vecteurs non biologiques peuvent également être utilisés.	Les excipients chez l'animal à ADNr pourvus de NHC peuvent présenter des risques directs et indirects pour la sécurité sanitaire des aliments.
Cellules dans lesquelles la construction est initialement introduite	Cellule germinale, embryon ou cellule donneuse pour le transfert nucléaire.	Toute cellule somatique.	Pas de différence. Qu'il s'agisse de HC ou de NHC, des effets indésirables indirects peuvent se produire lorsque la construction est introduite dans le génome, à la suite d'une interruption des séquences régulatrices ou codantes. On ne devrait pas observer de tels effets pour les NHC cantonnées au niveau épisomique.

Tableau 2 (suite) : Résumé des différences entre les animaux à ADNr pourvus de constructions héritables (HC) et de constructions non héritables (NHC) : conséquences pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments			
Caractéristiques de la construction d'ADNr	HC	NHC	Conséquences pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments
Localisation, stabilité et prévalence de la construction chez l'animal à ADNr	Toutes cellules; après stabilisation, devraient demeurer constantes (sauf apparition de petits foyers de perte ou de modification).	Certaines cellules (focales à dispersées; affectées par la voie et la méthode d'introduction).	S'il peut y avoir des différences dans la localisation et les quantités de constructions d'ADNr chez l'animal à NHC, du fait qu'il n'existe pas de risque direct pour la consommation alimentaire lié à la construction elle-même, il n'existe pas de différences entre les risques pour la consommation alimentaire.
Expression de la construction : type de cellule, quantité et durée	Toutes cellules possibles, mais peut être spécifique aux cellules, aux tissus ou aux stades de développement. Quantité probablement constante entre animaux à ADNr de la même lignée. Durée probablement stable.	Un sous-ensemble de cellules seulement; expression ectopique possible en cas d'emploi de promoteurs non spécifiques. La quantité peut différer entre cellules ou tissus et entre animaux.	Si la dose de produit d'expression peut être estimée chez l'animal à ADNr avec HC comme avec NHC, la variance peut être supérieure avec NHC, ce qui modifie les besoins en matière d'échantillonnage. Certaines cellules, certains tissus et certains organes ne possèdent aucune construction (NHC), ou n'engendrent pas de produit d'expression (HC spécifiques aux tissus ou NHC).

Tableau 2 (suite) : Résumé des différences entre les animaux à ADNr pourvus de constructions héritables (HC) et de constructions non héritables (NHC) : conséquences pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments			
Caractéristiques de la construction d'ADNr	HC	NHC	Conséquences pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments
Production d'un plus grand nombre d'animaux à ADNr	Reproduction ou transfert nucléaire.	Introduction de NHC (voir Tableau 1).	<u>Animaux à ADNr pourvus de HC</u> : une fois le génome établi, les prédictions concernant les animaux suivants du même "génome" devraient suivre les lois de Mendel, et l'évaluation de la sécurité sanitaire peut s'effectuer sur des animaux à ADNr "prototypes". <u>Animaux à ADNr pourvus de NHC</u> : chaque animal peut être considéré comme unique et, à moins que les protocoles ne soient étroitement contrôlés et que ne soit établi un protocole pour rendre compte des hypothèses les plus pessimistes, la sécurité sanitaire devra être évaluée individuellement.

Le Tableau 3 résume les principales conclusions de la Consultation en réponse aux deux questions posées concernant les animaux à ADN recombiné pourvus de constructions soit héritables, soit non héritables. Il en ressort que dans la plupart des domaines, il n'existe pas de différences majeures en matière de sécurité sanitaire des aliments qui résultent de l'intégration ou non des constructions d'ADNr dans les cellules germinales, mais que les risques sont plutôt fonction de la construction d'ADN recombiné, de son statut d'intégration, et du produit correspondant. Par conséquent, les différences à l'égard de la sécurité sanitaire des aliments se constatent entre constructions d'ADN recombiné intégrées et non intégrées (c'est-à-dire épisomiques). La grande différence en termes de sécurité sanitaire des aliments entre animaux à ADN recombiné pourvus de HC et de NHC n'est donc pas liée aux transgènes, mais à la présence éventuelle d'excipients employés pour transférer la construction d'ADN recombiné vers l'application non héritable, car l'animal primaire serait celui qui entrerait dans la chaîne alimentaire; le consommateur humain de ces aliments pourrait donc être exposé. Fondé sur la méthodologie présentée aux Figures 1 et 2 et dans les Tableaux 1 et 2, le Tableau 3 résume les problèmes potentiels de sécurité sanitaire des aliments aux niveaux des dangers pour l'animal, des dangers pour la consommation alimentaire, et des risques pour la consommation alimentaire.

Concernant les dangers pour l'animal de nature à affecter la sécurité sanitaire des aliments, les principales différences entre les animaux à ADN recombiné pourvus de HC et de NHC sont les suivantes : 1) les constructions cantonnées au niveau épisomique ne provoquent pas de mutations insertionnelles; 2) les questions liées à la présence d'excipients. À cela s'ajoute que tant le transfert horizontal de gènes que les événements de recombinaison constituent théoriquement des voies de propagation de nouveaux dangers chez l'animal. Les constructions d'ADN recombiné cantonnées au niveau épisomique sont sans doute plus accessibles aux événements de transfert horizontal des gènes, mais cela n'exclut pas qu'un transfert horizontal de gènes ne touche une construction intégrée. On observe également que le potentiel de recombinaison peut être lié à la présence de séquences virales, bactériennes ou autres, présentes dans la construction d'ADN recombiné.

Concernant les dangers pour la consommation alimentaire, les différences entre les aliments issus d'animaux à ADN recombiné pourvus de HC et de NHC sont encore une fois fonction : 1) de l'intégration de la construction; 2) des effets excipients chez l'animal à ADN recombiné pourvu de NHC. Si la quantité de produit d'expression à ADN recombiné peut varier entre les HC et les NHC, les conséquences pour la sécurité sanitaire des aliments ne sont pas fonction du caractère héritable ou non de la construction d'ADN recombiné. Les excipients chez l'animal à ADN recombiné pourvu de NHC peuvent présenter des dangers directs et indirects pour la consommation alimentaire, car dans le cas des NHC, les possibilités d'exposition aux excipients sont plus fréquentes que dans le cas des animaux à ADN recombiné pourvus de HC, chez qui les excipients disparaîtraient au fil des générations. À cela s'ajoute le fait que tant le transfert horizontal de gènes que les événements de recombinaison constituent théoriquement des voies de propagation de nouveaux dangers chez l'animal. Les constructions d'ADN recombiné cantonnées au niveau épisomique sont sans doute plus accessibles aux événements de transfert horizontal des gènes, mais cela n'exclut pas qu'un transfert horizontal de gènes ne touche une construction intégrée.

Concernant les risques pour la consommation alimentaire, la seule différence qualitative tient à la plus forte possibilité d'exposition aux excipients dans les aliments issus d'animaux porteurs de NHC que dans ceux issus d'animaux à ADN recombiné pourvus de HC. Les risques liés aux excipients ne se présentent que lorsque les cellules ou tissus consommés contiennent ces excipients; or, comme on l'a vu, il n'existe pas d'excipients chez l'animal pourvu de HC. Des différences quantitatives en matière de risques pour la sécurité sanitaire des aliments peuvent apparaître selon le schéma d'expression et la quantité de la construction, mais non de son caractère héritable.

Tableau 3. Résumé des dangers et des risques chez les animaux à ADN recombiné (ADNr) pourvus de constructions héritables (HC) et de constructions non héritables (NHC)		
	Points communs	Différences
Dangers pour l'animal	Mutagenèse insertionnelle pour les constructions d'ADNr intégrées. Dangers liés aux produits d'expression. Effets locaux, notamment de recombinaison avec séquences, si des vecteurs semblables sont employés pour introduire des HC et NHC. Les principaux facteurs qui influencent la probabilité d'un effet indésirable causé par transfert horizontal de gènes et recombinaison sont les origines des séquences présentes dans la construction (origine bactérienne, virale ou autres séquences eucaryotiques, etc.), et non son caractère héritable.	Pas de mutagenèse insertionnelle pour les NHC cantonnées au niveau épisomique. Effets excipients.
Dangers pour la consommation alimentaire	Peuvent survenir du fait du fait de la mutagenèse insertionnelle chez l'animal à ADNr. Le niveau des produits d'expression peut différer entre les NHC et les HC, mais qualitativement les dangers sont identiques. Les principaux facteurs qui influencent la probabilité d'un effet indésirable causé par transfert horizontal de gènes et recombinaison sont les origines des séquences présentes dans la construction (origine bactérienne, virale ou autres séquences eucaryotiques, etc.), et non son caractère héritable.	Pas de mutagenèse insertionnelle pour les NHC cantonnées au niveau épisomique. Les excipients chez l'animal à ADNr pourvus de NHC peuvent présenter des dangers directs et indirects pour la consommation alimentaire. Avec les NHC, les possibilités d'exposition aux vecteurs sont plus élevées que chez l'animal à ADNr avec HC, en raison des "effets de dilution".
Risques pour la consommation alimentaire	Fonction du schéma d'expression et de la quantité de la construction, et non du caractère héritable de la construction d'ADNr.	Les risques liés aux excipients sont fonction de l'exposition potentielle (selon que les cellules ou tissus consommés contiennent ou non les excipients). Avec les NHC, les possibilités d'exposition aux vecteurs sont plus élevées que chez l'animal à ADNr avec HC, en raison des "effets de dilution".

6. Conclusions

6.1 Conclusions concernant les gènes marqueurs et rapporteurs

- ***Quels sont les faits nouveaux concernant la mise au point et l'utilisation de gènes marqueurs et de gènes rapporteurs sélectionnables?***

- On utilise au moins trois grandes catégories de gènes marqueurs pour cribler et/ou sélectionner les cellules animales dans lesquelles a été introduit de l'ADN étranger.

- La plupart des représentants de ces 3 classes de marqueurs ont été développés afin de servir d'outils à la recherche fondamentale. On ne dispose à l'heure actuelle que d'une information insuffisante sur la sécurité sanitaire que présentent les animaux à ADN recombiné possédant ces gènes marqueurs. Néanmoins, des informations obtenues sur d'autres espèces peuvent servir de point de départ aux futures recherches sur la sécurité sanitaire des gènes marqueurs.

- Les gènes marqueurs pour la sélection positive et négative vont devenir de plus en plus importants, en association avec le transfert nucléaire de cellules somatiques ou pluripotentes visant à produire des animaux à ADN recombiné destinés à la consommation.

- ***Y a-t-il des gènes marqueurs ou rapporteurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques dont l'innocuité pour l'homme dans les aliments a été démontrée, et dans l'affirmative, quels sont-ils?***

- Bien qu'il existe de nombreux gènes marqueurs ou rapporteurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques, peu d'entre eux sont actuellement employés pour produire des animaux à ADN recombiné destinés à la consommation.

- Grâce à des études de laboratoire sur des modèles animaux, on dispose d'une certaine expérience sur l'utilité, la stabilité et l'efficacité de ces gènes marqueurs. Toutefois, le faible nombre d'études sur la sécurité alimentaire des gènes marqueurs ayant une résistance à des produits autres que les antibiotiques chez les animaux à ADN recombiné destinés à la consommation n'ont pas apporté de résultats concluants.

- ***Lorsque l'on entend éliminer des séquences spécifiques d'ADN, existe-t-il des techniques fiables et sans danger pour le faire systématiquement ?***

- Des systèmes de recombinaison spécifiques à certains sites peuvent permettre de supprimer des gènes marqueurs, à condition que soient prises des mesures pour éviter autant que possible des effets secondaires non désirables dus à des recombinaisons non ciblées.

- On ne dispose que d'une quantité restreinte d'information scientifique pertinente concernant les aspects de sécurité sanitaire des systèmes d'excision à des sites précis, chez les animaux destinés à la consommation.

6.2 Conclusions concernant les applications non héritables

- ***Y a-t-il des différences importantes du point de vue de la sécurité sanitaire des aliments entre les animaux ayant des caractères héréditaires et ceux qui n'en présentent pas, et si oui, quelles sont-elles??***

- Les divers dangers pour la consommation alimentaire que présentent les animaux à ADN recombiné dépendent des paramètres suivants : a) le statut d'intégration (ainsi que l'origine et la composition des séquences) de la construction, et non son héritabilité; b) les effets des excipients, qui restent à évaluer chez les animaux à ADN recombiné portant des constructions non héritables (NHC).

- Il n'existe pas de différences qualitatives entre les constructions héritables et non héritables, en ce qui concerne la nature des dangers et des risques liés à leur intégration chromosomique.

- Des différences quantitatives dans la sécurité sanitaire des aliments dérivés d'animaux génétiquement modifiés présentant des constructions héritables ou non héritable pourraient apparaître en fonction du patron d'expression et de la quantité de la construction, mais non de son héritabilité.

- L'éventualité d'un transfert génétique horizontal dépend de l'intégration de la construction d'ADN recombiné au génome des cellules destinataires, ou de son maintien au niveau épisomique, et non pas de son caractère d'héritabilité. L'ADN recombiné épisomique, qu'il soit héritable ou non héritable, peut plus facilement que l'ADN recombiné intégré être transféré ou repris par des bactéries ou cellules somatiques des animaux ou des humains qui consomment des produits alimentaires dérivés d'animaux génétiquement modifiés. Il peut y avoir là des risques pour la santé animale, mais on ignore dans quelle mesure cet éventuel transfert horizontal pourrait poser un problème pour la santé humaine à la suite de la consommation de ces produits.

- ***Y a-t-il des questions spécifiques concernant la sécurité sanitaire des aliments (par exemple concernant les types de vecteurs) qui devraient être examinées par rapport à l'évaluation de la sécurité sanitaire d'aliments contenant des caractères héréditaires par rapport à ceux qui n'en ont pas??***

- Il est possible qu'apparaissent des différences quantitatives dans la sécurité sanitaire des aliments dérivés d'animaux à ADN recombiné possédant des constructions d'ADN recombiné héritable ou non héritable, en fonction du contenu des vecteurs en séquences virales. En ce cas, la recombinaison avec des séquences virales endogènes pourrait présenter des risques pour la santé des animaux à ADN recombiné. La possibilité pour que ces risques de santé animale engendrent des risques pour la santé humaine est fonction, entre autres, du spectre d'hôtes des virus recombinés qui en résulteraient.

7. Recommandations

7.1 Recommandations sur les gènes marqueurs et rapporteurs

- Il est fortement recommandé de poursuivre la validation et le développement des systèmes d'excision des gènes permettant de supprimer des séquences d'ADN spécifiques chez les animaux à ADN recombiné. Ce point s'inscrit dans les conclusions de la consultation FAO-OMS d'experts de 2003, qui recommande d'éviter l'emploi de séquences ADN non nécessaires, y compris des gènes marqueurs, dans la construction des gènes, (FAO/OMS, 2003).
- Il est nécessaire d'approfondir les recherches par des études consacrées aux aliments dérivés d'animaux à ADN recombiné, en vue d'évaluer la sécurité sanitaire des gènes marqueurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques et des systèmes d'excision de gènes.
- Il est souhaitable de développer de nouveaux marqueurs de résistance à des produits autres que les antibiotiques qui faciliteront une sélection efficace, positive et négative, des cellules transgéniques.
- Afin de réduire autant que possible les éventuels effets de recombinaisons non ciblées, les animaux à ADN recombiné destinés à la consommation devraient être exempts du système d'excision génétique qui a été introduit.

7.2 Recommandations sur les applications non héritables

- On a recensé un certain nombre de dangers potentiels pour la santé animale liés à l'emploi de séquences virales, et notamment les risques d'une recombinaison et de l'expression qui pourrait en résulter, d'une altération de la pathogénicité, et de la transcription inverse des séquences virales d'ARN. Ces questions devraient constituer le fondement d'une directive pour une utilisation sûre de vecteurs dérivés de virus en vue d'applications non héritables visant à la santé et à la production animales. Les évolutions récentes dans le domaine des vecteurs épisomiques non viraux permettent de surmonter la plupart des inquiétudes que soulèvent les systèmes de vecteurs dérivés de virus. Ces directives devraient prendre en compte les principes des directives établies pour la thérapie génique humaine. L'OIE serait une instance appropriée pour élaborer une telle directive.
- Afin de réduire au maximum la probabilité qu'un effet adverse ne se produise et ne pose un problème de santé animale aux animaux à ADN recombiné à la suite d'un transfert horizontal de gènes à des organismes procaryotiques, les régions codantes des gènes introduits dans les constructions à ADN recombiné et intégrées au génome des animaux génétiquement modifiés devraient contenir des introns. En effet, les bactéries ne disposent pas de mécanisme cellulaire permettant l'élimination des introns, et ne pourraient donc pas générer un produit fonctionnel au cas où se produirait un transfert horizontal.
- On devra également prendre soin, en développant un produit alimentaire sûr, de ne pas compromettre la santé de l'animal à ADN recombiné. Les questions de santé animale devraient constituer une base pour la rédaction d'une directive pour la santé des animaux à ADN recombiné, semblable à celle qu'élabore l'OIE sur les clones animaux. L'OIE serait une instance appropriée pour l'élaboration d'une telle directive.

- Il conviendrait de favoriser l'approfondissement des recherches directes visant à établir si les dangers en matière de sécurité sanitaire des aliments sont tributaires des éléments suivants :
 - a) un éventuel transfert horizontal de gènes à des cellules procaryotiques ou eucaryotiques
 - b) un ADN recombiné construit à l'aide de séquences virales faisant partie des NHC (recombinaison virale par exemple).
- Du fait que les animaux à ADN recombiné avec NHC peuvent présenter une divergence inter-animale accrue dans les produits exprimés par les constructions d'ADN recombiné, il est nécessaire d'établir une directive pour les stratégies d'échantillonnage statistiquement appropriées visant à évaluer le potentiel d'exposition et de risque dérivant de la consommation d'aliments issus d'animaux à ADN recombiné avec NHC. Les instances appropriées pour l'élaboration de ces directives seraient les organismes qui ont vocation à établir des normes internationales, et sont intéressés par la santé animale et la sécurité sanitaire des aliments (par exemple la FAO, l'OMS et l'OIE).
- Il conviendrait que des organisations internationales intergouvernementales appropriées, telles que la FAO et l'OMS, constituent et tiennent à jour une base de données complète et ouverte au public regroupant tous les résultats rapportés sur la consommation d'aliments dérivés d'organismes à ADN recombiné, y compris les résultats de toute investigation ultérieure concernant ces rapports.
- Il conviendrait que des organisations internationales appropriées, telles que l'OIE, constituent et tiennent à jour une base de données complète et ouverte au public sur les méthodes d'introduction de constructions hérissables et non hérissables d'ADN recombiné dans les espèces animales, accompagnée d'une bibliographie exhaustive.
- Il ne serait pas inapproprié d'utiliser les principes et les méthodes figurant dans le projet de directive⁴ appliqués pour évaluer la sécurité sanitaire des animaux à ADN recombiné, en y ajoutant les mises en garde relatives aux excipients et épisomes, pour évaluer la santé animale et la sécurité sanitaire des animaux porteurs de NHC destinés à la production ou à d'autres fins, et pour évaluer la sécurité sanitaire des animaux traités à l'aide de vaccins à ADN recombiné.
- Compte tenu de la complexité et de l'importance des questions soulevées par les vaccins à ADN recombiné en matière de santé animale et de sécurité sanitaire des aliments, ces questions devraient être traitées par un groupe mixte d'experts FAO-OMS-OIE.

⁴ L'avant-projet de directive régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés d'animaux à ADN recombiné est en cours d'élaboration aux étapes 3 et 4 du processus du Codex (voir ALINORM 07/30/34).

8. Références

8.1 Gènes marqueurs et rapporteurs

- Aigner, B. & Brem, G. 1993. Tyrosinase as a marker gene and model for screening transgenes in mice and rabbits. *Theriogenology* 39: 177.
- Beermann, F., Ruppert, S., Hummler, E., Bosch, FX., Muller, G., Ruther, U. & Schuetz, G. 1990. Rescue of the albino phenotype by introduction of a functional tyrosinase gene into mice. *EMBO J* 9: 2819-2826.
- Brophy, B., Smolenski, G., Wheeler, T., Wells, D., L'Huillier, P.L. & Laible, G. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta casein and kappa casein. *Nature Biotechnology* 21 157-162.
- Hyodo-Taguchi, Y., Winkler, C., Kurihara, Y., Scharl, A. & Scharl, M. 1997. Phenotypic rescue of the albino mutation in the medakafish (*Oryzias latipes*) by a mouse tyrosinase transgene. *Mechanisms of Development* 68: 27-35.
- Inagaki, H., Koga, A., Bessho, Y. & Hori, H. 1998. The tyrosinase gene from medakafish: transgenic expression rescues albino mutation. *Pigment Cell Research* 11: 283-290.
- Kinoshita, M., Morita, T., Toyohara, H., Hirata, T., Sakaguchi, M., Ono, M., Inoue, K., Wakamatsu, Y. & Ozato, K. 2001. Transgenic medaka overexpressing a melanin-concentrating hormone exhibit lightened body color but no remarkable abnormality. *Marine Biotechnology* 3: 536-43.
- Lai, L., Kang, J.X., Li, R., Wang, J., Witt, W.T., Yang, H.Y., Hao, Y., Wax, D.M., Murphy, C.M., Rieke, A., Sammel, M., Linville, M.L., Korte, S.N., Evans, R.W., Starzi, T.E., Prather, R.S. & Dai, Y. 2006. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnology* 24: 435-436.
- Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H. & Ke, N.J. 1999. Is green fluorescent protein toxic to living cells? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260: 712-717.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. & Jonkers, J. 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 98: 9209-9214.
- Niemann, H., Kues, W.A. & Carnwath, J.W. 2005. Transgenic farm animals: Present and future. *Scientific and Technical Review of the OIE (World Organisation for Animal Health)*. 24: 285-298.
- Niemann, H. & Kues, W.A. 2003. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Animal Reproduction Science* 79: 291-317.
- Niemann, H. & Kues, W.A. 2000. Transgenic livestock premises and promises. *Animal Reproduction Science* 60-61: 277-291.
- Richards, H.A., Han, C.T., Hopkins, R.G., Failla, M.L., Ward, W.W. & Stewart, C.N. Jr. 2003. Safety assessment of recombinant green fluorescent protein orally administered to rats. *Journal of Nutrition*, 133: 1909-1912.
- Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J.M. & Kuroiwa, Y. 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology* 25: 132-138.
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S. & Capecchi, M.R. 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 97: 13702-13707.

Van de Lavoie, M.C., Diamond, J.H., Leighton, P., Mather-Love, C., Heyer, B.S., Bradsaw, R., Kerchner, A., Hooi, L., Gessaro, T.M., Swanberg, S.E., Delany, M.E. & Etches, R.J. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441: 766-769.

Morrow, J.K. 2006. Epitope tagging generates new products. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 26.

8.2 Applications non héréditaires

Anson, D.S. 2004. The use of retroviral vectors for gene therapy what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genetic Vaccines and Therapy*, 2:9.

Burton, E.A., Wechuck, J.B., Wendell, S.K., Goins, W.F., Fink, D.J. & Glorioso, J.C. 2001. Multiple applications for replication defective herpes virus vectors. *Stem Cells* 19: 358-377.

Carter, E.W. & Kerr, D.E. 2003. Optimization of DNA-based vaccination in cows using green fluorescent protein and Protein A as a prelude to immunization against Staphylococcal mastitis. *Journal of Dairy Science* 86: 1177-1186.

Draghia-Akli, R., Li, X. & Schwartz, R.J. 1997. Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectible myogenic vector. *Nature Biotechnology* 15: 1285-1289.

Van Drunen Littel-van den Hurk, Braun, R.P., Lewis, P.J., Karvonen, B.C., Baca-Estrada, M.E., Snider, M., McCartney, D., Watts, T. & Babiuk, L.A. 1998. Intradermal immunization with a bovine herpes virus -1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *Journal of General Virology* 79: 831-839.

Jechlinger, W. 2006. Optimization and delivery of plasmid DNA for vaccination. *Expert Review of Vaccines* 5: 803-825.

Kafri, T., Morgan, D., Krah, T., Sarvetnick, N., Sherman, L. & Verma, I. 1998. Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require *de novo* viral gene expression: implications for gene therapy. *Proceedings of the National Academies of Sciences USA* 95: 11377-11382.

Kay, M.A., Glorioso, J.C. & Naldini, L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine* 7: 33-40.

Kochhar, H. P. S. & Evans, B. R. 2007. Current status of regulating biotechnology-derived animals in Canada and animal health and food safety considerations. *Theriogenology* 67:188-197.

Kopp, J., Wang, G.Y., Kulmburg, G., Schultze-Moskau, S., Huan, J.N., Ying, K., Seyhan, H., Jeschke, M.D., Kneser, U., Bach, A.D., Ge, S.D., Dooley, S. & Horch, R.E. 2004. Accelerated wound healing by *in vivo* application of keratinocytes over expressing KGF. *Molecular Therapy* 10: 86-96.

Lavitrano M., Forni M., Bacci M.L., Di Stefano C., Varzi V., Wang H., & Seren E. 2003. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Molecular reproduction and development* 64(3): 284-291.

Manzini, S., Varqiolu, A., Stehle, I.M., Bacci, M.L., Cerrito, M.G., Giovannoni, R., Zannoni, A., Bianco, M.R., Forni, M., Donini, P., Papa, M., Lipps, H.J. & Lavitrano, M. 2006. Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proceedings of the National Academies of Sciences*.103: 17672-17677.

Mehier- Humbert, S. & Guy, R.H. 2005. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 733-753.

- Nakai, H., Yant, S.R., Storm, T.A., Fuess, S., Meuse, L. & Kay, M.A. 2001. Extrachromosomal recombiné adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *Journal of Virology* 75: 6969-6976.
- Pachuk, C.J., McCallus, D.E., Weiner, D.B. & Satishchandran, C. 2000. DNA vaccines—challenges in delivery. *Current Opinion in Molecular Theory* 2: 188-198.
- Park, F., Ohashi, K., Chiu, W., Naldini, L. & Kay, M.A. 2000. Effective lentiviral transduction of liver requires cell cycling. *Nature Genetics* 24: 49-52.
- Recchia, A., Parks, R.J., Lamartina, S., Toniatti, C., Pieroni, L., Palombo, F., Ciliberto, G., Graham, F.L., Cortese, R., La Monica, M. & Colloca, S. 1999. Site-specific integration mediated by hybrid adenovirus/ adeno-associated virus vector. *Proceedings of the National Academies of Sciences USA* 96: 2615-2620.
- Richt, J. A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J.M. & Kuroiwa, Y. 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology* 25: 132-138.
- Smith, K.R. 2002. Gene transfer in higher animals: theoretical considerations and key concepts. *Journal of Biotechnology* 99: 1-22.
- Sorrell, D.A. & Kolb, A.F. 2005. Targeted modification of mammalian genomes. *Biotechnology Advances* 23: 431-469.
- Southwood, L.L., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E. McIlwraith, C.W. 2004. Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Veterinary Surgery* 33: 565-578.
- Sun, H-C., Xue, F-M., Qian, K., Fang, H-X., Qiu, H-L., Zhang, X-Y. & Yin, Z-H. 2006. Intramammary expression and therapeutic effect of a human lysozyme-expressing vector for treating bovine mastitis. *Journal of Zhejiang University Science B* 7: 324-330.
- Thacker, E.L., Holtkamp, D.J., Khan, A.S., Brown, P.A. & Draghia-Akli, R. 2006. Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Journal of Animal Science* 84: 733-742.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. & Kay, M.A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Genetics* 4: 346-358.
- Wheeler, M. (2007). Agricultural applications for transgenic livestock. *Trends in Biotechnology* 25(5): 204-208.

9. Glossaire

Animal à ADN recombiné : animal dont le patrimoine génétique a été modifié par des techniques in vitro faisant intervenir les acides nucléiques, notamment l'acide désoxyribonucléique (ADN) recombiné et l'acide ribonucléique (ARN) recombiné, et le transfert direct d'acides nucléiques dans les cellules et organelles.

Animal génétiquement modifié : autre désignation de l'animal à ADN recombiné.

Construction : ADN destiné à être transféré dans une cellule ou un tissu. La construction pourra se composer du gène ou des gènes d'intérêt, d'un gène marqueur et des séquences de contrôle appropriées, en un ensemble indépendant. Une construction répétée à de multiples reprises est appelée cassette.

Construction héritable : construction intégrée de façon stable au génome, et transmise de génération en génération.

Construction non héritable : construction susceptible d'être intégrée au génome de cellules somatiques, mais qui en principe ne se transmet pas (ne s'hérite pas) entre générations.

Contrepartie conventionnelle : souche animale connue pour sa sécurité sanitaire en tant qu'aliment, dont a été dérivée la lignée d'animaux à ADN recombiné, et partenaires de reproduction employés pour produire les animaux destinés à la consommation finale et/ou les aliments issus de tels animaux.

Effet excipient: tout effet direct ou indirect résultant de l'exposition à un excipient.

Épisome (épisomique) : élément génétique extrachromosomique (par exemple le facteur F chez *Escherichia coli*) maintenu dans une cellule indépendamment du chromosome, mais susceptible de s'intégrer au chromosome hôte. Le phénomène d'intégration peut être gouverné par des facteurs divers, de sorte que le terme d'*épisode* est de moins en moins employé, et remplacé par le terme plus large de plasmide.

Excipient : matériau servant de vecteur au transfert de constructions non hérissables, comme les liposomes, les particules d'or employées dans les applications de biolistique, ou le phosphate de calcium utilisé pour la transfection.

Gènes marqueurs : gènes employés pour déterminer si un morceau d'ADN a été introduit avec succès dans la cellule animale. On utilise des gènes marqueurs aussi bien pour la sélection que pour le criblage.

Gènes rapporteurs : gènes codant un produit facile à analyser. On emploie ces gènes comme marqueurs, pour confirmer l'incorporation d'un transgène à une cellule, un organe ou un tissu, et pour tester l'efficacité de promoteurs spécifiques.

Produit d'expression : molécule spécifique d'ARN capable de coder une séquence protéique et la protéine qui en résulte. Certains ARN ne codent pas de protéines, mais assurent une fonction régulatrice ou biologique.

Recombinases : classe d'enzymes capables de modifier la disposition de séquences d'ADN en fonction des sites. Certains de ces enzymes peuvent exciser des segments d'ADN entre deux sites de reconnaissance précis de l'ADN.

Trait : l'une des nombreuses caractéristiques qui définissent un organisme. Le phénotype décrit un ou plusieurs traits. Synonyme : caractère.

Transfection : introduction d'une construction d'acide nucléique dans une ou plusieurs cellules de sorte qu'elle demeure intacte et conserve ses fonctions.

Transfert horizontal de gènes (transfert génétique horizontal) : intégration de molécules d'ADN par des cellules indépendamment des processus normaux de reproduction.

Transfert nucléaire de cellules somatiques (SCNT) : production asexuée d'organismes dans lesquels une cellule somatique fournit un génome donneur et est reprogrammée pour produire un double génétique de l'animal donneur.

Transgène : construction génétique héritable intégrée aux cellules germinales d'un organisme.

Transgénique : qualifie un organisme contenant une construction.

Vecteur : support employé pour introduire des constructions d'ADN recombiné chez l'animal ou dans la cellule destinataire, par exemple des plasmides, virus ou bactéries.

Liste des participants

EXPERTS

BENFEY, Tillmann J., Professor, Department of Biology, University of New Brunswick, P. O. Box 4400, Fredericton, NB E3B 5A3, Canada (Tel. 001 506 452 6293, Fax. 001 506 453 3583, E-mail: benfey@unb.ca)

BURACHIK, Moisés, Coordinator General, Oficina de Biotecnología, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos Av., Paseo Colón 922 (2nd floor, Office 247), C1063ACW Buenos Aires, Argentina (Tel. +54 11 4349 2074, Fax. +54 11 4349 2178, E-mail: mburac@mecon.gov.ar)

ELMAGBOUL, Salma Bushra Abdel Rahman, Head, Molecular Biology Department, Central Veterinary Research Laboratory, Animal Resources Research Corporation (ARCC), P. O. Box 8067, Khartoum, Sudan (Tel. +249 1227 18328) E-mail: Salma_elmagboul@yahoo.com)

GILL, Harsharn, Research Director - Animal Production Sciences, Primary Industries Research Victoria, Department of Primary Industries - Werribee Centre, 600 Sneydes Road, Werribee, Victoria 3030, Australia (Tel. +61 3 9742 0425, Fax. +61 3 9742 8617, E-mail: harsharn.gill@dpi.vic.gov.au)

HANSEN, Michael, Senior Scientist, Consumers Union, 101 Truman Avenue, Yonkers, NY 10703, USA (Tel. 001 914 378 2452, Fax. 001 914 378 2928, E-mail: hansmi@consumer.org, cc: rabito@consumer.org)

HO, Mae-wan, Director, Institute of Science in Society, ISIS Foundation, 29 Tytherton Road, London N19 4PZ, UK (Tel. 0044 20 7272 5636, E-mail: m.w.ho@i-sis.org.uk)

HOUDEBINE, Louis-Marie, Biologie du Développement et Reproduction, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France (Tel. +33 1 3465 2540, Fax. +33 1 3465 2241, E-mail: louis.houdebine@jouy.inra.fr)

KAPUSCINSKI, Anne R., Professor of Fisheries and Conservation Biology, Sea Grant Extension Specialist in Biotechnology and Aquaculture, and Director, Institute for Social, Economic and Ecological Sustainability, University of Minnesota, 200 Hodson Hall, 1980 Folwell Avenue, St. Paul, MN 55108, USA (Tel. 001 612 624 7719, Fax. 001 612, 625 5299, E-mail: kapus001@umn.edu)

KELLY, Lisa, Principal Scientist, Scientific Risk Assessment and Evaluation, Food Standards Australia New Zealand, P. O. Box 7186, Canberra Mail Centre, ACT 2610, Australia (Tel. +61 3 6248 8649, Fax. +61 2 6271 2278, E-mail: lisa.kelly@foodstandards.gov.au)

MACKENZIE, Anne A., Science Advisor, Programs Branch, Canadian Food Inspection Agency, 159 Cleopatra Drive, Ottawa, Ontario K1A 0Y9, Canada (Tel. 001 613 221 7084, Fax. 001 613 221 0790, E-mail: amackenzie@inspection.gc.ca)

MAKINDE, Martin O., Professor of Animal Science, 1175 Woodlands Drive, Pretoria, 0121 South Africa (Tel. +27 12 333 7090, Fax. +27 12 667 1920, E-mail: makinde@univen.ac.za or makinde@mweb.co.za)

MURRAY, James D., Professor, Department of Animal Science, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616-8521, USA (Tel. 001 530 752 3179, Fax. 001 530 752 0175, E-mail: jdmurray@ucdavis.edu)

NIELSEN, Kaare M., Professor, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tromsø, and Scientific Advisor, Norwegian Institute of Gene Ecology, 9037 Tromsø, Norway (Tel. +47 77 646165, Fax. +47 77 646151, E-mail: knielsen@farmasi.uit.no)

NIEMANN, Heiner, Department of Biotechnology, Institute for Animal Breeding (Institut für Tierzucht - FAL), Mariensee, Höltystrasse 10, 31535 Neustadt, Germany (Tel. +49 5034 871-148, Fax. +49 5034 871-101, E-mail: niemann@tzv.fal.de)

PHIPPS, Richard H., Deputy Director, Centre for Dairy Research, University of Reading, P. O. Box 237, Reading RG6 6AR, UK (Tel. +44 118 378 8494, Fax. 0044 118 378 6595, E-mail: r.h.phipps@reading.ac.uk)

RUDENKO, Larisa, Senior Advisor for Biotechnology, Center for Veterinary Medicine/ONADE, US Food and Drug Administration/DHHS, 7500 Standish Place, Rockville, MD 10855, USA (Tel. 001 301 827 1072, Fax. 001 301 594 2297, E-mail: larisa.rudenko@fda.hhs.gov)

WOLL, Karl, Adviser, Office of Social Affairs, Health and Consumer Protection / Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes (LSGV), Konrad-Zuse-Strasse 11, Postfach 66104, 66115 Saarbrücken, Germany (Tel. +49 681 9978-4115, Fax. +49 681 9978 4197, E-mail: K.Woll@lsgv.saarland.de)

YAMASHITA, Michiaki, Food Biotechnology Section, Biochemistry and Food Technology Division, National Research Institute of Fisheries Science, 2-12-4 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-8648, Japan (Tel. +81 45 788 7665, Fax. +81 45 788 5001, E-mail: mic@affrc.go.jp)

SECRÉTARIATS DE LA FAO ET DE L'OMS

(OMS)

SCHLUNDT, Jørgen, Director, Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases (FOS), Sustainable Development Cluster (SDE), World Health Organization, Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (Tel. +41 22 791 3445, Fax. +41 22 791 4807, E-mail: schlundtj@who.int)

ISEKI, Noriko, Senior Food Standards Officer, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy (Tel. +39 06 5705 3195, Fax. +39 06 5705 4593, E-mail: noriko.iseki@fao.org)

REVERDIN, Marion, Assistant, Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, World Health Organization, Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (Tel. +41 22 791 2682, Fax. +41 22 791 4893, E-mail: reverdinm@who.int)

(FAO)

BOUTRIF, Ezzeddine, Chief, Food Quality and Standards Service (AGNS), Nutrition and Consumer Protection Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy (Tel. +39 06 5705 6156, Fax. +39 06 5705 4593, E-mail: ezzeddine.boutrif@fao.org)

TAKEUCHI, Masami T., Food Quality and Standards Service (AGNS), Nutrition and Consumer Protection Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy (Tel. +39 06 5705 3076, Fax. +39 06 5705 4593, E-mail: Masami.Takeuchi@fao.org)

Liste des documents

Application of genetic engineering for livestock and biotechnology products (Anne MacKenzie)

Latest developments in relation to the use of reporter and selectable genes in animal biotechnology (Louis-Marie Houdebine)

Heritable and non-heritable traits (Larisa Rudenko)

Non-heritable applications of r-DNA animals (exposé dans un document de conférence (CRD 2, pages 2-21) distribué à la 6^{ème} Session du Groupe spécial du Codex, 2006)