



Agence canadienne
d'inspection des aliments

Canadian Food
Inspection Agency

Cadre d'évaluation des risques zoosanitaires pour les animaux issus de la biotechnologie

(J28)

- Novembre 2004 -

Animal Health Risk Analysis
Science
Canadian Food Inspection Agency
3851 Fallowfield Road
Ottawa, Ontario, Canada K2H 8P9

Analyse des risques zoosanitaires (ARZ)
Sciences
Agence canadienne d'inspection des aliments
3851, chemin Fallowfield
Ottawa (Ontario) Canada K2H 8P9

Canada

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	i
Acronymes	iii
1. Introduction	1
1.1 Portée	
1.2 Définition des termes «biotechnologie» et «animal issu de la biotechnologie»	
1.3 Législation	
2. Processus général d'exécution d'une analyse de risques	4
3. Processus d'analyse des risques zoosanitaires pour les animaux issus de la biotechnologie	4
3.1 Lancement du processus	
3.2 Processus d'évaluation des risques	
3.2.1 Identification des dangers	
3.2.2 Évaluation des risques	
Évaluation de la probabilité d'introduction	
Évaluation de l'exposition	
Évaluation des conséquences	
Estimation des risques	
3.3 Examen par les pairs	
3.4 Protocole d'introduction d'un animal	
3.5 Décision de la Division de la santé des animaux et de l'élevage sur la gestion des risques	
4. Gestion des risques	14
5. Communication des risques	14
5.1 Principes de la communication des risques	
Références	16
Glossaire	17

FIGURES

Figure 1. Processus d'analyse des risques zoosanitaires pour les animaux d'origine animale issus de la biotechnologie	5
Figure 2. Processus d'évaluation des risques zoosanitaires pour les animaux d'origine animale issus de la biotechnologie	8

TABLEAUX

Tableau 1	Sommaire des renseignements à fournir	6
Tableau 2	Dangers potentiels liés aux techniques et méthodes utilisées pour la production d'animaux issus de la biotechnologie	10

ANNEXES

Annexe 1	Introduction à la production d'animaux au moyen de la biotechnologie	19
Annexe 2	Demande d'évaluation des risques zoosanitaires pour les animaux issus de la biotechnologie	23
Annexe 3	Renseignements à fournir pour réaliser une analyse de risques zoosanitaires	24
Annexe 4	Sources d'information utiles pour les évaluations de risques	26
Annexe 5	Dangers associés aux animaux issus de la biotechnologie	28
Annexe 6	Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux issus de la biotechnologie	51
Annexe 7	Le bien-être des animaux au Canada et les codes de bonnes pratiques – mise en contexte	59
Annexe 8	Évaluation du bien-être des animaux aux trois stades d'un programme de production d'animaux transgéniques	62
	Références utilisées pour la préparation des annexes	63

Acronymes

AAC	-	Agriculture et Agroalimentaire Canada
ACIA	-	Agence canadienne d'inspection des aliments
ADN	-	acide désoxyribonucléique
ADNmt	-	ADN mitochondrial
ARN	-	acide ribonucléique
ARZ	-	Analyse des risques zoosanitaires
BVDV	-	virus de la diarrhée virale des bovins
DSAE	-	Division de la santé des animaux et de l'élevage
EC	-	Environnement Canada
ESB	-	encéphalopathie spongiforme bovine
FIV	-	fécondation <i>in vitro</i>
GARZ	-	Groupe d'analyse des risques zoosanitaires
HIS	-	hybride interspécifique
IICS	-	injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
LCPE	-	<i>Loi canadienne sur la protection de l'environnement</i> , 1999
M-MoLV	-	virus de la leucémie murine de Moloney
MI	-	microinjection
OIE	-	Office International des Épizooties
pb	-	paires de bases (référence aux nucléotides)
PCR	-	réaction en chaîne à la polymérase
PERT	-	épreuve PERT (Product-Enhanced Reverse Transcriptase)
PERV	-	rétrovirus endogènes porcins (Porcine Endogenous Retroviruses)
RRSN	-	Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles
SC	-	Santé Canada
TGH	-	transfert de gènes horizontal
TGS	-	transfert de gènes au moyen de spermatozoïdes
TN	-	transfert nucléaire (clone non modifié)
UBA	-	Unité de biotechnologie animale
VSV-MoLV	-	virus de la stomatite vésiculeuse – virus de la leucémie murine de Moloney

Cadre d'analyse des risques zoonosaires pour les animaux issus de la biotechnologie

Le Cadre d'analyse des risques zoonosaires pour les animaux issus de la biotechnologie est un protocole utilisé par le Groupe d'analyse de risques zoonosaires et la Division de la santé des animaux et de l'élevage pour réaliser des analyses de risques. Le présent document vise à fournir des lignes directrices sur la façon d'évaluer les risques liés aux animaux et de leurs produits dérivés réglementés par la Division de la santé des animaux et de l'élevage. On s'attend à ce que les animaux réglementés englobent surtout des espèces d'animaux d'élevage, mammifères terrestres et oiseaux, destinés à être utilisés à l'extérieur des établissements de recherche et de développement.

1. Introduction

Le Groupe d'Analyse des Risques Zoonosaires (GARZ) de la Direction générale des Sciences de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) a le mandat de réaliser les analyses de risques zoonosaires et de fournir de l'information et des conseils scientifiques à la Division de la santé des animaux et de l'élevage (DSAE) de l'ACIA, pour l'appui du programme national de la santé des animaux. L'analyse de risques comprend trois processus interactifs, soit l'évaluation des risques, la gestion des risques et la communication des risques (Covello *et al.*, 1993).

Le Cadre d'analyse des risques zoonosaires pour les animaux issus de la biotechnologie est un protocole utilisé par GARZ et l'Unité de Biotechnologie Animale (ABU) de la DSAE pour réaliser des analyses de risques zoonosaires. Il s'inspire du Cadre d'analyse des risques de la Santé des animaux et de l'élevage (GARZ, 2004). Le protocole décrit les processus suivis pour réaliser des analyses de risques zoonosaires et établit des lignes directrices à l'intention des analystes et des gestionnaires de risques. La gestion et la communication des risques zoonosaires sont de la responsabilité de la DSAE, mais relèvent définitivement d'Environnement Canada et Santé Canada qui ont le pouvoir législatif. Cependant, lorsque la situation s'y prête, toutes les parties impliquées dans l'évaluation des risques prennent part à la communication des risques. Dans le présent document, nous nous intéressons plus particulièrement au processus d'évaluation des risques zoonosaires.

1.1 PORTÉE

«L'évaluation des risques, dans le cas de nombreux organismes génétiquement modifiés, peut être une entreprise extrêmement complexe, car elle doit tenir compte à la fois des micro-conséquences de la biologie moléculaire, de la biochimie et de la physiologie ainsi que de la macro-complexité de l'écologie, de la génétique des populations, du comportement, de la biogéographie et de la biologie évolutionnaire.» (traduction libre) (Scientist's Working Group on Biosafety, 1998).

Ce cadre d'analyse de risques traite de l'évaluation des animaux issus de la biotechnologie avec une perspective liée à la santé animale. On s'attend à ce que les animaux réglementés englobent surtout des espèces d'animaux d'élevage, mammifères terrestres et oiseaux, destinés à être utilisés à l'extérieur des établissements de recherche et de développement. Dans le cas d'animaux ou produits d'origine animale (issus de la biotechnologie) importés, il est conseillé de consulter le Cadre d'analyse des risques de la Santé des animaux et de l'élevage (GARZ, 2004) en complément du présent document.

Actuellement au Canada, les animaux issus de la biotechnologie sont presque exclusivement le fruit des activités de recherche et de développement des universités et des entreprises commerciales. Sous juridiction de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, 1999 (LCPE), de tels animaux peuvent être exclus à la réglementation gouvernementale qui s'applique par ailleurs aux établissements de production commerciale, pourvu que l'organisme (ou l'animal) comme tel, son matériel génétique ou des dérivés toxiques ne soient pas relâchés dans l'environnement. On peut s'attendre dans l'avenir à un accroissement de la recherche sur la biotechnologie animale et de ses applications, qui déboucheront sur l'utilisation commerciale d'animaux issus de la biotechnologie. Il est important que le public ait confiance dans la réglementation dont dépend la santé animale. Afin d'atteindre cet objectif, les évaluations prescrites par la réglementation doivent être fondées sur des données scientifiques, et les procédures d'évaluation doivent être rationnelles et pratiques. Par conséquent, GARZ a senti le besoin d'élaborer une démarche permettant d'évaluer les risques zoonosaires reliés aux animaux issus de la biotechnologie.

Le présent document vise à fournir des lignes directrices sur la façon d'évaluer les risques liés aux animaux issus de la biotechnologie. Bien que d'autres aspects comme la santé humaine, les répercussions sur l'environnement, la diversité génétique et la durabilité soient pris en considération, le principal intérêt de ce document porte sur les risques zoonosaires posés par la production de clones, d'animaux transgéniques et autres animaux ou produits dérivés de la biotechnologie. Le bien-être des animaux est également abordé dans le présent document, conformément à l'engagement pris par l'ACIA dans ce domaine (ACIA, 2002; Doonan, 2002) et aux recommandations d'organismes consultatifs non gouvernementaux (United States National Academy of Sciences, 2002).

Les risques liés à chaque animal issu de la biotechnologie doivent être évalués au cas par cas. Cette démarche est justifiée par le grand nombre de variables impliquées, dont une énumération partielle figure ci-dessous :

- ▶ les espèces en cause,
- ▶ l'état sanitaire de l'animal et des troupeaux en cause,
- ▶ les techniques et les matériels employés dans la production d'animaux issus de la biotechnologie,
- ▶ le transgène employé,
- ▶ le potentiel d'exposition au milieu (caractéristiques biologiques et écologiques de l'animal),
- ▶ l'utilisation finale de l'animal.

1.2 DÉFINITION DES TERMES «BIOTECHNOLOGIE» ET «ANIMAL ISSU DE LA BIOTECHNOLOGIE»

Plusieurs lois et Règlements du Parlement (par ex. la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, 1999; le *Règlement sur la santé des animaux*) définissent la biotechnologie comme étant «l'application des sciences ou de l'ingénierie à l'utilisation des organismes vivants ou de leurs parties ou produits, sous leur forme naturelle ou modifiée».

L'expression «animal issu de la biotechnologie» découle de la définition de «biotechnologie» et fait référence aux animaux qui ont été obtenus par des méthodes biotechnologiques. Elle englobe, sans s'y limiter, les catégories d'animaux suivantes (Adlakha-Hutcheon, 2001) :

- ▶ les animaux issus du génie génétique ou génétiquement modifiés dont on a manipulé le matériel génétique par ajout, suppression, inactivation ou modification afin d'influer sur l'expression de leurs gènes et de leurs caractères génétiques,
- ▶ les clones d'animaux issus du transfert du noyau de cellules embryonnaires ou somatiques,
- ▶ les animaux chimériques,
- ▶ les hybrides interspécifiques,

- ▶ les animaux issus de techniques de culture in vitro, comme la maturation ou la manipulation d'embryons.

L'Annexe 1 (Introduction à la production d'animaux au moyen de la biotechnologie) décrit certaines techniques qui sont utilisées pour produire des animaux issus de la biotechnologie.

1.3 LÉGISLATION

Actuellement au Canada, certains animaux issus de la biotechnologie, tel que les animaux transgéniques et les autres animaux issus de la biotechnologie destinés à la production animale sont réglementés par la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, 1999 (LCPE) et ses *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (RRSN). La LCPE est co-administrées par Environnement Canada (EC) et par Santé Canada (SC). La Partie II.1 des RRSN vise à mettre en oeuvre certaines dispositions de la Partie 6 de la LCPE en énonçant les renseignements et les délais que doivent contenir l'avis transmis à Environnement Canada de l'intention d'importer ou de produire un tel animal (ou ses produits dérivés). Ensuite, EC et SC évaluent sa toxicité ou son potentiel à devenir toxique. Pour sa part, le *Règlement sur les aliments nouveaux* administré par Santé Canada en application de la *Loi sur les aliments et drogues* prend effet lorsque le produit est vendu ou annoncé comme étant destiné à l'alimentation humaine. En collaboration avec EC et SC, l'ACIA fournit des conseils scientifiques et techniques, incluant la réalisation d'analyses de risques zoonosaires. Sous juridiction de la *Loi sur la santé des animaux* et son règlement d'application, et de la *Loi relative aux aliments du bétail* et de son règlement d'application, l'ACIA applique les dispositions réglementaires visant la santé des animaux, les produits d'origine animale, les produits vétérinaires biologiques, et les aliments du bétails.

Sur la base de l'utilisation finale pour laquelle un animal ou ses produits dérivés fait l'objet d'une évaluation, différents ministères gouvernementaux sont responsable de l'évaluation. C'est l'utilisation finale du produit qui détermine quel ministère ou quelle agence est responsable de l'évaluation. Voici quelques exemples :

- ▶ Lorsqu'un animal ou ses produits dérivés, dont le sperme, les ovocytes et les embryons, sont destinés à l'importation, on consulte l'ACIA pour l'évaluation (*Loi sur la santé des animaux* et son règlement d'application).
- ▶ Lorsqu'un produit recombinant issu d'un animal vivant est destiné à être utilisé chez les animaux comme produit vétérinaire biologique, on consulte l'ACIA pour l'évaluation (*Loi sur la santé des animaux* et son règlement d'application).
- ▶ Lorsqu'un produit recombinant issu d'un animal vivant est destiné à être utilisé comme matériel médical, xénotransplant, produit biologique thérapeutique, produit cosmétique, médicament à usage vétérinaire, produit chimique industriel ou produit biochimique, on consulte Santé Canada (*Loi sur les aliments et drogues* et son règlement d'application) et Environnement Canada pour l'évaluation (*LCPE, 1999* et *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles*).
- ▶ Lorsque des parties d'animaux, des sous-produits d'origine animale ou des matières d'équarrissage sont destinés à être utilisés comme aliment pour les animaux d'élevage, ou s'ils sont destinés à être utilisés comme engrais, on consulte l'ACIA pour l'évaluation (*Loi relative aux aliments du bétail* et son règlement d'application) ou (*Loi sur les engrais* et son règlement d'application).
- ▶ Lorsque des parties d'animaux, des sous-produits d'origine animale ou des matières d'équarrissage sont destinés à être utilisés dans la fabrication d'un produit cosmétique, on

consulte Santé Canada (*Loi sur les aliments et drogues* et *Règlement sur les cosmétiques*) et Environnement Canada pour l'évaluation (*LCPE, 1999* et *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles*).

Environnement Canada, Santé Canada et l'ACIA veillent, en collaboration, à ce que la salubrité des aliments pour consommation humaine, que la sécurité de l'environnement et à ce que la santé animal et les aliments pour le bétail du produit final soit évaluée.

2. Processus général d'exécution d'une analyse de risques

L'analyse des risques est le processus qui consiste à cerner les éléments qui constituent des risques, à analyser la probabilité qu'ils se concrétisent, à analyser l'importance des répercussions, à gérer ces risques et à les divulguer aux demandeurs, aux intervenants et à la collectivité en général. L'analyse des risques peut être décomposée en trois éléments, soit l'évaluation des risques, la gestion des risques et la communication des risques. Pour plus de détails, il est conseillé de consulter le Cadre d'analyse des risques de la santé des animaux et de l'élevage (GARZ, 2004).

3. Processus d'analyse des risques zoonosaires pour les animaux issus de la biotechnologie

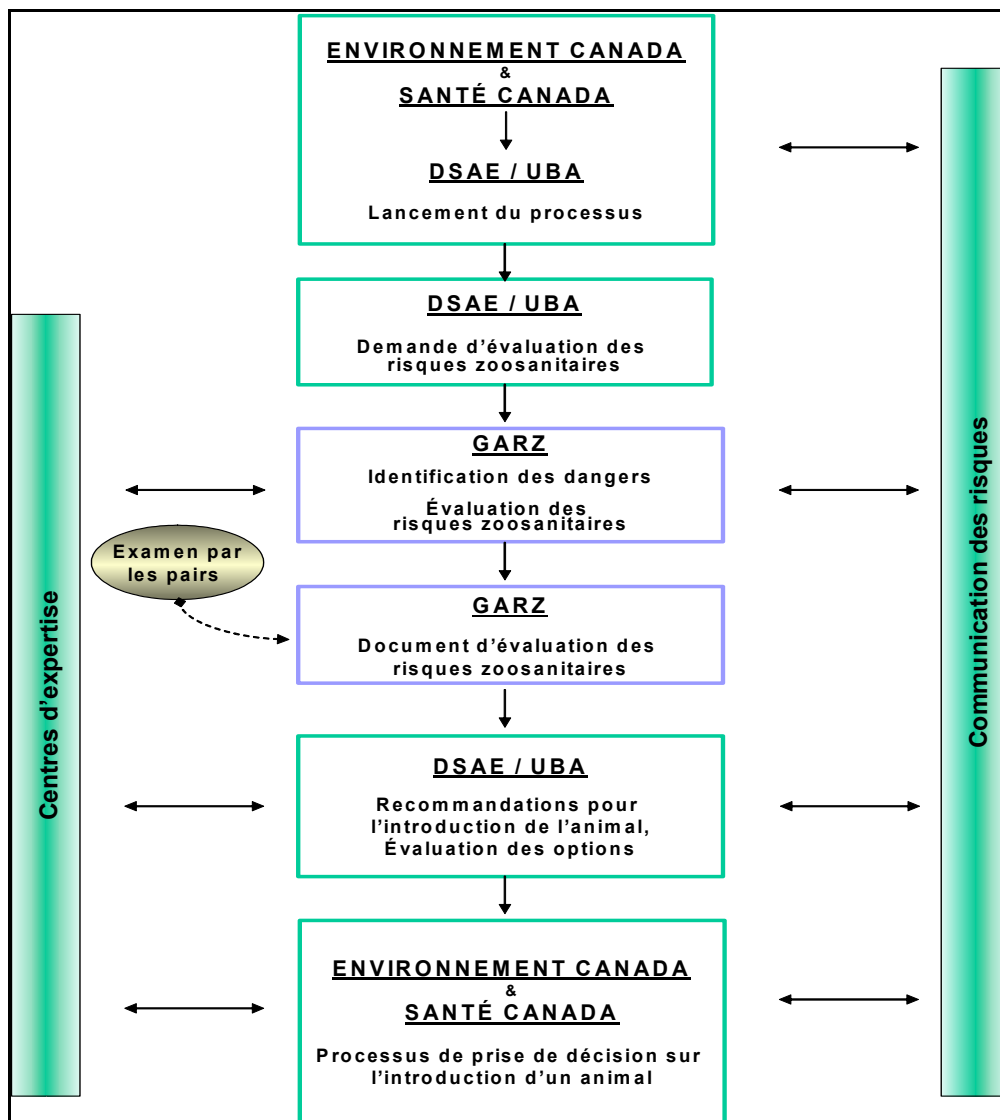
3.1 LANCEMENT DU PROCESSUS

La figure 1 décrit les étapes du processus d'analyse des risques. Le processus d'analyse des risques est déclenché par un demandeur qui présente une demande d'évaluation des risques à Environnement Canada et/ou à Santé Canada. Selon l'utilisation du produit final, on demande ensuite à l'ACIA de collaborer à l'analyse de risques en fournissant des conseils scientifiques et techniques (incluant une analyse de risques zoonosaires) sur la possibilité d'autoriser l'utilisation de l'animal. Qu'il s'agisse d'autoriser l'utilisation unique, multiple ou sur base continue d'un animal les étapes à suivre sont les mêmes.

Au sein de l'ACIA, le processus d'analyse des risques est lancé par le directeur de la Division de la santé des animaux et de l'élevage qui décide de faire une évaluation des risques. L'Unité de biotechnologie animale (UBA) est responsable de compléter le formulaire spécifique de demande d'évaluation des risques (Annexe 2, Demande d'évaluation des risques zoonosaires pour les animaux issus de la biotechnologie). La demande doit être approuvée par le directeur de la DSAE; ensuite, elle doit être envoyée au directeur de la Division des sciences, puis au gestionnaire national du Groupe d'analyse des risques zoonosaires (GARZ). Le respect de toutes les étapes du processus permet au GARZ de traiter la demande efficacement. Pour plus de détails sur les étapes faisant suite à la présentation d'une demande, se reporter au Cadre d'analyse des risques de la Santé des animaux et de l'élevage (GARZ, 2004).

Figure 1

Processus d'analyse des risques zoonosaires pour les animaux issus de la biotechnologie



Le formulaire de demande d'évaluation (Annexe 2) inclus notamment l'historique, le contexte et la description du produit, y compris les protocoles de production, ainsi que le volume, la quantité, la fréquence et les échéances associés à l'introduction proposée. En plus de l'information demandée dans l'Annexe 2, de l'information supplémentaire, tel que présenté dans le Tableau 1, est nécessaire pour réaliser une analyse de risques zoosanitaires (pour de plus amples détails, se reporter à l'Annexe 3, Renseignements à fournir pour réaliser une analyse de risques zoosanitaires). Cette information est fournie par Environnement Canada et Santé Canada via l'Annexe XIX du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (http://www.ec.gc.ca/substances/nsb/fra/B19ew_f.htm).

Tableau 1 Sommaire des renseignements à fournir

1. Description succincte de l'animal
2. Raison de la production
3. Détails sur la production
 - 3.1 Provenance du matériel génétique
 - 3.2 Provenance des animaux donneurs
 - 3.3 État de santé des animaux donneurs
 - 3.4 Provenance des animaux receveurs
 - 3.5 État de santé des animaux receveurs
4. Production d'animaux clonés / transgéniques
 - 4.1 Provenance et contrôle de la qualité des réactifs
 - 4.2 Description détaillée des techniques utilisées
5. Caractérisation des animaux clonés / transgéniques
 - 5.1 État de santé des animaux fondateurs et des générations qui en sont issues
 - 5.2 Caractérisation génétique
 - 5.3 Produit transgénique
 - 5.4 Caractéristiques biologiques et écologiques

N. B. : des renseignements supplémentaires pourraient être demandés (via EC & SC).

3.2 PROCESSUS D'ÉVALUATION DES RISQUES

La première étape du processus d'évaluation des risques zoonosaires consiste à identifier les dangers liés aux animaux pour lesquels une demande a été reçue. Il s'agit à cette étape de recueillir des preuves et, au besoin, de consulter, sur une base de cas par cas, des spécialistes au Canada (au sein de l'ACIA et d'autres ministères) et dans d'autres pays.

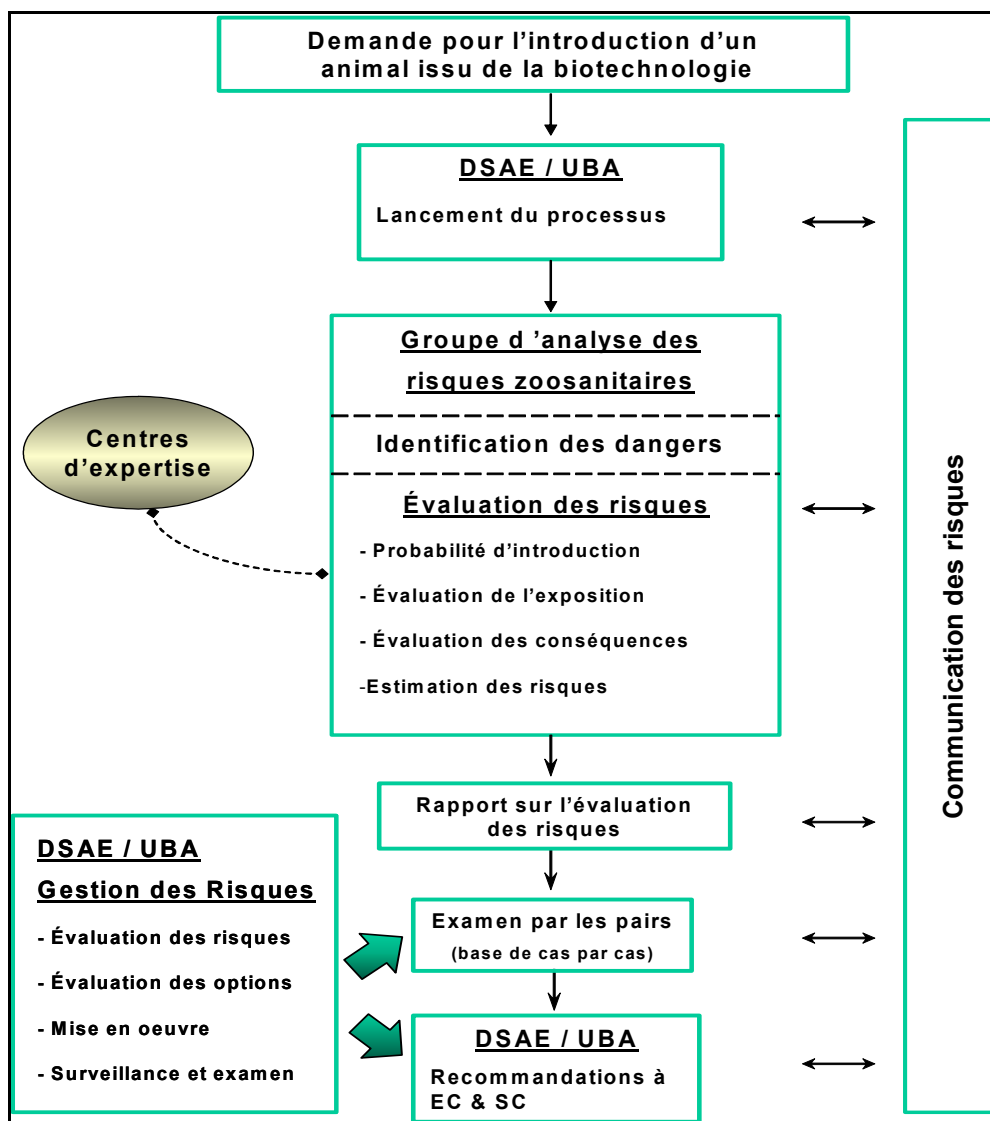
Le processus d'évaluation des risques comporte quatre autres étapes inter-reliées : l'évaluation de la probabilité d'introduction, l'évaluation de l'exposition, l'évaluation des conséquences et l'estimation des risques. D'une part, ces étapes délimitent les diverses phases de l'évaluation des risques en faisant ressortir les événements pouvant mener à la concrétisation du risque identifié et, d'autre part, elles facilitent la compréhension et l'évaluation des résultats. La figure 2 illustre les étapes comprises dans le processus d'évaluation des risques zoonosaires.

Principes de l'évaluation des risques :

- ▶ L'évaluation des risques doit être assez souple pour tenir compte de la complexité des situations de la vie réelle. Il n'existe pas de méthode universelle applicable à tous les cas, ne serait-ce qu'en raison de la variété des produits d'origine animale, des méthodes et des matériels utilisés pour produire l'animal, des dangers multiples qui peuvent être associés à la méthode de production (animaux issus de la biotechnologie), de l'épidémiologie des différentes maladies, des systèmes de dépistage et de surveillance, des scénarios d'exposition, et des types et quantités de données.
- ▶ Les évaluations de risques, tant qualitatives que quantitatives, ont leurs avantages.
- ▶ On préconise fortement une structure organisationnelle où l'évaluation des risques est distincte de la prise de décision en matière de gestion des risques afin que l'évaluation des risques ne soit pas influencée par des conclusions antérieures à portée réglementaire.
- ▶ L'évaluation des risques doit être fondée sur la meilleure information disponible, compatible avec les connaissances scientifiques actuelles. L'évaluation doit être correctement documentée et étayée par des références à la littérature scientifique et à d'autres sources, y compris l'obtention d'avis d'experts (Annexe 4, Sources d'information utiles pour les évaluations de risques).
- ▶ La cohérence et la transparence doivent caractériser l'évaluation des risques. De cette façon, on garantit l'équité et la rationalité, on permet la comparaison des risques et on facilite la compréhension pour toutes les parties intéressées. Une évaluation cohérente peut se limiter à l'étude d'animaux (issus de la biotechnologie) semblables, selon les types et quantités de données disponibles. Cependant, par souci de cohérence, on ne doit pas s'interdire d'améliorer les méthodes d'évaluation des risques.
- ▶ L'évaluation des risques doit témoigner du degré d'incertitude inhérent au résultat de l'estimation des risques.
- ▶ En règle générale, les risques estimés augmentent avec le volume ou la quantité des produits (animaux issus de la biotechnologie) mis en circulation.
- ▶ On doit pouvoir mettre à jour l'évaluation des risques lorsqu'on obtient des renseignements additionnels.

Figure 2

Processus d'évaluation des risques zoosanitaires pour les animaux issus de la biotechnologie



3.2.1 Identification des dangers

Un danger est défini comme étant un agent, un élément ou un événement qui peut causer un préjudice, déclencher un événement nuisible ou entraîner une issue néfaste (GARZ, 2004). L'identification des dangers est une étape où l'on catégorise dichotomiquement les agents biologiques et les dangers génotypique et phénotypique en dangers potentiels ou en dangers non potentiels, selon qu'ils pourraient être introduits en association avec l'animal ou un produit et pour lesquels il existe des voies d'exposition pour les animaux sensibles. L'évaluation des risques prend fin si, au cours de l'étape de l'identification des dangers, il est impossible de déterminer des dangers potentiels pour lesquels il existe une probabilité d'introduction.

GARZ est chargé d'identifier les dangers associés aux animaux issus de la biotechnologie et de leurs produits et d'évaluer les risques liés à la santé animale présentés par chaque danger. Le processus d'évaluation des risques comporte la collecte de preuves et d'information ainsi que la consultation, sur la base de cas par cas, avec des spécialistes au Canada et dans d'autres pays. Les experts travaillant dans les centres d'expertise de l'ACIA et les Centre d'analyse biotechnologique (Unité d'analyse moléculaire) associés sont consultés:

Laboratoire de Charlottetown, Charlottetown, Ile-du-Prince-Édouard
Laboratoire de St-Hyacinthe, St-Hyacinthe, Québec
Laboratoire d'Ottawa (Carling), Ottawa, Ontario
Laboratoire d'Ottawa (Fallowfield), Ottawa, Ontario
Laboratoire de Sidney, Sidney, Colombie-Britannique

Contrairement aux évaluations de risques menées couramment pour les animaux, il faut, dans le cas des animaux issus de la biotechnologie et de leurs produits, prendre en considération non seulement les dangers associés aux agents pathogènes infectieux, mais également les dangers liés à l'impact de la modification génétique sur la santé et le bien-être des animaux et les dangers qui ont des répercussions sur la diversité génétique et la durabilité. Toutefois, comme il a été mentionné précédemment, le présent document s'intéresse principalement aux risques zoonosaires liés à la production d'animaux clonés, transgéniques et autres animaux ou produits dérivés de la biotechnologie. Les critères servant à identifier les dangers présentés par des agents pathogènes infectieux sont décrits dans le Cadre d'analyse des risques de la Santé des animaux et de l'élevage (GARZ, 2004). L'identification des dangers génétiques est fondée sur les preuves scientifiques présentées dans la littérature. Dans le tableau suivant (Tableau 2), on a tenté d'énumérer les dangers potentiels liés aux techniques et méthodes utilisées (pour plus de détails, se reporter à l'Annexe 5, Dangers associés aux animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie). Cette liste n'a pas la prétention d'être complète, et lorsque des dangers auront été identifiés, ils seront ajoutés. Étant donné la vaste portée du présent document, le volume important d'ouvrages scientifiques et le rythme rapide des avancées dans ce domaine, il ne faut pas considérer comme complète et inclusive la liste des références citées. Il est important de noter que, dans un domaine aussi nouveau que la biotechnologie animale, les dangers génotypique et du phénotypique n'ont pas été entièrement identifiés et caractérisés.

Tableau 2 Dangers potentiels liés aux techniques et méthodes utilisées pour la production d'animaux issus de la biotechnologie

<ol style="list-style-type: none">1. Dangers liés à la technique ou au procédé<ol style="list-style-type: none">1.1 Transfert d'agents infectieux adventices1.2 Activation rétrovirale endogène1.3 Hétéroplasmie des mitochondries1.4 Manipulation d'embryons / utilisation de cultures cellulaires2. Dangers liés aux transgènes ou aux produits transgéniques<ol style="list-style-type: none">2.1 Expression transgénique3. Dangers liés aux mutations et à la mutagenèse<ol style="list-style-type: none">3.1 Mutation / mutagenèse4. Autres dangers<ol style="list-style-type: none">4.1 Transfert de gènes de résistance aux antibiotiques de cellules d'animaux transgéniques à l'environnement4.2 Transfert d'ADN comportant des transgènes par le système digestif4.3 Transfert de transgènes à des animaux domestiques, à des animaux sauvages et aux écosystèmes5. Production <i>in vitro</i> d'animaux hybrides interspécifiques

La production d'un animal issu de la biotechnologie représente une série successive d'événements que l'on ne peut pas considérer séparément. Pour un animal transgénique, on commence par la production d'animaux souches (fondateurs) transgéniques et on finit par la production d'un groupe d'animaux transgéniques présentant le caractère souhaité. Il faut évaluer tout au long du processus les risques liés à la production d'au moins une génération et prendre en considération la présence du transgène dans un animal hétérozygote ou un animal homozygote. Quant aux animaux clonés, il faut faire une évaluation depuis la production du clone jusqu'à ses descendants.

L'Annexe 6 (Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux issus de la biotechnologie) tente d'identifier certains effets délétères associés aux dangers. On y présente également les techniques, les types d'animaux issus de la biotechnologie qui pourraient exprimer les effets, la probabilité d'introduction et les voies d'exposition associés aux dangers.

3.2.2 Évaluation des risques

Évaluation de la probabilité d'introduction

L'évaluation de la probabilité d'introduction consiste à décrire et à quantifier la probabilité qu'une source de risque (l'animal) introduise ou autrement dissémine un danger dans un milieu accessible à des populations animales, y compris le risque pour l'animal issu de la biotechnologie lui-même ou pour ses descendants des générations subséquentes.

Pour ce qui est des dangers présentés par les animaux issus de la biotechnologie, l'évaluation de la probabilité d'introduction suppose la prise en compte de la prévalence du danger, le point où le danger peut être détecté ainsi que les méthodes utilisées pour le détecter. L'évaluation de l'introduction décrit généralement les dangers, quant au genre, à la quantité, au moment et à la probabilité de son

introduction. De plus, elle se prononce sur la façon dont ces variables pourraient changer à la suite d'un certain nombre d'actions, d'événements ou de mesures.

Lorsqu'on évalue les risques zoonosaires présentés par les animaux issus de la biotechnologie, ce sont les divers types de dangers – infection, génétique – qui dictent les multiples facteurs qu'il faut prendre en considération dans une évaluation de la probabilité d'introduction. De plus, dans toute évaluation de la probabilité d'introduction d'un danger lié à un animal issu de la biotechnologie, il faut examiner les effets des déchets d'origine animale.

Évaluation de l'exposition

L'évaluation de l'exposition consiste à décrire et à quantifier les conditions et les caractéristiques de l'exposition des populations animales aux dangers produits ou disséminés par une source de risque donnée. L'évaluation de l'exposition décrit généralement le degré, le moment, la fréquence et la durée de l'exposition, les voies d'exposition ainsi que les caractéristiques (nombre d'individus, espèces, etc.) des populations animales qui pourraient être exposées.

L'Annexe 6 (Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux issus de la biotechnologie) présente de l'information détaillée sur l'évaluation de la probabilité d'introduction et l'évaluation de l'exposition par rapport à des dangers identifiés.

Évaluation des conséquences

L'évaluation des conséquences consiste à décrire et à quantifier la relation entre des expositions données à un agent biologique et les répercussions économiques de ces expositions. Un processus causal doit être établi, par lequel l'exposition donne lieu à des effets néfastes sur la santé ou l'environnement. L'évaluation des conséquences décrit généralement l'effet de divers scénarios d'exposition sur la santé des populations animales. Lors d'évaluation des risques zoonosaires d'animaux conventionnels, les conséquences sont reliées aux agents infectieux et peuvent inclure les éléments suivants :

- ▶ animal mortalité et morbidité,
- ▶ pertes de production (ex.: baisse du taux de reproductivité, taux de conversion alimentaire, etc.),
- ▶ coûts associés au contrôle des maladies (ex.: frais vétérinaires, vaccinations, antibiotiques, dépopulation, décontamination, etc.),
- ▶ diminution du commerce (ex.: exportation d'animaux vivants, produits)
- ▶ implications au niveau de la santé humaine (ex.: zoonoses).

Ces conséquences s'appliquent également aux animaux issus de la biotechnologie. De plus, certaines conséquences reliées aux caractères génotypiques et phénotypiques des dangers identifiés, doivent être considérées. Par exemples:

- ▶ mortalité et morbidité périnatale,
- ▶ coûts associés aux changements génotypiques et phénotypiques des animaux issus de la biotechnologie (ex.: effets sur les fonctions immunitaires),
- ▶ la perte d'une partie du patrimoine génétique, (ex.: l'animal hôte et les espèces reliées),
- ▶ coûts associés au suivi des animaux issus de la biotechnologie et de leurs produits,
- ▶ impacts sur le commerce et les habitudes des consommateurs,
- ▶ les considérations liées à la santé des animaux et à leur bien-être (Annexe 7 : Le bien-être des animaux au Canada et les codes de bonnes pratiques – mise en contexte; Annexe 8: Évaluation du bien-être des animaux aux trois stades d'un programme de production d'animaux transgénique),
- ▶ les conséquences néfastes pour l'environnement, incluant les perturbations des écosystèmes et l'extinction d'espèces indigènes,
- ▶ les coûts du contrôle et de l'éradication,

- ▶ les coûts de la quarantaine et de la mise en isolement,
- ▶ les coûts du nettoyage et de la désinfection,
- ▶ les coûts des traitements,
- ▶ les coûts de la vaccination.

Estimation des risques

L'estimation des risques consiste à intégrer les résultats de l'évaluation de la probabilité d'introduction, de l'exposition et des conséquences de manière à produire des mesures quantitatives des risques pour la santé animale. Le processus aboutit à des estimations de l'ampleur des conséquences négatives possibles sur la santé animale, particulièrement à une caractérisation des probabilités, des incertitudes ou du niveau de confiance associés à ces estimations. Par conséquent, l'estimation des risques tient compte de l'ensemble des voies critiques du risque, depuis l'identification du danger jusqu'aux conséquences indésirables.

L'évaluation qualitative du risque est donc la somme des résultats des évaluations de la probabilité d'introduction, de l'exposition et des conséquences.

Une évaluation quantitative peut permettre d'établir :

- ▶ une estimation du nombre de troupeaux, d'animaux qui éprouveront des problèmes de santé et subiront d'autres effets de gravité diverse avec le temps,
- ▶ les distributions de probabilité, les intervalles de confiance et autres estimateurs de l'incertitude liée aux estimations,
- ▶ une indication de la variance de toutes les données d'entrée du modèle,
- ▶ une analyse de sensibilité permettant de classer les données d'entrée par rapport à leur contribution à la variance du résultat de l'estimation des risques,
- ▶ l'analyse de la dépendance et de la corrélation entre les données d'entrée du modèle.

3.3 EXAMEN PAR LES PAIRS

Une ébauche de l'évaluation des risques zoonosaires est produite puis, sur une base de cas par cas, distribuée aux fins d'examen par les pairs. L'importance de l'examen par les pairs, particulièrement en ce qui a trait aux évaluations de risques liés à la biotechnologie, a été mise en évidence dans plusieurs rapports et études (ex. Comité consultatif canadien de la biotechnologie, 2002).

Les participants à l'examen par les pairs sont choisis en fonction des particularités de l'évaluation des risques. Il peut s'agir de :

- ▶ personnel de l'ACIA, y compris des personnes travaillant dans l'Unité de biotechnologie animale (UBA),
- ▶ autres employés du gouvernement du Canada,
- ▶ spécialistes non gouvernementaux travaillant dans l'industrie et les universités.

Lorsque jugés pertinents, les commentaires faits par les participants seront intégrés au document d'évaluation des risques.

3.4 PROTOCOLE D'INTRODUCTION D'UN ANIMAL

Il incombe à l'Unité de biotechnologie animale (UBA) d'élaborer les recommandations d'un protocole régissant l'introduction (ou autorisant l'utilisation) d'un animal issu de la biotechnologie. Les

recommandations sont basés sur la tolérance du risque estimé, information figurant dans le document d'évaluation des risques zoonosaires.

Pour ce faire, l'UBA peut être amenée à consulter des spécialistes de l'ACIA, y compris des membres du GARZ, des laboratoires, des services juridiques, etc.

Il est important de reconnaître que, la décision finale d'approuver l'introduction dans l'environnement d'animaux ou de produits d'origine animale issus de la biotechnologie est la responsabilité d'Environnement Canada et de Santé Canada.

Les considérations liées au protocole d'introduction et à la gestion des risques (évaluation des options) peut englober, entre autres, les éléments suivants :

- ▶ les exigences de bioconfinement applicables à l'animal ou au produit (semence, embryon ...)
- ▶ toute restriction applicable à la reproduction,
- ▶ les utilisations permises du produit,
- ▶ les utilisations au pays et ailleurs,
- ▶ les exigences d'étiquetage,
- ▶ les exigences de traçabilité,
- ▶ les exigences de surveillance – stabilité des gènes, répercussions sur la santé, expression des gènes, etc.,
- ▶ les répercussions de l'introduction sur les populations naturelles et sur l'écosystème.

3.5 DÉCISION DE LA DIVISION DE LA SANTÉ DES ANIMAUX ET DE L'ÉLEVAGE SUR LA GESTION DES RISQUES

Lorsque finalisée et approuvée par le directeur de la DSAE, les recommandations, d'un point de vue lié à la santé animale, d'accepter ou pas l'introduction dans l'environnement d'un animal issu de la biotechnologie sont envoyés à Environnement Canada et de Santé Canada.

4. Gestion des risques

Des options s'offrent aux gestionnaires qui doivent gérer les risques. La gestion des risques suppose la prise d'un certain nombre de mesures; toutes les mesures ne sont pas cependant nécessaires pour chaque analyse de risques. Parmi les éléments de la gestion des risques, mentionnons :

- ▶ Évaluation des risques : la composante de la gestion des risques qui consiste, en premier lieu, à décider de demander une évaluation des risques et, en second lieu, selon le résultat de l'évaluation des risques, à interpréter et à comparer les risques, à juger de leur importance et à décider dans quelle mesure ils sont tolérables.
- ▶ Évaluation des options : la composante de la gestion des risques qui consiste à déterminer les mesures d'atténuation des risques, à évaluer leur efficacité et leur faisabilité et à choisir celles (en plus des mesures qui peuvent avoir été prises en considération lors de l'évaluation initiale des risques) qui permettront de réduire les risques zoonosaires associés aux animaux issus de la biotechnologie. Par efficacité, on entend la mesure dans laquelle une option permet de réduire la probabilité et l'ampleur de conséquences biologiques et économiques négatives. L'évaluation de l'efficacité est un processus itératif qui suppose que l'on intègre les options d'atténuation dans l'évaluation initiale des risques puis que l'on réévalue les risques afin d'établir dans quelle mesure les risques sont réduits. L'évaluation de la faisabilité porte normalement sur les facteurs techniques, opérationnels et économiques influant sur la mise en œuvre des options de gestion des risques.
- ▶ Mise en œuvre : la composante de la gestion des risques qui consiste à prendre les mesures appropriées suite à la décision d'accepter ou de refuser d'introduire l'animal ou le produit animal.
- ▶ Surveillance et examen : la composante de la gestion des risques qui consiste à observer, sur une base permanente, l'introduction de l'animal ou du produit animal et à faire, au besoin, un examen de l'évaluation des risques, des mesures d'atténuation des risques et de la décision de gestion des risques.

5. Communication des risques

La communication des risques a lieu tout au long du processus d'analyse des risques. Un échange interactif d'information sur les risques se fait entre les analystes de risques, les gestionnaires de risques et les autres parties intéressées. Cet échange commence lorsqu'une demande d'analyse des risques est requise et il se poursuit jusqu'après la mise en œuvre de la décision sur l'acceptation ou le rejet de l'animal. La communication des risques fait partie intégrante du processus d'analyse et de gestion des risques et ne doit pas être considérée comme une activité secondaire. La communication des risques aux intervenants incombe à Environnement Canada et Santé Canada. Lorsque c'est nécessaire, elle doit être assurée aussi par toutes les parties intervenants dans le processus d'évaluation des risques.

L'intérêt véritable et généralisé accordé par le public à la biotechnologie fait de la communication des risques une nécessité. En 2001, la Direction des affaires publiques et réglementaires de l'ACIA a publié un document de travail intitulé «La communication des risques et le gouvernement : théorie et application à l'Agence canadienne d'inspection des aliments».

Une fois qu'ils auront été examinés et approuvés, les documents d'évaluation des risques zoonosaires pour les animaux issus de la biotechnologie seront affichés sur le site Web de l'ACIA.

5.1 PRINCIPES DE LA COMMUNICATION DES RISQUES

- ▶ La communication des risques doit être un processus ouvert, interactif et transparent permettant l'échange d'information même après que la décision sur l'introduction a été prise.
- ▶ Les principaux destinataires de la communication des risques sont, en plus du demandeur et des autres ministères, les autorités des pays en cause et d'autres intervenants, comme les associations sectorielles nationales et étrangères, les éleveurs nationaux et les groupes de défense des consommateurs.
- ▶ L'examen par les pairs doit être une composante de la communication des risques, car il permet de soumettre les données à une appréciation scientifique et analytique et de garantir la validité des données, méthodes et hypothèses scientifiques.
- ▶ L'incertitude du modèle, les données d'entrée du modèle et les estimations de risques sont tous des éléments d'une évaluation des risques qui doivent être communiqués.

RÉFÉRENCES

Adlakha-Hutcheon, G. (2001). «Transgenic Animal Safety Assessments: Transgenic Avian Species / Internal Report», Animal Biotechnology Unit, Animal Health and Production Division, Rapport interne, CFIA.

Analyse des risques zoonosaires, (2004). «Cadre d'analyse des risques de la Santé des animaux et de l'élevage». GARZ, Division des sciences, ACIA.
(<http://www.inspection.gc.ca/francais/sci/ahra/rianfrwk/rianfrwkf.shtml>)

Comité consultatif canadien de la biotechnologie, (2002). «Améliorer la réglementation des aliments génétiquement modifiés et des autres aliments nouveaux au Canada». Rapport présenté au Comité de coordination ministérielle de la biotechnologie du gouvernement du Canada, 2002.
(<http://cbac-cccb.ca/epic/internet/incbac-cccb.nsf/fr/ah00186f.html>)

Canadian Food Inspection Agency, (2002). Draft: «Farm Animal Welfare Infrastructure». CFIA Performance Measurement and Program Support, Animal Health and Production Division, CFIA.

Agence canadienne d'inspection des aliments, (2001). «La communication des risques et le gouvernement : théorie et application à l'Agence canadienne d'inspection des aliments». Direction générale des affaires publiques et réglementaires, ACIA, 2001.
(<http://www.inspection.gc.ca/francais/corpaffr/publications/riscomm/riscommf.shtml>)

Covello, V.T. et Merkhofer, M.W., (1993). *Risk assessment methods. Approaches for assessing health and environmental risks*. Plenum Press, New York, 319 p.

Doonan, G. (2002). «So what does a food inspection agency have to do with animal welfare?» CFIA Officer Training Program, CFIA.

Scientist's Working Group on Biosafety, (1998). *Manual for Assessing Ecological and Human Health Effects of Genetically Engineered Organisms*. The Edmonds Institute, Washington DC,
(<http://www.edmonds-institute.org/manp1os.pdf>)

United States National Academy of Sciences, (2002). *Animal Biotechnology: Science-based concerns*, Chapter 6, National Academy Press, Washington, DC, USA.

GLOSSAIRE

ADN :	Acide désoxyribonucléique. (<i>DNA</i>)
Aneuploïde :	Désigne les noyaux, les cellules et les organismes dont le nombre chromosomique n'est pas un multiple du nombre de chromosomes caractéristique de l'haploïde. (<i>Aneuploid</i>) (réf. : PDB)
Apoptose :	Mort cellulaire programmée de la cellule survenant normalement au cours du développement, durant le vieillissement et dans divers états pathologiques. (The University of Kansas Medical Center: http://www.kumc.edu/instruction/medicine/pathology/ed/keywords/kw_apoptosi.html)
Blastocyste :	Stade du développement mammalien où se produit l'implantation dans la paroi de l'utérus, la masse interne de la cellule s'étalant dans le blastocœle comme un disque. (<i>Blastocyst</i>) (réf. : PDB)
Cellule souche :	Cellule indifférenciée d'origine embryonnaire ou adulte qui se divise pour donner une nouvelle cellule souche et une autre qui peut s'engager dans une voie de différenciation particulière. (<i>Stem cell</i>) (réf. : PDB)
Chimère :	Terme désignant habituellement un organisme qui (contrairement à une mosaïque) se compose de cellules issues de génomes différents et résultant de manipulations expérimentales comme les greffes ou l'agrégation en début de développement. (<i>Chimera</i>) (réf. : PDB)
Clone :	<ol style="list-style-type: none">1) Groupe d'organismes à génotype identique, résultant d'un quelconque processus de reproduction asexuée et de certains processus de reproduction sexuée.2) Groupe de cellules descendant de la même cellule parentale.3) Une séquence d'acide nucléique est dite clonée lorsqu'elle est insérée dans un vecteur et copiée avec le génome de celui-ci dans la cellule hôte.4) Organisme produit par un processus asexué, habituellement par la fusion d'une cellule (embryonnaire ou adulte) avec un oocyte énucléé. (<i>Clone</i>) (réf. : PDB)
Effet de position :	Modification phénotypique ne résultant pas d'une mutation génétique en soi, mais d'un changement de position d'un élément génétique. (<i>Position effect</i>) (réf. : PDB)
Électroporation :	Procédé par lequel un courant électrique appliqué à des cellules en culture perturbe suffisamment leur membrane pour créer de minuscules pores par lesquels de l'ADN peut pénétrer. (<i>Electroporation</i>)
Empreinte parentale :	Expression différente d'un allèle ou d'un segment de chromosome selon son origine parentale. (<i>Imprinting, genomic</i>) (réf. : CAG)
Épigénèse :	En termes modernes, désigne les mécanismes par lesquels l'ADN est contrôlé et régulé dans un contexte précis pour produire des profils d'expression génique différents face à des signaux environnementaux différents. Selon un principe de base, la séquence d'ADN ne renferme pas, en soi, suffisamment d'information pour déterminer comment les produits géniques interagissent pour produire tout genre de mécanisme. (<i>Epigenesis</i>) (réf. : PDB)

Influence épigénétique :	Facteur qui influe sur le phénotype sans influencer sur le génotype. (<i>Epigenetic influence</i>) (réf. : CAG)
Mitochondrie :	Organite cytoplasmique de toutes les cellules eucaryotes, siège principal de la respiration aérobie et source de la plus grande partie de l'ATP (adénosine-triphosphate) dans ces cellules. (<i>Mitochondrion</i>) (réf. : PDB)
Mixoploïdie :	Tissu ou individu formé d'un mélange de cellules possédant un nombre différent de chromosomes (mosaïque chromosomique). (<i>Mixoploidy</i>) (réf. : CAG)
Mosaïque :	Organisme constitué de clones de cellules de génotypes différents issus, toutefois, du même zygote (contrairement à une chimère). (<i>Mosaic</i>) (réf. : PDB)
Pléiotropie :	Capacité de substitutions alléliques au locus d'un gène, ou d'un produit cellulaire, à influencer l'apparition de plus d'un aspect d'un phénotype ou à y participer. (<i>Pleiotropy</i>) (réf. : PDB)
Rétrovirus :	Membre de la famille des <i>Retroviridae</i> . Virus à ARN pour lequel le cycle de réplication comprend l'intégration d'une copie de l'ADN du génome viral, produit par transcription inverse, dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte. Cette propriété a été exploitée par l'utilisation de vecteurs rétroviraux pour l'insertion d'ADN étranger dans des cellules et des organismes. (<i>Retrovirus</i>)
Transgène :	Tout gène d'un organisme introduit par manipulation génétique dans un autre organisme d'une espèce différente (transgène hétérologue / xénogénique). Le gène peut également provenir de la même espèce sous le contrôle d'un nouveau promoteur (transgène homologue / autogénique). (<i>Transgene</i>)
Zygote :	Produit cellulaire de l'union de deux gamètes. (<i>Zygote</i>) (réf. : PDB)

Références :

- PDB Thain, M, and Hickman, M, (2000). *Penguin Dictionary of Biology*, 10th Edition. Penguin Books, London UK.
- CAG Passarge, E. (2001). *Colour Atlas of Genetics*, Second Edition. Thieme, Stuttgart.

Annexe 1

INTRODUCTION À LA PRODUCTION D'ANIMAUX AU MOYEN DE LA BIOTECHNOLOGIE

1. Introduction à la production d'animaux au moyen de la biotechnologie

Grâce à la biotechnologie, il est possible de produire des animaux à caractères nouveaux à diverses fins et notamment pour :

- ▶ améliorer la productivité, i.e. la production de lait, de viande, d'oeufs, de laine,
- ▶ réduire ou éliminer les sous-produits inutiles ou les déchets, comme le phosphore dans le lisier de porc,
- ▶ appuyer la recherche biomédicale,
- ▶ fabriquer des produits biopharmaceutiques.

Il est possible de produire des copies quasi identiques d'animaux possédant des caractéristiques intéressantes ou de modifier leurs cellules germinales en y introduisant de nouveaux gènes par transfection ou au moyen de vecteurs rétroviraux ou de transposons. On peut ensuite cloner les animaux génétiquement modifiés ainsi obtenus pour produire une génération transgénique pratiquement identique à l'animal parent.

Dans les pages qui suivent, nous verrons certaines des techniques utilisées pour produire des animaux au moyen de la biotechnologie.

1.1 CLONAGE ARTIFICIEL PAR TRANSFERT DE NOYAU

Le terme «clone» peut prêter à confusion. En général, en biologie, il désigne une copie de séquence d'acide nucléique : c'est pourquoi on peut parler de clonage de gènes. Par ailleurs, dans l'acception plus spécifique qu'il a en rapport avec les animaux, le terme clonage désigne la production d'organismes entiers, à partir d'un noyau, d'une cellule ou d'un élément asexué. Ce processus peut simplement résulter d'une division ou il peut être artificiel, et beaucoup plus intrusif; c'est le processus artificiel qui est particulièrement d'intérêt dans ce document.

La production en laboratoire de vertébrés entiers, et notamment de bovins, par clonage de cellules embryonnaire est possible depuis les années 1980 (Willadsen *et al.*, 1991), mais c'est avec Dolly que la technologie du clonage a fait une percée importante. Depuis la création de Dolly, la production d'animaux vivants par transfert de noyaux de cellules somatiques a été rapporté chez le bovin (Kato *et al.*, 1998), la souris (Wakayama *et al.*, 1998), la chèvre (Baguisi *et al.*, 1999), le porc (Betthauser *et al.*, 2000) et le chat (Shin *et al.*, 2002).

Dove (2000) décrit les grandes étapes de l'évolution du clonage et de la technologie transgénique.

1.2 PRODUCTION D'ANIMAUX TRANSGÉNIQUES

1.2.1 Microinjection pronucléaire

L'injection de gènes exogènes directement dans le pronucléus d'un oeuf fécondé est la méthode de production d'animaux transgéniques qui a été la plus employée. Cette méthode a été utilisée pour produire des animaux transgéniques chez de nombreuses espèces, dont la souris, le porc, le mouton, le lapin, le rat, la chèvre et le bovin (Wall, 2002). Sa polyvalence (pas de spécificité d'espèce) et sa simplicité constituent ses principaux avantages. Parmi ses inconvénients, mentionnons une efficacité médiocre, en raison du faible taux de survie à terme des embryons, du faibles taux d'intégration de l'ADN et du comportement imprévisible des transgènes, quant au site d'insertion et au nombre de copies insérées (Wall, 2002).

Chez les espèces aviaires, des limitations d'ordre technique restreignent l'utilisation de la microinjection directe d'ADN dans le pronucleus mâle d'un œuf fécondé. Cependant, la culture *ex vivo* a permis de produire des embryons et des poussins mosaïques, avec de rare modification génique des lignées germinales (Adlakha-Hutcheon, 2001; Naito, 1997).

1.2.2 Transfert de gènes au moyen de rétrovirus

La production d'animaux transgéniques par transfert de gènes reposant sur l'utilisation de rétrovirus a été effectuée chez diverses espèces, dont la souris, le poulet, le medaka, la mactre d'Amérique, le poisson zèbre, les bovins, le singe rhésus et le porc (Wall, 2002; Chan *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2001; Cabot *et al.*, 2001).

Les inconvénients de la méthode classique de transfert génique au moyen de rétrovirus comprennent la petite quantité d'ADN transgénique pouvant être insérée dans le vecteur rétroviral (<10 kilobases), la possibilité d'expression réduite en raison de l'hyperméthylation de la longue répétition terminale (LRT) et la complexité du processus (Wall, 2002). Certains s'inquiètent aussi du risque de production de rétrovirus capables de se répliquer et de l'activation de rétrovirus endogènes qui pourraient résulter de l'utilisation de vecteurs rétroviraux.

Une méthode de transfert de gènes au moyen de rétrovirus semblable à celle utilisée pour le transfert de gènes de mammifères a été utilisée avec succès chez les espèces aviaires (Ronfort *et al.*, 1997). Les premiers essais étaient fondés sur l'utilisation de virus dérivés du virus du sarcome de Rous et capables de se répliquer. Ensuite, on a produit des virus incapables de se répliquer, en s'inspirant des virus de la leucose aviaire et du groupe des sarcomes ainsi que du virus de la réticuloendothéliose. Les deux types de virus, capables ou non de répliquer, peuvent transfecter les lignées germinales (Adlakha-Hutcheon, 2001; Ronfort *et al.*, 1997). En raison de l'inefficacité de la transfection des lignées germinales, des procédés à débit élevé sont utiles pour déceler les animaux transgéniques (Harvey *et al.*, 2002). L'utilisation de vecteurs pseudotypes (virus de la stomatite vésiculeuse et virus du lymphome simien) pourrait accroître la transfection des lignées germinales (Mizuarai *et al.*, 2001). Ces vecteurs pseudotypes pourraient cependant avoir une incidence sur la biosécurité (Buglio, 2001).

La plupart des études sur les vecteurs rétroviraux ont porté sur le groupe des oncovirus. D'autres rétrovirus ont toutefois été utilisés, dont des lentivirus et des spumavirus.

1.2.3 Transgénèse fondée sur le transfert de noyaux

L'utilisation répandue du transfert de noyaux ces dernières années a ouvert la voie à une autre méthode de production d'animaux transgéniques. Il s'agit d'une méthode fondée sur la production de lignées cellulaires transgéniques donneuses, qui sont ensuite fusionnées à des ovocytes receveurs énucléés ou utilisées aux fins de clonage par transfert de noyau.

Grâce aux techniques développées avec des cellules souches embryonnaires de souris, les méthodes de transfert de noyaux de cellules somatiques augmentent les possibilités d'insérer des transgènes dans des endroits précis du génome (Clark *et al.*, 2000).

1.2.4 Autres méthodes

Transfert de gènes au moyen de virus (non rétroviraux)

Les adénovirus ont été largement utilisés dans les études de thérapie génique. Dans des travaux visant notamment la production d'animaux transgéniques, des vecteurs adénoviraux incapables de se répliquer ont été utilisés pour le transfert de gènes dans des ovules de souris (Tsukui *et al.*, 1996).

Transfert de gènes au moyen de spermatozoïdes (TGS)

Depuis la mise au point de cette technique, en 1971, le transfert d'ADN exogène au moyen de spermatozoïdes a été utilisé chez le bovin, le hamster, le poulet, le porc, le lapin, le saumon, certains crustacés, le ver à soie, la grenouille et le poisson zèbre. Malheureusement, plusieurs des études publiées n'ont pas démontré de façon concluante des niveaux d'expression appréciables des transgènes. Le transfert génique au moyen de spermatozoïdes peut se révéler particulièrement utile pour les espèces chez lesquelles la manipulation des ovocytes ou des zygotes est particulièrement difficile. De plus, des innovations récentes pourraient permettre d'accroître la performance de cette technique, comme son association avec d'autres méthodes telles que l'intégration d'ADN par le recours à des enzymes de restriction, l'électroporation, les anticorps monoclonaux et l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (IICS) (Chang *et al.*, 2002; Wall, 2002). Le transfert de gènes au moyen de spermatozoïdes présente l'inconvénient de ne pas permettre de choisir l'emplacement de l'insertion du transgène (Gavora, 2002a).

Chromosomes artificiels

On a eu recours récemment à des chromosomes artificiels humains pour produire des bovins transgéniques au moyen d'une méthode faisant appel à la transfection des fibroblastes fœtaux, au transfert de noyaux à des ovocytes receveurs et à la collecte de cellules fœtales transchromosomiques utilisées comme donneurs dans une deuxième ronde de transfert de noyaux pour produire des animaux vivants transchromosomiques (Kuroiwa *et al.*, 2002). La méthode, bien que complexe, pourrait permettre la transgénèse au moyen de gènes hybrides beaucoup plus gros.

Méthodes de ciblage de gènes

Le ciblage d'organes spécifiques pour les transgènes introduits dans des cellules somatiques a été démontré, l'exemple le plus notable concernant le ciblage de la glande mammaire chez les animaux d'élevage aux fins de la production de substances biopharmaceutiques. En se fondant sur la technologie de la thérapie génique, les chercheurs ont mis au point la technique en insérant un gène de l'hormone de croissance humaine lié à un promoteur spécifique de la glande mammaire dans un vecteur rétroviral qu'ils ont injecté directement dans le canal du trayon chez des chèvres (Archer *et al.*, 1994; Brophy *et al.*, 2003).

La mise au point de méthodes de transfert de noyaux chez les animaux d'élevage ouvre la voie aux méthodes de ciblage de gènes pour la production d'animaux transgéniques, ce qui pourrait permettre d'éliminer ou du moins de réduire certains des problèmes liés à la nature aléatoire de l'intégration des transgènes lors de l'utilisation d'autres méthodes (Piedrahita, 2000; Smith, 2001). Chez les animaux d'élevage, des modifications génétiques ciblées ont été réalisées chez le mouton au moyen de fibroblastes ciblés en tant que donneurs de noyaux (Polejaeva et Campbell, 2000). Chez le porc, la recombinaison homologue et le clonage par transfert de noyau ont été employés pour produire des animaux chez lesquels certains gènes sont inactivés (Lai *et al.*, 2002).

Autres méthodes de transfert de gènes

L'efficacité du transfert d'ADN peut être accrue par une transfection ciblée de cellules individuelles (Tirlapur et Konig, 2002). Bien qu'il ne s'agisse pas de ciblage de gène comme tel, on signale que cette méthode permet de réaliser des transfusions avec une efficacité accrue, et ce, sans effets nuisibles sur la croissance et la division cellulaires.

1.3 PRODUCTION D'EMBRYONS OU D'ANIMAUX HYBRIDES INTERSPÉCIFIQUES

On produit des embryons hybrides interspécifiques en incubant ensemble, *in vitro*, des gamètes de deux espèces différentes mais apparentées (selon leur origine évolutive). L'insémination artificielle de sperme dans les voies génitales d'une femelle d'une espèce différente constitue une approche plus traditionnelle; on a utilisé cette méthode, par exemple, pour le bovin domestique et le bison d'Amérique (Basrur, 1986), la chèvre et le mouton (Pinheiro *et al.*, 1989) et l'âne et le cheval (Gray, 1972). On a signalé des cas de gestation résultant de croisements réalisés au moyen de techniques *in vitro* entre ovins et caprins (Kelk *et al.*, 1997) et entre gours et bovins. On a également réussi à produire des embryons par des croisements réciproques entre bovins et buffles d'Inde (Kochhar *et al.*, 2002). Récemment, le transfert de noyaux hétérologues d'espèces différentes dans des ovocytes de vache (Dominko *et al.*, 1999; Saikhun *et al.*, 2002) a donné une nouvelle dimension à l'hybridation interspécifique au moyen de techniques de transfert de noyaux.

Annexe 2**DEMANDE D'ÉVALUATION DES RISQUES POUR LES ANIMAUX ISSUS DE LA BIOTECHNOLOGIE**

Objet de l'évaluation :
Principal demandeur :
Tél. : Fax : Courriel :
Date :
Demande autorisée par :
Date :
Description de l'animal ou du produit animal :

Nom du producteur (entreprise, université, etc.) :
Principale personne-ressource :
Adresse :
Tél. : Fax : Courriel :
page 1

Historique, contexte et justification de la demande :
Description du produit ou de l'activité à évaluer et protocoles de production:
Volume, quantité et fréquence du produit ou de l'activité :
Échéances associées au produit ou à l'activité :

Réservé à l'usage du service d'analyse de risques :
Reçue le :
Signature :
page 2

Annexe 3**RENSEIGNEMENTS À FOURNIR POUR RÉALISER UNE
ANALYSE DE RISQUES ZOOSANITAIRES**

Renseignements à fournir pour réaliser une analyse de risques zoosanitaires

1. Description succincte de l'animal ou du produit**2. Raison de la production****3. Détails sur la production****3.1 Provenance du matériel génétique**

- publications
- vecteurs
- séquences des constructions génétiques
- renseignements sur le produit génique (fonction physiologique, effets biologiques, toxicité, etc.)

3.2 Provenance des animaux donneurs

- espèces, races / souches, origine (canadienne, étrangère)
- autres renseignements pertinents (rapports d'analyse de laboratoire)

3.3 État de santé des animaux donneurs

- sérologie et autres rapports d'analyse de laboratoire
- état sanitaire du troupeau
- maladies cliniques

3.4 Provenance des animaux receveurs

- espèces, races / souches, origine (canadienne, étrangère)
- autres renseignements pertinents (rapports d'analyse de laboratoire)

3.5 État de santé des animaux receveurs

- sérologie et autres rapports d'analyse de laboratoire
- état sanitaire du troupeau d'origine
- antécédents de maladies cliniques

4. Production d'animaux clonés / transgéniques**4.1 Provenance et contrôle de la qualité des réactifs****4.2 Description détaillée des techniques utilisées**

- méthodes et moyens utilisés pour réaliser les modifications
- méthodes de réalisation des modifications génétiques
- nombre d'embryons / d'animaux utilisés

5. Caractérisation des animaux clonés / transgéniques**5.1 État de santé des animaux fondateurs et des générations qui en sont issues**

- espèces, races, provenance
- examen clinique
- biochimie clinique
- hématologie
- analyses sérologiques particulières
- autres (ex. épreuves d'évaluation de la fonction immunitaire, etc.)

5.2 Caractérisation génétique

- caryotypage
- analyse de l'ADN microsatellite
- analyse de l'ADN mitochondrial
- caractérisation du transgène
- nombre de copies
- séquence
- position dans le génome
- expression génique : détection d'ARNm et quantification
- renseignements sur l'excrétion du transgène par l'organisme
- renseignements sur la stabilité du transgène
- renseignements sur la transmission et sur l'expression du transgène chez les descendants (homozygotes, hétérozygotes, transmission par le matériel génétique)
- description des méthodes pouvant servir à reconnaître et à détecter l'organisme modifié

5.3 Produit transgénique

- lieux de production
- quantité produite
- excrétion
- dissémination du produit dans des tissus non ciblés

5.4 Caractéristiques biologiques et écologiques

- cycle vital
- biologie de la reproduction
- contribution à des effets écologiques délétères, notamment pathogénicité, toxicité et caractère envahissant
- description géographique et habitat
- potentiel de dissémination par transfert génique
- lieux et situations où l'organisme a eu des effets écologiques
- rôle dans le cycle biogéochimique
- interaction avec les autres organismes dans l'environnement
- conditions nécessaires à la survie, au développement, à la reproduction et à l'hivernage
- aptitude de l'organisme à servir de vecteur pour des agents contribuant à des effets délétères (agents pathogènes, toxines)
- mécanismes de dissémination de l'organisme et modes d'interaction avec les agents contribuant à sa dissémination

Annexe 4

SOURCES D'INFORMATION UTILES POUR LES ÉVALUATIONS DE RISQUES

Les sources d'information décrites ci-après peuvent être utilisées dans l'évaluation des risques liés aux animaux et les produits d'origine animale issus de la biotechnologie. Cette liste n'est pas exhaustive.

Documents du Groupe d'analyse des risques zoonosaires

- ▶ Cadre d'analyse des risques de la santé des animaux et de l'élevage (GARZ, 2004).
- ▶ A Scientific Review on Transgenic Animal Safety Assessments: Identification and Characterization of Potential Biological Hazards Associated with Transgenic Livestock Generated by Microinjection, Recombinant Retroviruses and Nuclear Transfer (H68) (AHRA, 2001).
- ▶ Transgenic Animal Safety Assessments: Transgenic Avian Species (Adlakha-Hutcheon, 2001).
- ▶ Les dangers de la santé associés aux animaux clonés (ACIA, 2001a).

Documents de l'Agence canadienne de l'inspection des aliments (ACIA)

- ▶ Gavora, J. (2002b). Mitochondria in animal clones. Note de service à l'ACIA (Section des produits biologiques vétérinaires).
- ▶ Agence canadienne d'inspection des aliments, (2002). Infrastructure de protection des animaux d'élevage. ACIA, Mesure du rendement et soutien des programmes, Division de la santé des animaux et de la production.
- ▶ La communication des risques et le gouvernement : théorie et application à l'Agence canadienne d'inspection des aliments. ACIA, Direction générale des affaires publiques et réglementaires, 2001b, (<http://merlin/francais/pubaff/riscomm/riscommf.asp>)

Documents de Santé Canada

- ▶ *Règlement sur les aliments nouveaux*, titre 28 de la partie B du *Règlement sur les aliments et drogues* - définition d'aliments nouveaux) administré par Santé Canada en application de la *Loi sur les aliments et drogues*.
- ▶ Politique intérimaire de la Direction des aliments sur les aliments dérivés d'animaux clonés, (http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/ofb-bba/nfi-ani/f_cloned_animals.html).

Documents d'Environnement Canada

- ▶ Avis 2002-01 sur les renseignements concernant les substances nouvelles. Guide sur l'application du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (RRSN) (s.29.16). Exemption visant les organismes autres que les micro-organismes pour la recherche et le développement. (http://www.ec.gc.ca/substances/nsb/HTML/A0201_f.htm).
- ▶ Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes (Décembre 2001). En conformité avec le *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* et la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (1999). (http://www.ec.gc.ca/substances/nsb/bioguide/fra/Bioguide_f.htm)

- ▶ *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, 1999.

Rapports d'organismes consultatifs

- ▶ Agriculture and Environment Biotechnology Commission, (2002). *Animals and Biotechnology: A Report by the AEBC*.
- ▶ Comité consultatif canadien de la biotechnologie, (2002). *Améliorer la réglementation des aliments génétiquement modifiés et des autres aliments nouveaux au Canada*. Rapport présenté au Comité de coordination ministérielle de la biotechnologie du gouvernement du Canada.
- ▶ United States National Academy of Sciences, (2002). *Animal Biotechnology: Science-based concerns*. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- ▶ Scientist's Working Group on Biosafety, (1998). *Manual for Assessing Ecological and Human Health Effects of Genetically Engineered Organisms*. The Edmonds Institute, Washington, DC, USA.

Document de l'Office international des épizooties (OIE)

- ▶ Revue scientifique et technique (périodique).
- ▶ *Manuel des normes pour les tests de diagnostic et les vaccins* (4^e éd. 2000).
- ▶ *OIE Handbook on Import Risk Analysis: Animal and Animal Products* (Ébauche, novembre 2001).

Journaux scientifiques

De nouvelles données scientifiques peuvent être trouvées dans les journaux spécialisés comme ceux énumérés ci-après.

- ▶ Animal Reproduction Science
- ▶ Current Opinion in Biotechnology
- ▶ Human Gene Therapy
- ▶ Journal of Animal Science
- ▶ Livestock Reproduction Science
- ▶ Nature
- ▶ Nature Biotechnology
- ▶ Nature Genetics
- ▶ Reproduction and Fertility
- ▶ Risk Analysis
- ▶ Science
- ▶ Proceedings of the National Academy of Sciences
- ▶ Transgenic Research
- ▶ Theriogenology

Annexe 5

DANGERS ASSOCIÉS AUX ANIMAUX ISSUS DE LA BIOTECHNOLOGIE

L'identification des dangers consiste à déterminer quels sont les divers risques qui peuvent être associés aux animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie. Un danger est un élément ou un événement qui peut causer un préjudice; un événement défavorable ou une issue néfaste (GARZ, 2004). Toutefois, dans un domaine aussi nouveau que la biotechnologie animale, les agents qui pourraient correspondre à cette définition ne sont pas encore tous répertoriés ni caractérisés. Dans le présent rapport, nous avons tenté de dresser la liste des dangers possible à différents points de vue; par exemple, au point de vue de l'environnement et de l'innocuité, nous avons examiné les questions de santé animale et de santé humaine. Cette liste n'étant pas nécessairement complète, d'autres dangers pourraient s'y ajouter. Vu que le propos du présent document est très vaste, qu'une riche documentation s'y rapporte et que les choses évoluent très vite dans ce domaine, la liste des sources documentaires ne peut être exhaustive.

1. Dangers liés à la technique ou au procédé

1.1 TRANSFERT D'AGENTS INFECTIEUX ADVENTICES

Description

Transfert d'agents infectieux à l'animal issu de la biotechnologie, et peut-être à des animaux de la population. Les vecteurs viraux (rétrovirus et autres), dans la mesure où il y a possibilité d'infection, sont compris dans cette catégorie.

Associations

Embryons fécondés *in vitro*, clones produits par transfert de noyau, hybrides interspécifiques, animaux transgéniques produits par microinjection à des embryons, transfert de gènes par voie virale et transfert de noyaux.

Mécanismes

On sait depuis longtemps que des agents pathogènes peuvent être transmis durant la reproduction normale, l'insémination artificielle et le transfert d'embryons. Bon nombre des travaux publiés sur la question ont trait aux embryons produits *in vivo*, mais récemment, un important corpus s'est constitué sur les embryons produits *in vitro*, particulièrement les embryons de ruminants (Bielanski, 1997; Bielanski *et al.*, 2001a, b; Bielanski *et al.*, 2002; Stringfellow et Givens, 2000a, b). Le clonage par transfert nucléaire et la production d'animaux transgéniques font intervenir des techniques très proches de celles qui sont utilisées pour la fécondation *in vitro* (FIV) (par opposition à la fécondation *in vivo*), et pose vraisemblablement des dangers semblables. Il n'est pas illogique de penser qu'en théorie, comme la manipulation des cellules donneuses, des oocytes et des embryons utilisés pour le clonage et la transgénèse est plus considérable, elle ajoute au risque lié au transfert d'agents adventices.

Outre les agents pathogènes, des microorganismes non pathogènes peuvent se retrouver dans la production d'embryons, notamment des champignons microscopiques (levures et moisissures), des bactéries, des mycoplasmes et des virus. Ces contaminants peuvent provenir des animaux et des humains, des abattoirs, des installations d'exploitation et des laboratoires, de l'équipement et des composantes des milieux de culture (Stringfellow et Givens, 2000b). La contamination par des éléments visibles à l'oeil nu est limitée par la visibilité même des contaminants, les échantillons contaminés étant repérés et éliminés. La contamination qui n'est pas manifeste (asymptomatique), surtout lorsqu'elle met en jeu des mycoplasmes et des virus (spécialement les virus qui ne sont pas cytopathogènes) peut être plus difficile à détecter et peut présenter un danger plus important. Les précautions à prendre dans la manipulation des embryons sont décrites dans le *Manual of the International Embryo Transfer Society* (Stringfellow et Siedel, 3rd ed. 1998).

D'autres sources d'agents adventices susceptibles d'être transmis durant le clonage animal et la production d'animaux transgéniques doivent être prises en compte :

- préparations d'acide nucléique,
- lignées cellulaires additionnelles utilisées (ex. cellules servant à l'enveloppement du vecteur rétroviral, cellules utilisées dans les co-cultures),
- sources de noyaux pour les transferts nucléaires,
- sperme (ex. transfert de gènes au moyen de spermatozoïdes).

De l'information sur les dangers d'infection liés au sperme et aux embryons est fournie dans le Cadre d'analyse des risques de la Santé des animaux et de l'élevage (GARZ, 2004).

Probabilité d'introduction

La probabilité que soient libérés des agents adventices par suite de la production d'animaux et de produits d'origine animale issus de la biotechnologie peut être évaluée à divers stades du processus de production. La probabilité est fonction de la prévalence des maladies causées par les agents dans le milieu considéré, de la situation sanitaire des animaux en jeu et des possibilités de transfert de ces agents pathogènes durant les diverses étapes du processus de production considéré.

Avant de commencer à produire des animaux au moyen de la biotechnologie, on peut évaluer l'état sanitaire des composantes (réactifs, animaux, sperme, embryons, etc.) utilisées. Cette évaluation pourrait notamment comprendre les éléments suivants :

Situation épidémiologique du pays / de la région d'origine

L'Office international des épizooties (OIE) peut fournir de l'information sur certaines maladies. Les autorités vétérinaires du pays d'origine sont aussi une source d'information. Dans l'évaluation de la situation sanitaire, on doit prendre en compte l'infrastructure des services vétérinaires (y compris la surveillance et les services de laboratoire) dans le pays concerné. La marche à suivre pour l'évaluation de l'infrastructure des services vétérinaires est décrite par l'Office international des épizooties (2001).

Évaluation des installations de production aux points de vue de l'hygiène et de la santé animale

Les dossiers de production et les modes opératoires normalisés doivent être mis à la disposition de l'analyste de risques. L'objectif est de voir quelle est la situation épidémiologique des populations animales de l'établissement de production et quel programme de prévention des maladies est mis en œuvre pour les animaux donneurs et receveurs. Il faut notamment considérer les éléments suivants :

- type d'élevage, installations, programme de vaccination,
- biosécurité des installations de production : déplacements d'animaux, quarantaine,
- programme vétérinaire : examen clinique, autopsie (enquête par suite de morbidité / mortalité), analyses de laboratoire, données sur la performance de la reproduction.

Évaluation de l'état de santé des animaux donneurs et receveurs

Les données sanitaires sur les animaux en question doivent être accessibles. Les renseignements utiles portent notamment sur les points suivants :

- histoire de l'animal : provenance, type d'élevage, nombres dans les cohortes, vaccins, antécédents vétérinaires,
- résultats de l'examen clinique,
- sérologie (détection d'anticorps),
- détection d'agents pathogènes : isolement, PCR, détection d'antigènes dans les tissus (ex. immunohistochimie),
- autres analyses en laboratoire : chimie, pathologie clinique et anatomique.

Évaluation de la stérilité des réactifs utilisés

Il fait partie des bonnes pratiques de laboratoire de garder des données détaillées qui permettent de répéter les expériences. Il faut donc conserver des renseignements sur la provenance des réactifs utilisés, avec les numéros de catalogue et de lots, etc.

Les produits d'origine animale, comme les sérums, la trypsine, l'albumine de sérum de bovin, etc., revêtent ici un intérêt particulier.

Dans certains cas, le fabricant du réactif vérifie s'il contient des agents adventices. Le producteur d'animaux peut aussi faire des analyses dans le cadre de son programme d'assurance de la qualité.

Parmi les techniques couramment utilisées figurent les épreuves aux anticorps (neutralisation, fixation du complément (FC), immunodiffusion en gélose (IDG), épreuve immunoenzymatique (ELISA), épreuve de polarisation de fluorescence (PF), etc.), l'isolement ou la culture (oocytes, cellules, milieux de culture), la détection d'antigènes (ELISA, immunofluorescence) et la détection d'acide nucléique (ex. réaction en chaîne à la polymérase (PCR), hybridation).

Évaluation des techniques de production utilisées

Il s'agit d'évaluer les méthodes employées, et notamment les aspects suivants :

- lavage des embryons : présence de trypsine, volumes utilisés, nombre de lavages,
- intégrité de la zona pellucida,
- degré d'intrusion / de pénétration,
- durée de la culture,

- réactifs utilisés,
- présence / absence de cellules de co-culture,
- durée de la culture,
- méthodes de stérilisation des instruments,

N.B. : Il est utile de conserver des renseignements sur toutes les étapes du processus. Il est important de déterminer la cause des avortements d'embryons ou de fœtus, des morts-nés et des morts néonatales.

Évaluation des femelles receveuses

Examen clinique, testes sérologiques

Évaluation de l'état de santé de l'animal fondateur et des générations suivantes

On peut utiliser les mêmes techniques que pour l'évaluation des animaux donneurs et des animaux receveurs.

1.2 ACTIVATION RÉTROVIRALE ENDOGÈNE

Description

On a trouvé des rétrovirus endogènes dans tous les génomes de vertébrés étudiés jusqu'ici (Mang, 2001). En théorie, l'utilisation de rétrovirus incapables de se répliquer comme vecteurs de transgènes pourrait aboutir à l'activation de séquences rétrovirales endogènes par un processus de recombinaison. L'activation de virus recombinants capables de se répliquer pourrait poser un danger, tant pour l'animal hôte que pour d'autres espèces vivantes dont l'espèce humaine, si le rétrovirus était transmissible.

L'utilisation de rétrovirus comme vecteurs peut poser un autre danger : la recombinaison de séquences rétrovirales transgéniques avec des rétrovirus de type sauvage pourrait donner des recombinants auxquels l'animal pourrait être exposé (McTaggart et Al-Rubeai, 2002). Les mécanismes de la recombinaison des rétrovirus sont examinés dans Negroni et Buc (2001).

Association

Animaux transgéniques produits par transfert de gènes au moyen d'un rétrovirus.

Mécanismes

Le risque que peuvent poser les rétrovirus lorsqu'on les emploie comme vecteurs de gènes a surtout été examiné en rapport avec les xénogreffes (Mang, 2001; Weiss, 2001) ou dans le contexte de l'administration de gènes à des fins thérapeutiques (McTaggart et Al-Rubeai, 2002). Le même danger peut toutefois se poser avec la production d'animaux transgéniques.

Les systèmes vectoriels rétroviraux comprennent généralement deux éléments :

- le vecteur rétroviral en tant que tel, qui se compose du transgène à transférer et des séquences nécessaires pour son intégration dans le génome de l'hôte, mais qui ne comprend pas les gènes structuraux (*gag/pol* et *env*), ce qui empêche l'encapsidation et, par le fait même, la formation du virion,
- les cellules d'encapsidation, qui fournissent les protéines (*gag/pol* et *env*) nécessaires à l'encapsidation des gènes du vecteur rétroviral avec les virions.

La plus grande partie de la documentation publiée sur les vecteurs rétroviraux concerne les rétrovirus oncogènes, et en premier lieu le virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV). Toutefois, d'autres types de rétrovirus (c.-à-d. les lentivirus, les spumavirus) ont aussi été utilisés (McTaggart et Al-Rubeai, 2002; Heinkelein *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002).

Des particules rétrovirales capables de se répliquer peuvent résulter de la recombinaison d'ADN vectoriel et d'ADN auxiliaire ou de séquences virales endogènes (McTaggart et Al-Rubeai, 2002). Ce danger est connu depuis longtemps, et on a trouvé des moyens de l'atténuer en abaissant les probabilités de recombinaison. Parmi les stratégies élaborées à cette fin figurent notamment l'utilisation de trois plasmides distincts pour les gènes *gag/pol*, *env* et les gènes vectoriels, et l'utilisation de gènes *gag/pol* et *env* provenant de rétrovirus différents (degré moindre d'homologie entre les séquences) pour réduire la probabilité qu'une recombinaison dans les cellules d'encapsidation ne produise un virus capable de réplication (McTaggart, Al-Rubeai, 2002). On a aussi fait état de vecteurs rétroviraux totalement dépourvus de séquences codantes rétrovirales (Yu *et al.*, 2000). En outre, il faudrait soumettre les cellules d'encapsidation à des analyses pour déterminer si elles renferment des séquences rétrovirales endogènes (Rigg *et al.*, 1996).

Les rétrovirus endogènes qu'on retrouve chez de nombreuses espèces sont souvent rendus incapables de se répliquer par de nombreuses mutations. Ils sont intégrés à un chromosome et transmis par les cellules germinales. Des séquences rétrovirales endogènes peuvent se retrouver dans des rétrovirus exogènes par recombinaison. La plupart des vecteurs rétroviraux M-MLV sont aussi dépourvus des gènes nécessaires à l'activation des rétrovirus endogènes (Bughio, 2001). Certains produits de transcription de rétrovirus endogènes peuvent être adéquatement encapsidés dans des particules (pseudotypes ou imposteurs), ce qui dénote la présence dans l'ARN rétroviral endogène de signaux d'encapsidation qui sont reconnus par les protéines rétrovirales exogènes (Bughio, 2001).

Liet *al.* (2002) ont greffé à des souris irradiées des cellules de moelle osseuse murines contenant un gène marqueur d'usage clinique (dINGFR) inséré au moyen d'un vecteur rétroviral; ils n'ont observé aucune anomalie de l'hématopoïèse. Par contre, lorsque les cellules de moelle osseuse ont été regroupées et ensuite transférées aux souris d'un second groupe, des troubles hématopoïétiques apparentés à la leucémie ont été observés. Les données indiquent de façon assez marquée qu'un cycle de transformation en boucles aurait été lancé par suite d'une activation insertionnelle d'oncogène combinée à une interférence de signal par le produit transgénique. Les témoins ont permis d'exclure la modification de la séquence du transgène, la présence de rétrovirus capables de réplication et l'activation de rétrovirus endogènes.

Bien des espèces de rétrovirus, y compris les rétrovirus endogènes porcins (PERV), sont associés à un phénomène d'immunosuppression chez l'hôte infecté (Denner, 1998).

Détection

L'excrétion de rétrovirus intacts peut être détectée par divers moyens. L'activité transcriptase inverse peut être mise en évidence par une épreuve PERT (Product-Enhanced Reverse Transcriptase). Cette épreuve peut servir à détecter n'importe quel rétrovirus, quelle que soit la séquence en jeu, et s'est révélée très utile pour l'évaluation des lignées cellulaires utilisées dans la production de produits biologiques (Schupbach, 2001). L'ARN rétroviral peut être détecté par RT-PCR. Les séquences d'ADN proviral insérées peuvent être mises en évidence par des techniques portant sur l'acide nucléique, dont la PCR. Il faut toutefois interpréter les résultats avec circonspection, car il existe des séquences rétrovirales endogènes naturelles chez la plupart des animaux. Il faudra peut-être d'autres travaux (ex. du séquençage avec des amorces plus spécifiques) pour parvenir à distinguer les séquences rétrovirales endogènes des séquences rétrovirales associées au procédé de production chez les animaux issus de la biotechnologie.

1.3 HÉTÉROPLASMIE DES MITOCHONDRIES

Description

Présence chez un même individu de mitochondries provenant de l'oocyte énucléé et du noyau.

Associations

Animaux clonés non modifiés et animaux transgéniques produits par transfert nucléaire.

Mécanisme

Normalement, l'ADN mitochondrial (ADNmt) provient de la lignée maternelle, car l'ADNmt du spermatozoïde est éliminé au début de l'embryogenèse (Cummins, 2001). Cependant, on observe parfois une hétéroplasmie stable (Meirelles et Smith, 1998). Durant le clonage par transfert nucléaire, la fusion de la cellule donneuse (10 000 – 40 000 copies d'ADNmt) avec l'oocyte énucléé (plusieurs milliers de copies d'ADNmt) donne un mélange de types d'ADNmt chez l'embryon. Selon la nature de l'ADNmt du clone obtenu, on distingue trois possibilités : homoplasme avec ADNmt de la cellule somatique donneuse, homoplasme avec ADNmt de l'oocyte ou hétéroplasmie (sujet transmitochondrial) (Gavora, 2002b). Chez les bovins, les clones obtenus par transfert nucléaire sont homoplasmiques et hétéroplasmiques (Hiendleder *et al.*, 1999; Meirelles *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2000). Chez les ovins, l'homoplasme de l'ADNmt (avec ADNmt de l'oocyte énucléé) est plus répandue (Gavora, 2002b). On a montré que chez les bovins le degré d'hétéroplasmie baisse lorsque les cellules donneuses sont prélevées à un stade plus avancé de leur développement (Steinborn *et al.*, 1998). Chez certains bovins, le rapport ADNmt de donneur / ADNmt de receveur est resté inchangé jusqu'au terme de la gestation, tandis que chez d'autres, l'ADNmt de donneur de noyau a diminué ou est disparu (Steinborn *et al.*, 2000).

Les gènes mitochondriaux, qui interviennent dans le vieillissement, l'apoptose, le métabolisme et dans de nombreuses maladies, sont contrôlés par un système génomique double, avec les gènes nucléaires (Cummins, 2001). On a avancé une hypothèse selon laquelle une incompatibilité entre les gènes nucléaires et mitochondriaux contribuerait aux insuffisances et aux anomalies associées au transfert nucléaire (Cummins, 2001; Gavora, 2002b).

Prévalence

Dans la plupart des travaux portant sur les ruminants, on a constaté l'homoplasmie avec l'ADN de l'oocyte receveur (ovins) ou la présence d'une faible proportion d'ADNmt de la cellule du donneur chez les animaux produits par transfert nucléaire. Le rapport d'ADNmt de donneur / de receveur était plus élevé lorsque les cellules donneuses étaient prélevées à un stade moins avancé de leur développement (Gavora, 2002b). Dans le cas des bovins, une étude a démontré la stabilité de ce rapport jusqu'à la naissance des clones, apparemment en bonne santé (Steinborn *et al.*, 2000).

L'ADNmt de la descendance d'un animal produite par reproduction naturelle ou par insémination artificielle devrait être le même que celui de la mère, car, dans la plupart des cas, l'ADNmt des spermatozoïdes disparaît. Chez certaines espèces, toutefois, il y a de l'hétéroplasmie naturelle.

Il y aurait lieu d'évaluer les effets de l'hétéroplasmie mitochondriale sur la gamétogenèse et le transfert de ce caractère aux descendants. Jusqu'ici, très peu de données ont été recueillies sur le danger que peut poser ce phénomène pour la descendance.

Détection

L'hétéroplasmie mitochondriale peut être mise en évidence par la comparaison de l'ADNmt de l'animal fondateur ou cloné avec celui des donneurs et des receveurs.

Au nombre des affections que l'asynchronie mitochondriale pourrait peut-être causer figurent diverses maladies métaboliques essentiellement associées à des fonctions énergétiques; les techniques vétérinaires analytiques et cliniques devraient permettre d'évaluer ces phénomènes.

1.4 MANIPULATION D'EMBRYONS/ UTILISATION DE CULTURES CELLULAIRES

Considérations générales

Description

Chez bien des espèces, la manipulation *in vitro* et la culture d'embryons ont de nombreux retentissements sur la santé et le développement des sujets produits. Les problèmes, qui peuvent apparaître n'importe quand au cours d'une longue période, vont de la mort aux premiers stades embryonnaires jusqu'aux anomalies observables après la naissance.

Associations

Animaux clonés obtenus par transfert nucléaire, animaux subissant d'autres manipulations durant le développement embryonnaire réalisées au cours du processus de production d'animaux transgéniques (c.-à-d. microinjection, transfert de gènes par vecteur rétroviral, etc.), autres méthodes faisant intervenir une manipulation *in vitro*.

Mécanismes

Les conséquences de la manipulation des embryons et des cellules sur le développement ont déjà été étudiées chez les rongeurs et les animaux d'élevage (McEvoy *et al.*, 2001). La manipulation et la culture d'embryons ont été associées à plusieurs conséquences à court et à long terme touchant la santé des embryons. Ces dangers se posent aussi chez l'humain dans le cas de la fécondation *in vitro* (Sutcliffe, 2002). On pense que les dangers associés à la manipulation des embryons par exposition à un milieu artificiel, microinjection, transfert nucléaire, ciblage génique ou d'autres moyens, sont dus à des conditions de culture *in vitro* qui auraient un effet délétère aux premières étapes de la régulation du développement mammalien (McEvoy *et al.*, 2001). Parmi les changements de ce genre observés chez des embryons

produits *in vitro* figurent l'incidence accrue de la mixoploïdie chromosomique (McEvoy *et al.*, 2001). On a démontré que ce phénomène est associé à un retard du développement chez la souris, mais rien n'a été encore déterminé dans le cas des animaux domestiques (McEvoy *et al.*, 2001). Des changements d'expression génique, touchant plus particulièrement l'ARN ribosomique, ont été mis en évidence chez des embryons de porcs en culture. Les gènes sensibles au stress associés à des phénomènes de protection chez l'embryon de préimplantation ont aussi été étudiés *in vitro* (McEvoy *et al.*, 2001). L'augmentation des transcrits de ces gènes pourrait être le signe d'effets délétères. Les gènes sensibles au stress sont associés au ralentissement ou à l'arrêt de la croissance, ou au déclenchement de l'apoptose. Il s'agit d'un phénomène naturel, mais les changements peut avoir un retentissement sur la suite du développement embryonnaire. Toutefois, aucun lien n'a encore été formellement établi entre l'incidence de l'apoptose chez les embryons mammaliens obtenus par des techniques *in vitro* et le caractère normal ou anormal du développement fœtal. On a également démontré chez diverses espèces que les conditions de culture *in vitro* influent sur l'expression de nombreux autres gènes (McEvoy *et al.*, 2001).

La reprogrammation de l'ARN ribosomique fait partie de la reprogrammation nucléaire générale qui doit s'opérer après un transfert nucléaire (Baran *et al.*, 2002).

Dans le clonage par transfert nucléaire, le génome du noyau transféré subit une reprogrammation épigénétique (Rideout III *et al.*, 2001). Cette reprogrammation serait liée à la suppression de l'expression de certains gènes et aurait son origine dans l'une des gamètes ayant servi à former l'embryon par des mécanismes comme la méthylation.

Avec la technologie des microréseaux, la quantification de l'expression génique relative est devenue plus facile. Dans une étude où des souris ont été clonées par transfert de noyaux de cellules souches embryonnaires et de cellules de cumulus, l'expression de 10 000 gènes a été évaluée dans le placenta et le foie des nouveau-nés clonés. On a constaté que l'expression avait changé chez environ 4 % des gènes placentaires; dans certains cas, le changement se voyait tant chez les clones issus de cellules souches embryonnaires que chez ceux issus de cellules de cumulus, et dans d'autres cas, le changement n'était pas le même chez les deux groupes. Les gènes touchés dans le foie étaient moins nombreux que ceux du placenta et étaient différents (Humphreys *et al.*, 2002). Quel que soit le type de cellules évalué ou l'espèce considérée, moins de 4 % des embryons produits par transfert nucléaire donnent des sujets vivants (Renard *et al.*, 2002). Les pertes en début de gestation sont généralement supérieures à 50 % chez les bovins, les ovins et les caprins (Renard *et al.*, 2002). Les anomalies placentaires liées au développement insuffisant du placentome et à une vascularisation déficiente pourraient se traduire par une malnutrition fœtale et d'éventuelles séquelles à long terme (Renard *et al.*, 2002).

Dans une étude portant sur des bovins où l'on a comparé la fécondation *in vitro*, le transfert nucléaire embryonnaire nucléaire et le clonage de cellules somatiques, on a constaté que les pertes en fin de gestation sont plus élevées avec le clonage de cellules somatiques, ce qui signifie qu'un vice de reprogrammation s'ajoute aux effets uniquement attribuables à la culture *in vitro* (Heyman *et al.*, 2002).

Prévalence

On ne peut vraiment dire dans quelle mesure les problèmes associés à la reproduction *in vitro* persistent chez le sujet adulte ou encore chez ses descendants; les données qu'on possède sur la question sont contradictoires. On a cru que les changements épigénétiques résultant de manipulations (ex. profil de méthylation de l'ADN, structure de la chromatine) n'étaient pas transmis par les cellules de la lignée germinale (ex. Latham, 1999; Van Reenen *et al.*, 2001). Toutefois, certains signes indiquent que l'expression génique aberrante associée à la modification épigénétique chez des souris obtenues par transfert nucléaire a été transmise à la génération suivante (Roemer *et al.*, 1997, Van Reenen *et al.*, 2001). Des travaux plus poussés devraient permettre de déterminer l'ampleur de ce phénomène.

Détection

Les changements d'expression génique associés à la manipulation d'embryons et à la culture de cellules peuvent être mis en évidence par l'analyse de l'ARNm, ce qui peut mettre en jeu des transferts de type Northern ou des analyses d'expression génique au moyen de microréseaux.

Les manifestations pathologiques du danger peuvent être mises en évidence par un examen clinique et par une évaluation pathologique anatomique et clinique. Les pertes d'embryons et de fœtus devraient faire l'objet d'une investigation afin de déterminer la cause. L'évaluation de certaines fonctions physiologiques peut être un complément utile lorsqu'on soupçonne des problèmes.

Syndrome du gros veau

Description

Le syndrome du gros veau (LOS, pour Large Offspring Syndrom), associé à une taille excessive à la naissance, a été observé chez des animaux des deux sexes dont le poids était de 2 à 5 fois supérieur à la normale pour la race. Il est aussi associé à la dysfonction cardiopulmonaire fœtale, à des difformités des membres et à l'incapacité à téter à la naissance. Ce syndrome se voit surtout chez les ruminants. Il est également associé à la gestation prolongée, à des défauts placentaires ainsi qu'à la dystocie, qui pose un danger pour la mère.

Associations

Le syndrome du gros veau a été associé la culture d'embryons *in vitro*, au transfert d'embryons asynchrone en milieu utérin avancé, au transfert nucléaire (clonage), à une alimentation riche en urée pour la mère et au traitement à la progestérone de la mère (Young *et al.*, 1998; Boerjan *et al.*, 2000). Comme la production d'animaux à caractères désirés peut faire intervenir une méthode de transfert nucléaire, le syndrome du gros veau doit être pris en compte dans l'évaluation des animaux transgéniques.

Mécanismes

Le syndrome du gros veau peut être relié à la modification épigénétique de gènes à empreinte parentale (gènes dont seul l'allèle paternel ou l'allèle maternel est exprimé) durant la culture (McEvoy *et al.*, 2001; Young *et al.*; 2001, Chavatte-Palmer *et al.*, 2002).

On a constaté chez des bovins transgéniques obtenus par microinjection que les veaux issus des embryons produits *in vivo* étaient plus petits que ceux issus des embryons produits par fécondation *in vitro*, et que la microinjection ne semblait pas renforcer l'effet attribuable à la fécondation *in vitro* (Behboodi *et al.*, 2001).

Pertes en cours de gestation

Mortalité néonatale

Morbidité / mortalité chez les jeunes en raison de troubles congénitaux du développement

Association

Ces phénomènes ont été observés chez la plupart des animaux d'élevage.

Mécanismes

Les troubles congénitaux du développement peuvent avoir une origine génétique (ex. anomalies chromosomiques comme l'aneuploïdie, les mutations et les translocations) ou épigénétique (Yin *et al.*, 2002).

Chez le porc, le transfert nucléaire (avec modification génétique) a été associé à des anomalies congénitales du cœur, des yeux, des oreilles, du palais et des membres (Lai *et al.*, 2002).

Durant la gestation, le taux d'attrition embryonnaire et fœtale est extrêmement élevé chez les clones (Cibelli *et al.*; 2002, Kruip *et al.*, 1997). La placentation anormale est l'un des éléments importants de ce phénomène (Hill *et al.*, 2001).

2. Dangers liés aux transgènes ou aux produits transgéniques

2.1 EXPRESSION TRANSGÉNIQUE

Description

Le transgène ou l'expression de ses produits peuvent présenter un danger pour l'animal porteur.

Association

Ce danger est associé aux animaux transgéniques quelle que soit la méthode de production utilisée.

Mécanisme

L'insertion de constructions transgéniques, notamment de séquences régulatrices (comme un promoteur) et de gènes indicateurs (ex. protéines fluorescentes, gènes de résistance aux antibiotiques), pourrait avoir des effets physiologiques directs ou des effets pléiotropes imprévisibles chez l'animal. Ces effets comprennent, sans s'y limiter, les effets suivants :

Changement des besoins énergétiques ou nutritionnels : Ce phénomène, qui est associé à un transgène, a été mis en évidence chez divers animaux transgéniques. Ces effets sont surtout liés à la croissance, mais les effets pléiotropes de d'autres gènes peuvent aussi changer certains besoins nutritionnels (Steele et Pursel, 1990).

Expression ectopique du transgènes : La présence inopportune de transgènes ou de leurs produits dans des tissus non ciblés peut avoir des effets délétères chez l'animal porteur et chez les humains exposés au produit transgénique. Ce phénomène a été démontré par Wall *et al.* (1996), ceux-ci ayant mis en évidence l'expression d'une protéine acide de lactosérum de souris dans des tissus non mammaires chez le mouton; une hypothèse a été émise relativement à l'effet nuisible que pourrait avoir l'expression du transgène dans des tissus autres que ceux de la glande mammaire chez certains animaux transgéniques.

Production excessive du produit du transgène ou de ses métabolites : Ce phénomène a été observé chez plusieurs espèces. Il pourrait poser un danger tant pour l'animal chez lequel le transgène est exprimé que pour les humains ou les autres animaux exposés au produit. Cette question est examinée par Van Reenen *et al.* (2001).

Effets pléiotropes de l'expression du transgène : L'insertion et l'expression d'un transgène peuvent avoir des effets imprévus sur l'activité de gènes endogènes ou peuvent influencer sur l'expression d'autres gènes dans le génome. Comme bon nombre des caractères de production des animaux d'élevage sont polygéniques, l'effet pléiotrope d'un gène ou d'un transgène pourrait dérégler le fonctionnement d'un polygène (Gavora, 2002a).

Sensibilité aux maladies à prions : Une influence d'origine génétique sur la sensibilité aux encéphalopathies spongiformes transmissibles a été observée chez plusieurs espèces dont les ovins, l'humain et divers rongeurs (Traulis, 2002; Belay, 1999). En théorie, la production d'animaux

transgéniques pourrait présenter un danger à cause de l'incorporation accidentelle de matériel génétique avec le transgène ou de la modification du fonctionnement de gènes liés à la sensibilité aux prions.

Dissémination du produit du transgène hors du tissu cible : Ce phénomène a été démontré avec plusieurs systèmes, notamment avec des souris chez lesquelles une hormone de croissance humaine était exprimée grâce à un promoteur ciblant les vésicules séminales (Dyck *et al.*, 1999). Même si le transgène était présent dans les reins et les vésicules séminales, des quantités importantes ont été trouvées dans le sang.

Prévalence

La prévalence des dangers liés expressément au transgène et à son expression dépend des facteurs suivants :

- la composition du transgène, notamment des promoteurs, des marqueurs et des séquences codant des éléments structuraux,
- l'espèce à laquelle appartient l'animal utilisé,
- l'emplacement du transgène dans le génome (ex. régions à faible ou à forte expression).

Par ailleurs, les dangers liés à l'expression du transgène peuvent varier selon la génération (animal fondateur, animal de la première ou de la deuxième génération) et selon d'autres caractéristiques génétiques (ex. homozygotie ou hétérozygotie) de l'animal transgénique. Ces facteurs peuvent influencer sur le degré d'expression (transcription, traduction, modifications post-traductionnelles, etc.) du transgène ou jouer un rôle dans l'accumulation et la distribution du produit dans divers tissus.

Toute bonne évaluation de la prévalence ou du potentiel pathogène en rapport avec l'expression du transgène doit comprendre une revue documentaire sur les propriétés physiologiques, pharmacologiques et toxicologiques du produit du transgène en question.

La prévalence des dangers liés à l'expression des transgènes pourrait diminuer avec les progrès technologiques. Avec l'application des règles décrites ci-après et les progrès de la technologie, les risques pour la santé animale et la santé humaine et pour l'environnement pourraient diminuer :

- caractérisation exacte de la construction transgénique avant et après la production de l'animal transgénique,
- essai préliminaire de la construction en culture cellulaire ou chez des animaux de laboratoire,
- utilisation de promoteurs à spécificité tissulaire,
- utilisation de promoteurs spécifiques d'organes excréteurs (ex. vésicules séminales, glande mammaire, oeufs d'oiseaux) isolés des voies de distribution plus générale dans l'organisme de l'animal.

Détection

Changement des besoins énergétiques ou nutritionnels

Les exigences nutritionnelles peuvent être évaluées chez les animaux avant et après la mort. Parmi les techniques qui peuvent être utilisées à cette fin, signalons l'examen clinique, l'hématologie, la biochimie, l'autopsie et l'histopathologie.

Expression ectopique du transgènes

Production excessive du produit du transgène ou de ses métabolites

Dissémination du produit du transgène hors du tissu cible

Pour évaluer la transcription des produits transgéniques dans les tissus, on peut mettre en évidence l'accumulation de l'ARNm spécifique du transgène au moyen de techniques portant sur l'acide nucléique. Entre autres, on pourrait employer pour ce faire les méthodes suivantes :

- Hybridation *in situ* en fluorescence (ex : fish),
- RT-PCR,
- Transfert de type Northern,
- Microréseau.

Diverses techniques de détection des protéines peuvent servir à mettre en évidence la présence de produits transgéniques dans des tissus non ciblés, notamment les suivantes :

- épreuve immunoenzymatique : ELISA, immunofluorescence,
- électrophorèse de protéines et transfert de Western,
- chromatographie,
- spectrophotométrie de masse,
- immunohistochimie.

Pour évaluer les manifestations pathologiques causées par l'expression excessive ou ectopique de transgènes, on peut recourir aux techniques vétérinaires classiques, par exemple; examen clinique, anatomique et pathologique. La nature du transgène peut nous donner une idée de certaines des manifestations possibles, d'après les effets connus du produit du transgène, s'il s'agit, par exemple, d'érythropoïétine, d'hormones de croissance, etc.

Sensibilité aux maladies à prions

Pour évaluer l'accroissement de la sensibilité aux maladies à prions, on peut caractériser le transgène et le produit transgénique chez l'animal transgénique puis faire une comparaison avec les acides nucléiques et les séquences des protéines liées à la sensibilité aux maladies à prions.

Effets pléiotropes de l'expression du transgène (modification de voies métaboliques entraînant la formation de toxines)

On peut mettre en évidence la production de toxines résultant de la modification de voies métaboliques par les méthodes de clinique vétérinaire et d'analyse de laboratoire classiques, qu'on peut compléter par des épreuves de toxicité en cultures cellulaires ou chez des animaux de laboratoire.

3. Dangers liés aux mutations et à la mutagenèse

3.1 MUTATION/ MUTAGENÈSE

Description

L'insertion d'un transgène peut dérégler l'activité d'autres gènes, notamment de ceux qui se trouvent au point d'insertion, et, par effet *trans*, de gènes situés à distance du point d'insertion.

Association

Associé du caractère aléatoire de l'emplacement où est inséré le transgène et des techniques de transfert de gène. Même s'il est peut-être surtout associé à la technique de la microinjection, le phénomène de la mutagenèse d'insertion peut aussi s'observer chez les animaux transgéniques produits par d'autres techniques, notamment la transformation au moyen de vecteurs viraux.

Le danger peut exister chez les sujets transgéniques fonctionnels et non fonctionnels. L'insertion du transgène dans le génome de l'hôte, qu'il soit fonctionnel ou non, peut dérégler des gènes endogènes. Il faut donc penser à l'élimination des sujets chez lesquels la transformation n'a pas pris (animaux résultant du procédé de production chez lesquels le transgène n'est pas exprimé).

Les méthodes avec ciblage génique, qui peuvent faire intervenir le transfert de noyaux de cellules modifiées par transfection, permettraient peut-être de réduire le risque de mutagenèse d'insertion (Wolf *et al.*, 2000).

Mécanismes

Selon les estimations, la fréquence des mutations d'insertion chez les souris transgéniques est comprise entre 7 et 20 % (Van Reenen *et al.*, 2001). Dans la documentation, on voit souvent 5 à 10 % (Meisler, 1992; Wilmut, 1995). Les mutations peuvent être dominantes (Weiher *et al.*, 1990; Ting *et al.*, 1994) ou récessives, ces dernières n'étant présentes que chez les descendants homozygotes ou chez les animaux fondateurs hémizyotes (Van Reenen *et al.*, 2001).

Les vecteurs rétroviraux ne sont généralement pas associés à des mutations manifestes ou à des délétions de l'ADN cellulaire (Buglio, 2001), mais le risque de mutation d'insertion existe néanmoins. Récemment, dans un essai de thérapie génique chez l'humain, l'apparition de la leucémie a été attribuée à une mutation d'insertion résultant de l'utilisation d'un vecteur rétroviral à M-MLV (Marshall, 2002).

Les virus adéno-associés ont été reliés à des effets chromosomiques chez la souris (Miller *et al.*, 2002).

Prévalence des manifestations

Les points énumérés ci-après doivent être pris en considération dans l'évaluation des dangers découlant du dérèglement des fonctions de gènes endogènes :

- des mutations d'insertion pouvant aussi survenir chez les animaux transgéniques non fonctionnels, il faut considérer cette éventualité dans l'évaluation du danger,
- chez des lignées de souris transgéniques, on a mesuré une prévalence de mutations d'insertion de $0,5 - 1 \times 10^{-2}$ (Wilmut, 1995),
- les techniques de ciblage génique (ex. recombinaison homologue) pourraient peut-être réduire la probabilité de mutagenèse d'insertion,
- certaines mutations peuvent être létales durant le développement embryonnaire et fœtal et contribuent à abaisser le taux d'efficacité, ou à élever le taux d'attrition, associé à la production d'animaux transgéniques,
- dans la plupart des cas, les mutations d'insertion sont récessives (National Academy of Sciences, 2002), et sont transmises selon le mode des caractères récessifs. Par conséquent, la maladie peut ne pas se manifester chez les animaux fondateurs hémizyotes dont l'allèle mutant est hétérozygote. La maladie peut se manifester lorsque les croisements donnent des animaux à allèle mutant homozygote chez lesquels le phénotype mutant apparaît.

Détection

L'évaluation des manifestations possibles fait intervenir toute une gamme de techniques, et, généralement, il faut un examen avant la mort ou une autopsie comprenant les éléments suivants :

- examen clinique,
- anatomie pathologique et pathologie clinique, notamment histopathologie, immunohistochimie, hématologie, analyse d'urine et du sérum,
- détection d'une réponse immunitaire (humorale, à médiation cellulaire) contre certains agents pathogènes,
- détection des agents pathogènes,

- épreuves d'évaluation de la fonction immunitaire,
- évaluation de l'hémostase.

Par ailleurs, l'avancement de nos connaissances sur le génome des animaux nous permettra peut-être un jour de rechercher les mutations par l'analyse directe de l'ADN des animaux transgéniques, notamment par transfert de type Southern, PCR et utilisation de microréseaux d'ADN. Les données qui pourraient être recueillies sur les sites sensibles aux mutations pourraient être importantes. Par exemple, récemment, dans un essai de thérapie génique chez l'humain, on a émis l'hypothèse que l'apparition de la leucémie chez un jeune malade pouvait être due à l'insertion d'un gène avec un vecteur rétroviral dans un site intervenant dans le déclenchement de cette maladie (Marshall, 2002).

4. Autres dangers

4.1 TRANSFERT DE GÈNES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE CELLULES D'ANIMAUX TRANSGÉNIQUES À L'ENVIRONNEMENT

Description

Les gènes de résistance aux antibiotiques utilisés comme marqueurs de sélection dans la production d'animaux transgéniques pourraient être excrétés par ces animaux et poser un danger en raison du risque de transformation génétique de microorganismes.

Associations

Animaux transgéniques produits par microinjection, transfert par vecteur viral ou transfert nucléaire, qui sont porteurs d'une construction génique comportant des gènes de résistance aux antibiotiques.

Mécanismes

Les cellules renfermant de l'ADN transgénique peuvent être évacuées dans l'environnement par divers mécanismes, notamment dans les excréments, l'urine, les sécrétions des voies respiratoires, la desquamation épidermique, les hémorragies et les liquides de reproduction (sperme, liquide séminal). La persistance de l'ADN transgénique dans l'environnement dépend de la voie d'excrétion et des conditions environnementales (humidité, température, éclairage, etc.). Les transgènes de résistance aux antibiotiques pourraient alors être ingérés par d'autres organismes et potentiellement provoquer la transformation de la microflore intestinale ou potentiellement transformer directement les microorganismes de l'environnement.

La transformation naturelle des bactéries a été mise en évidence dans l'eau (Baur *et al.*, 1996) et dans les liquides corporels (Woegerbauer *et al.*, 2002). Dubnau (1999) traite de l'absorption naturelle d'ADN par les bactéries. La capacité des plantes transgéniques de causer la transformation de la microflore après l'ingestion est examinée plus loin (voir Danger : Passage et persistance d'ADN comprenant des transgènes dans le système digestif).

Prévalence

Le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques d'animaux transgéniques à d'autres organismes n'a pas encore été démontré. Toutefois, les données recueillies dans les études sur la transformation naturelle par transfert horizontal de gènes de bactéries et dans les travaux réalisés sur le transfert de gènes des plantes transgéniques peuvent servir à faire une évaluation de l'exposition.

Des études ont permis de constater le transfert de gènes marqueurs de plantes transgéniques à des bactéries par recombinaison naturelle (Nielsen *et al.*, 1998).

Les barrières qui empêchent le transfert d'ADN nu des organismes transgéniques aux bactéries sont d'ordre spatial et temporel et relatif au transfert et à l'établissement du gène. Parmi les facteurs à prendre en compte figurent les suivants :

- l'excrétion de l'ADN de l'animal transgénique,
- la présence d'ADN dans l'environnement (ce terme est utilisé ici dans son sens le plus large),
- l'absorption d'ADN hétérologue par les bactéries :
 - l'acquisition de la compétence nécessaire pour une transformation naturelle,
 - la dégradation de l'ADN par des enzymes de restriction,
 - la stabilisation de l'ADN hétérologue dans les bactéries,
 - expression de l'ADN hétérologue chez les bactéries,

- la sélection et l'impact environnemental des bactéries transformées.

D'après les sources documentaires, dans le cas des gènes de résistance aux antibiotiques de plantes transgéniques transférés à des bactéries du sol en conditions naturelles, la fréquence de transformation serait extrêmement faible, et l'homologie des séquences semble être la principale barrière qui empêche la transformation.

Par ailleurs, dans le cas du transfert de la résistance à l'ampicilline de pommes de terre transgéniques à l'agent phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*, la fréquence de transformation a été évaluée à 2×10^{-17} , et, dans le cas du transfert du gène *nptII* de betteraves et de pommes de terre transgéniques, à moins de 10^{-16} . Les données expérimentales indiquent que la fréquence de transformation s'accroît beaucoup lorsque l'homologie séquentielle augmente, et qu'il s'exerce une pression de sélection en présence d'antibiotiques (jusqu'à $5,4 \times 10^{-9}$ et $2,5 \times 10^{-8}$) (Nielsen *et al.*, 1998).

Voies d'exposition

- matières chargées de transgènes : excréments, urine, sécrétions respiratoires, larmes, sang,
- ingestion de produits,
- transfert de transgènes à la faveur d'une infection bactérienne chez l'animal transgénique.

Détection

Il y a plusieurs moyens d'évaluer la possibilité d'un transfert de gène horizontal (TGH), particulièrement de transgènes d'animaux transgéniques (Nielson *et al.*, 1998) :

- détection du transfert horizontal de gènes d'animaux transgéniques à des bactéries par comparaison des séquences d'ADN : approche phylogénétique rétrospective à long terme,
- évaluation des bactéries présentes dans des échantillons environnementaux pour rechercher des signes de transfert horizontal de gènes d'animaux transgéniques : approche rétrospective à court terme faisant d'abord intervenir une sélection phénotypique,
- approche expérimentale élaborée d'après les conditions optimales en laboratoire pour le transfert de gènes aux bactéries d'origine environnementales cultivables : approche d'investigation prospective.

Si nécessaire, on peut vérifier s'il y a eu transfert principalement par des techniques portant sur l'acide nucléique comme la PCR et le transfert de type Northern ou de type Southern, ou par analyse au moyen de microréseaux (Aarts *et al.*, 2001; Cockerill III, 1999). La technique génomique peut être complétée par une analyse phénotypique d'isolats environnementaux; le cas échéant, des antibiogrammes pourraient être utiles. La résistance aux antimicrobiens a récemment été examinée par l'OIE (Vose *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001).

4.2 TRANSFERT D'ADN COMPORTANT DES TRANSGÈNES PAR LE SYSTÈME DIGESTIF

Description

Il se pourrait que l'ADN des animaux transgéniques puisse passer dans l'intestin sans être dégradé et poser ainsi le danger de la transformation d'autres organismes, dont les humains, ingérant le produit. On craint plus spécialement que des gènes de résistance aux antibiotiques, souvent utilisés comme marqueurs dans les travaux de transgénique, transforment les microorganismes vivant dans l'intestin, mais il ne s'agit pas là du seul danger possible.

De nombreux travaux ont été réalisés sur la résistance aux antibiotiques chez les plantes et les bactéries transgéniques. On s'est penché sur les mécanismes de la transformation naturelle de l'ADN chez les bactéries (Dubnau, 1999; Solomon et Grossman, 1996). Le transfert de gènes horizontal (TGH) a été

examiné de façon plus générale par Droge *et al.* (1998). Des phénomènes naturels de transfert horizontal surviennent entre divers domaines en évolution. Chez les plantes, on pense que ce genre de transfert survient rarement entre plantes transgéniques et plantes associées à des bactéries (Droge *et al.*, 1998).

Associations

Des problèmes pourraient se poser dans le cas des animaux transgéniques produits par microinjection, transfert avec vecteur viral et transfert nucléaire.

Mécanismes

Il a été démontré chez plusieurs espèces que l'ADN génétiquement modifié peut passer dans le système digestif sans être dégradé (Flint *et al.*, 2001). L'ADN plasmidique d'un gène de résistance à l'érythromycine s'est dégradé à un rythme de deux logs en 60 secondes dans la bouche de volontaires humains (plus rapidement qu'*in vitro*), mais il a quand même pu transformer des cellules bactériennes compétentes (Flint *et al.*, 2001). Il se pourrait que les composants alimentaires influent sur la préservation de l'ADN plasmidique dans la salive; on n'a toutefois rien vu de tel dans des expériences réalisées *in vitro* avec divers produits laitiers (Flint *et al.*, 2001). Les possibilités de transformation des bactéries intestinales devraient s'accroître si l'homologie entre le plasmide et le chromosome bactérien augmente. Il y a lieu de signaler ici que l'ADN génétiquement modifié auquel les animaux peuvent être exposés est essentiellement d'origine chromosomique et non plasmidique. Les transformations de bactéries intestinales devraient s'en trouver moins fréquentes, mais il peut néanmoins en survenir (Flint *et al.*, 2001). D'après des études réalisées *in vitro*, la transformation de bactéries capables de se répliquer est moins importante, mais elle n'est pas négligeable. De l'ADN nu génétiquement modifié donné à des rats est demeuré détectable dans les excréments des sujets jusqu'à 79 heures après l'ingestion (Flint *et al.*, 2001). Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'aptitude de l'ADN libre de maïs transgénique à transformer les bactéries de la salive, du liquide ruminal et des effluents d'ensilage (Duggan *et al.*, 2000; Forbes et Heritage, 2002); du maïs transgénique porteur du gène de la *B*-lactamase, qui est associé à la résistance aux antibiotiques, a été donné à manger à des poulets et à des moutons. On a constaté que le gène était intégré de façon stable au maïs; chez les poulets qui avaient mangé du maïs transgénique, des séquences amplifiables ont été détectées dans le jabot (5 oiseaux / 5) et dans l'estomac (2 oiseaux / 5). Rien n'a été trouvé plus avant dans le système digestif, c'est-à-dire dans l'intestin ou dans les excréments. Les moutons ont reçu du maïs porteur d'un transgène de résistance aux insectes; des séquences amplifiables (914 pb) ont été trouvées dans le rumen jusqu'à 5 heures après l'ingestion du maïs, mais on n'a pu en détecter lorsque le maïs avait été ensilé. Des fragments plus courts (211 pb), mais encore spécifiques, ont été détectés jusqu'à 4 heures après l'ingestion dans le rumen de moutons ayant reçu de l'ensilage, et jusqu'à 24 heures après l'ingestion dans le rumen de moutons ayant reçu du maïs (Forbes et Heritage, 2002).

Des souris gravides ont été exposées par voie orale à de l'ADN étranger (ADN de bactériophage M3), et l'ADN en question a été détecté dans divers organes des fœtus, probablement après y être passé par voie transplacentaire. Dans certains cas, il se trouvait dans les chromatides, ce qui pourrait lui avoir donné des propriétés mutagéniques dangereuses (Schubbert *et al.*, 1998).

Prévalence d'ADN comportant des transgènes dans le système digestif

On peut raisonnablement présumer que si un humain ingère des animaux ou des produits d'origine animale portant des transgènes, de l'ADN comportant des transgènes se retrouvera dans son intestin.

Certains facteurs peuvent influencer sur la quantité d'ADN comportant des transgènes présente chez les animaux transgéniques ou dans les produits issus d'animaux transgéniques :

- le nombre de copies du transgène par cellule chez l'animal transgénique,
- le nombre de cellules chez l'animal ou dans le produit animal.

Les mesures de transformation comme la cuisson ou les procédés industriels de fabrication peuvent faire diminuer la quantité d'ADN intact susceptible d'être ingéré.

La quantité d'ADN parvenant au tube digestif dépendra des facteurs suivants :

- la quantité d'ADN comprenant des transgènes présente dans la matière ingérée (concentration),
- la quantité de matière avec ADN comprenant des transgènes ingérée (masse),
- la quantité d'ADN comprenant des transgènes détruite durant la digestion,
- la quantité d'ADN comprenant des transgènes libérée de la matière ingérée.

L'aptitude de l'ADN comprenant des transgènes à persister dans les cellules humaines dépend des facteurs suivants :

- l'aptitude du matériel présent dans le tractus gastro-intestinal humain à pénétrer dans les cellules humaines (probablement des cellules du tractus gastro-intestinal, des entérocytes et des cellules immunitaires),
- la probabilité de l'intégration de l'ADN comprenant des transgènes dans les cellules humaines.

La documentation relative aux vaccins à ADN pourrait peut-être nous donner une idée de la quantité d'ADN exogène pouvant pénétrer dans les cellules animales. Il n'est pas inutile de noter ici que ce phénomène a été observé sur les muqueuses (Wu *et al.*, 2001; Eriksson *et al.*, 2002). Il faut toutefois rester prudent devant ce genre de documents, car, dans la plupart des travaux réalisés sur les vaccins à ADN, l'ADN en question est souvent lié à certaines protéines, à des complexes ou à divers adjuvants destinés à en augmenter l'absorption et à accentuer la réponse immunitaire (Babiuk *et al.*, 2002).

4.3 TRANSFERT DE TRANSGÈNES À DES ANIMAUX DOMESTIQUES, À DES ANIMAUX SAUVAGES ET AUX ÉCOSYSTÈMES

Description

Pénétration de transgènes dans les populations d'animaux sauvages ou d'animaux domestiques par croisements non intentionnels, avec un danger possible lié à des effets sur les populations et l'écologie.

Association

Les animaux transgéniques quelle que soit la méthode de production. Les animaux chimères, les hybrides interspécifiques et les animaux clonés qui ont des caractères susceptibles de modifier leur valeur adaptative peuvent aussi poser un danger pour les populations naturelles.

Mécanismes

Reproduction sexuée d'animaux transgéniques avec des animaux d'espèces très apparentées, génétiquement compatibles. Il pourrait s'agir d'un phénomène naturel (accouplement) ou d'une erreur survenue durant une opération de reproduction assistée comme l'insémination artificielle, la fécondation *in vitro* ou le transfert d'embryons (Dyer, 2002).

On a décrit deux types de dangers généraux (Muir et Howard, 2002 a, b). Il y a «danger d'extinction» lorsque le transgène peut entraîner la disparition locale d'une espèce. Il y a «danger d'invasion» lorsque le transgène peut perturber une espèce ou l'obliger à se déplacer; dans ce dernier cas, le danger est analogue à celui que pose une espèce envahissante (Lee, 2002).

Le type de danger (invasion ou extinction) posé par l'animal transgénique à l'échelle de la population dépend, dans le cas des animaux sauvages, du degré d'expression du transgène et de ses effets sur la «valeur adaptative» du nouvel animal transgénique. Dans le cas des espèces animales, ces effets

écologiques ont surtout été étudiés chez des populations de poissons transgéniques, les pratiques de gestion des populations de poissons favorisant la dissémination des transgènes dans les populations sauvages (Muir et Howard, 2002 a, b). On a avancé une hypothèse selon laquelle les dangers d'extinction et les dangers d'invasion résultent de l'action pléiotrope de transgènes sur différentes composantes. Parmi les composantes de la valeur adaptative pourraient figurer des caractéristiques telles que le succès de la reproduction, la viabilité des juvéniles, la fécondité, l'âge à la maturité sexuelle, le succès de la prédation et la vulnérabilité comme proie. En général, les prévisions fondées sur une seule caractéristique de valeur adaptative se révèlent peu fiables (Muir et Howard, 2001).

Dans un texte récemment publié aux États-Unis par l'Académie Nationale des Sciences, ce danger environnemental est présenté comme un des risques de première importance associés aux animaux génétiquement modifiés (The United States National Academy of Sciences, 2002).

Prévalence

Les risques environnementaux qui pourraient être associés aux animaux génétiquement modifiés sont considérés comme étant de première importance, et ce, en raison de (The United States National Academy of Sciences, 2002) :

- la difficulté que présente la détection précoce des problèmes environnementaux,
- la difficulté que présente la correction des problèmes environnementaux.

En général, pour qu'un risque découle de ce danger, il faut qu'il y ait dissémination et exposition :

- l'animal issu de la biotechnologie doit sortir de l'installation de confinement,
- l'animal doit pouvoir se reproduire avec un sujet de la population.
- l'animal issu de la biotechnologie et / ou le transgène doit s'établir dans l'environnement.

Il se peut qu'une population d'animaux génétiquement modifiés s'établisse et prenne de l'expansion dans l'environnement ou que des animaux génétiquement modifiés se reproduisent avec des animaux de type sauvage, et que le transgène se propage dans la population.

Les National Academies américaines ont décrit la marche à suivre pour faire une bonne évaluation des risques environnementaux posés par les animaux génétiquement modifiés :

- détermination du préjudice (H) possible,
- détermination des dangers pouvant causer ce préjudice,
- définition de l'exposition, lorsqu'il s'agit d'animaux génétiquement modifiés dans l'environnement, et de la probabilité d'exposition P(E)
- quantification de la probabilité de préjudice, étant donné l'exposition P(H/E)
- multiplication des probabilités pour l'établissement de l'ordre de priorité des risques

Dans un contexte écologique, «préjudice» désigne la perturbation du pool génique, d'une espèce ou d'une communauté qui a des effets négatifs sur la stabilité de la communauté. Ici, le danger qui peut causer le préjudice est la présence de l'animal génétiquement modifié ou du transgène dans la population, son action pouvant s'exercer directement, par un effet de compétition, ou indirectement, par la modification de l'écologie de la communauté.

Dans ce contexte, «exposition» renvoie essentiellement à l'établissement des animaux génétiquement modifiés (ou du transgène) dans la communauté. Trois facteurs influent sur la probabilité d'établissement des animaux génétiquement modifiés :

- valeur adaptative,
- aptitude à s'échapper, à se disperser et à retourner à l'état sauvage,
- qualités de la communauté réceptrice.

Valeur adaptative

La valeur adaptative se mesure par rapport à la population réceptrice et englobe tous les aspects du phénotype qui peuvent influencer sur la dissémination du transgène.

Muir et Howard (2001) ont défini six paramètres de valeur adaptative :

- succès de la reproduction
- fécondité
- succès de prédation
- viabilité des juvéniles
- âge à la maturité sexuelle
- vulnérabilité comme proie

En général, les prévisions qui ne s'appuient que sur une caractéristique de valeur adaptative ne sont pas fiables (Muir et Howard, 2001). Habituellement, la détermination de la valeur adaptative nette est rétrospective. Toutefois, il est possible de faire une détermination prospective d'après les attributs de l'animal issu de la biotechnologie qui peuvent influencer sur les effets environnementaux (*The Scientist's Working Group on Biosafety*, 1998) :

- métabolisme
- comportement
- facteurs de contrôle ou de régulation des populations naturelles
- tolérance aux facteurs physiques
- morphologie / architecture des organismes

Dans une approche prospective, le principal facteur influant sur la valeur adaptative est la fonctionnalité du transgène chez l'organisme transgénique; la fonctionnalité est définie en quatre points :

- adaptabilité accrue,
- amélioration de caractères existants :
 - certains caractères, avantageux ou non nuisibles en milieu artificiel, peuvent être nuisibles en milieu naturel,
 - à cause des effets pléiotropes, si le transgène réduit un paramètre de la valeur adaptative, il se peut qu'un autre paramètre soit accru, si bien que la valeur adaptative nette augmente,
 - une diminution de la valeur adaptative peut avoir des suites sur la démographie des populations réceptrices numériquement faibles, celles-ci pouvant être incapables de se rétablir si des changements survenaient précocement,
 - les animaux transgéniques sont en quelque sorte des méga-mutations : ils peuvent causer des changements aboutissant à un nouveau pic dans le paysage adaptatif, peut-être même occuper une nouvelle niche,
- production de produits nouveaux,
 - donne habituellement lieu à une augmentation des demandes énergétiques pouvant entraîner une baisse de la valeur adaptative,
- production d'animaux ou de produits d'origine animale utilisés pour la santé humaine ou à des fins médicales,
 - peut donner lieu à une augmentation des demandes énergétiques ou avoir des effets pléiotropes sur les attributs relatifs à la valeur adaptative.

Aptitude à s'échapper, à se disséminer ou à retourner à l'état sauvage

Ces phénomènes dépendent essentiellement des caractères de l'animal génétiquement modifié, mais les caractéristiques de la population réceptrice ont aussi une incidence.

La plupart du temps, dans les conditions qu'on retrouve au Canada, il n'y a qu'un risque limité que les animaux domestiques servant à la production de produits alimentaires de consommation humaine et de fibres s'échappent et se reproduisent (voir le tableau 1, Facteurs contribuant à la dangerosité de diverses espèces transformées). Il devrait en aller de même pour les animaux issus de la biotechnologie, et ceux-ci seraient vraisemblablement soumis à des dispositions

réglementaires plus strictes, notamment au point de vue de l'identification et du suivi des déplacements.

L'évaluation de cet événement est fondée sur l'information fournie dans la documentation au sujet de la probabilité que des animaux domestiques non transgéniques s'établissent en milieu naturel.

La probabilité que des animaux issus de la biotechnologie se retrouvent dans l'environnement dépend de plusieurs facteurs. L'Académie Nationale des Sciences des États-Unis décrit ce phénomène comme étant l'aptitude à «s'échapper, à se disséminer et à retourner à l'état sauvage» (The United States National Academy of Sciences, 2002).

Facteurs contribuant à la dangerosité de diverses espèces transformées

Animal	Nombre de citations ¹	Aptitude à retourner à l'état sauvage ²	Probabilité de s'échapper des installations de captivité ³	Mobilité ⁴	Perturbations de communautés ⁵	Dangerosité ⁶
insectes ⁸	1,8042e+29	forte	forte	grande	nombreuses	élevée
poissons ⁷		forte	forte	grande	nombreuses	
souris / rat		forte	forte	grande	nombreuses	
chat		forte	forte	modérée	nombreuses	
porc		forte	modérée	gaible	nombreuses	
chèvre		forte	modérée	modérée	quelques-unes	
cheval		forte	modérée	forte	peu	
lapin		forte	modérée	modérée	peu	
vison		forte	forte	modérée	aucune	
chien		modérée	modérée	modérée	peu	
poulet		faible	modérée	modérée	aucune	
mouton		faible	faible	faible	peu	
bovin		faible	faible	faible	aucune	faible

source: extrait de "the US National Academy of Sciences, 2002, Table 5.1, p. 81"

- 1 Nombre d'articles scientifiques où il est question d'animaux de cette espèce qui sont retournés à l'état sauvage
- 2 D'après le nombre de populations d'animaux retournés à l'état sauvage signalées
- 3 D'après l'aptitude de l'organisme à s'échapper, en volant, en creusant, en nageant ou en sautant, aux divers stades de son développement
- 4 Distance relative de dissémination si l'animal marche, court, vole, nage ou se retrouve dans un camion, un train, un bateau, etc. qui se déplace
- 5 D'après les données recueillies mondialement sur les communautés perturbées et sur l'ampleur des dommages causés
- 6 Échelle établie en fonction des quatre facteurs contribuant à la dangerosité
- 7 Sauf les coquillages, dont certaines espèces se sont révélées très envahissantes
- 8 Seulement la spongieuse et l'abeille africaine

La stabilité et la résilience de la communauté réceptrice influent sur le préjudice résultant de l'introduction de l'animal issu de la biotechnologie (The US National Academy of Sciences, 2002). La stabilité est la propriété qui fait que les variables de la structure et de la fonction écologique retournent à l'équilibre après une perturbation, et la résilience est la propriété qui détermine la rapidité du retour à l'équilibre (Pimms, 1984).

Probabilité de préjudice en fonction de l'exposition (établissement)

Les transgènes qui accroissent la valeur adaptative ou l'adaptabilité pourraient avoir des effets délétères s'ils se répandaient chez des espèces nuisibles (The US National Academy of Sciences, 2002).

Les effets pléiotropes des transgènes peuvent avoir une influence antagoniste sur les diverses composantes et donner lieu à des préjudices imprévus (The US National Academy of Sciences, 2002).

Les produits transgéniques qui sont introduits dans l'environnement (ex. le lait) peuvent aussi être dangereux pour l'environnement. Le risque associé à ce genre de produits peut être évalué de la même façon que pour les produits ordinaires.

Les préjudices environnementaux dépendent de la stabilité (l'aptitude d'une population à retourner à l'équilibre après une perturbation) et de la résilience (la rapidité du retour à l'équilibre). Ces propriétés ne sont pas faciles à quantifier (National Academy of Sciences, 2002, p. 86).

Ordre de priorité des risques

Il faut évaluer trois variables pour déterminer le risque environnemental que peut poser un animal issu de la biotechnologie :

- l'effet du transgène sur la valeur adaptative de l'animal dans l'environnement où il pourrait se retrouver s'il s'échappait ou si on l'y introduisait,
- les espèces transformées,
- la stabilité et la résilience de la communauté réceptrice.

Détection

Les méthodes qu'on peut employer pour déceler des transgènes chez les animaux domestiques ou sauvages présumés non transgéniques peuvent faire intervenir des épreuves de détection d'acide nucléique et de protéines. Les analyses peuvent porter sur des tissus prélevés chez des animaux vivants (biopsie) ou morts (autopsie).

5. Production *in vitro* d'animaux hybrides interspécifiques

Description

Les hybrides interspécifiques (HIS) possèdent les éléments génomiques de deux espèces distinctes, leur ADN, leurs chromosomes et le contenu de leur cytoplasme provenant des deux espèces. Les dangers qui leur sont associés sont caractéristiques de la nature disparate, hybride des composantes génétiques. En outre, les hybrides interspécifiques sont susceptibles de présenter les dangers associés aux méthodes utilisées pour les produire.

Association

Hybrides interspécifiques créés *in vitro* par transfert nucléaire ou par des techniques de reproduction intrusives comme l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (IICS).

Mécanisme

Normalement, des ensembles haploïdes de chromosomes provenant d'un mâle et d'une femelle appartenant à la même espèce donnent un embryon diploïde, qui se développe en un individu diploïde. Les hybrides interspécifiques sont toutefois particuliers, car l'individu est produit par la combinaison de matériel génétique provenant de deux espèces différentes, qui peuvent ne pas avoir le même nombre chromosomique, un contenu cytoplasmique hétérologue et un mélange de gènes de différentes origines (Oppenheim *et al.*, 2001). Chez des espèces très apparentées comme le mouton et la chèvre, le bœuf et le bison, le buffle et le boeuf, entre lesquelles il n'y a ni accouplement naturel, ni hybridation, les techniques *in vitro* comme la fécondation *in vitro*, l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes et le transfert nucléaire permettent d'obtenir des embryons hybrides (Kochhar *et al.*, 2002). C'est sur cette solide assise technique que s'appuie la recherche qui est réalisée sur les cellules souches en vue de produire des cellules et des lignées cellulaires ou même des tissus pour des transplantations entre espèces à caractère réciproque (Dominko *et al.*, 1999). Les techniques de transfert nucléaire ont permis de démontrer que le cytoplasme des cellules bovines est un milieu adéquat pour les noyaux de diverses autres espèces (Dominko *et al.*, 1999; Saikhun 2002).

Annexe 6

EFFETS DÉLÉTÈRES ASSOCIÉS AUX DANGERS QUE POSENT LES ANIMAUX ISSUS DE LA BIOTECHNOLOGIE

Un danger est un élément ou un événement qui peut causer un préjudice, un événement défavorable ou une issue néfaste (GARZ, 2004). Toutefois, dans un domaine aussi nouveau que la transgénique animale, les agents qui pourraient correspondre à cette définition ne sont pas encore tous répertoriés ni caractérisés. Dans le présent rapport, nous avons tenté de dresser la liste des conséquences possibles à différents points de vue. Étant donné que notre propos est très vaste, qu'une riche documentation s'y rapporte et que les choses évoluent très vite dans ce domaine, l'information présentée dans le tableau qui suit ne peut être exhaustive.

Acronymes utilisés dans la présente annexe :

AC	-	Animal cloné
DAC	-	Descendants de clones
DTG	-	Descendant transgénique prouvé
G ₀	-	Animal fondateur à transgène hémizygote
HIS	-	Hybride interspécifique
IICS	-	Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
MOS	-	Mosaïques (animaux mosaïques) — Animaux porteurs du transgène, mais celui-ci n'est pas présent dans toutes leurs cellules
TN	-	Transfert nucléaire (clone non modifié)
TNE	-	Animaux transgéniques à transgène non exprimé : le transgène est introduit dans l'ADN de l'hôte, mais il n'est pas exprimé
TNP	-	Animaux chez lesquels le transgène n'a pas pris : le transgène ne s'est pas incorporé à l'ADN de l'hôte
TG	-	Transgénique (transgène)
TG-MI	-	Animal transgénique produit par la technique de microinjection
TG-TN	-	Animal transgénique produit par la technique du transfert nucléaire
TG-RV	-	Animal transgénique produit par la technique de transformation à vecteur rétroviral

Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie								
Effets délétères	Technique associée				Mécanismes	Génération ou type d'animal biotechnol. ¹	Mode de dissémination	Mode d'exposition
	T N	T G - M I	T G - R V	T G - T N				
1. Dangers liés à la technique ou au procédé								
1.1 Transfert d'agents infectieux adventices								
« Maladies infectieuses » -Virus, bactéries, champignons, prions -Vecteurs viraux (ex. rétrovirus) franchissant la barrière des espèces	X	X	X	X	- milieux de culture cellulaire, autres réactifs, cellules ou matériel génétique contaminés par des bactéries ou des champignons - infection d'une nouvelle espèce (receveur) par des virus utilisés comme vecteurs (surtout des rétrovirus) - introduction accidentelle de matériel génétique conférant la sensibilité aux maladies à prions	AC, DA (+/-) G ₀ , DTG (+/-) TN, TNE, MOS	- sécrétions - excréments - transmission par les arthropodes - vertical	- contact direct ou indirect - morsures d'arthropodes - vertical (gamètes ou transmission <i>in utero</i>)
1.2 Activation rétrovirale endogène								
Activation de rétrovirus endogènes associés à une infection et / ou à un processus néoplasique			X		- le vecteur rétroviral est recombiné avec des séquences RV endogènes / oncogènes et déclenche un processus néoplasique	G ₀ , DTG, TNE	- sécrétions - excréments - vertical	- contact direct ou indirect - morsures d'arthropodes - vertical
1.3 Hétéroplasmie des mitochondries								
Troubles du métabolisme associés à l'hétéroplasmie des mitochondries	X			X	- métabolisme énergétique modifié - expression de caractères de l'ADNmt du receveur	AC, DAC (+/-), G ₀ , DTG (+/-)	- certaines données indiquent que les changements épigénétiques pourraient être héréditaires	NA (ne s'applique pas) ¹

¹ Type d'animal avec présence du danger

+/- Résultats non concluant/ rapports contradictoire dans la littérature

Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie								
Effets délétères	Technique associée				Mécanismes	Génération ou type d'animal biotechnol. ¹	Mode de dissémination	Mode d'exposition
	T N	T G - M I	T G - R V	T G - T N				
1.4 Manipulation d'embryons / Utilisation de cultures cellulaires								
Syndrome du gros veau et maladie du métabolisme associés à la manipulation des embryons ou à la culture de cellules	X	X	X	X	- utilisation de sérum dans les cultures et tension d'O ₂ - environnement utérin et embryonnaire asynchrone - résultat indirect de la manipulation des embryons, du milieu et des techniques de culture cellulaire	AC, DAC (+/-), G ₀ , DTG (+/-)	- certaines données indiquent que les changements épigénétiques pourraient être héréditaires	NA
Pertes en cours de gestation associées à des manipulations d'embryons, à la culture de cellules	X	X	X	X	- hypoxie fœtale due à une dystocie, à un poumon hypoplasique ou immature - manipulation d'embryons, milieu (ex. concentration de sérum) et techniques de culture liés aux anomalies -manipulation <i>in vitro</i> , anomalies placentaires létales associées à de l'œdème placentaire, des malformations, de l'hydramnios, la baisse du nombre de placentomes	AC, DAC (+/-), G ₀ , DTG (+/-)	- certaines données indiquent que les changements épigénétiques pourraient être héréditaires	NA
Mortalité néonatale associée aux manipulations d'embryons, à la culture cellulaire	X	X	X	X	- manipulation <i>in vitro</i> avec mortalité secondaire à l'hypoxie fœtale (dystocie), absence de transfert passif, hypoxie néonatale (hypoplasie pulmonaire)	AC, DAC (+/-), G ₀ , DTG (+/-)	- certaines données indiquent que les changements épigénétiques pourraient être héréditaires	NA

1.4 Manipulation d'embryons / Utilisation de cultures cellulaires (suite)

Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie								
Effets délétères	Technique associée				Mécanismes	Génération ou type d'animal biotechnol. ¹	Mode de dissémination	Mode d'exposition
	T N	T G - M I	T G - R V	T G - T N				
Morbidité / mortalité des jeunes animaux liées à des anomalies du développement ou des anomalies congénitales associées à la manipulation des embryons, à la culture cellulaire	X	X	X	X	- syndrome du gros veau associé à une taille excessive, à une gestation prolongée	AC, DAC (+/-), G ₀ , DTG (+/-)	- certaines données indiquent que les changements épigénétiques pourraient être héréditaires	NA
2. Dangers liés aux transgènes ou aux produits transgéniques								
2.1 Expression transgénique								
Changements touchant la physiologie de la reproduction : mâles sans libido, femelles sans œstrus (hormone de croissance); associés à l'expression du transgène		X	X	X	- Incapacités neuro-physiologiques, endocriniennes	G ₀ , DTG, MOS	-génique - héréditaire	- héréditaire
Expression de transgènes associée à des troubles de la croissance chez les animaux transgéniques		X	X	X	- insertion d'un nombre excessif de copies du TG - effet de position en rapport avec l'action des promoteurs / inhibiteurs endogènes	G ₀ , DTG, MOS	- produit du TG dans les produits d'origine animale	- ingestion de produits d'origine animale

2.1 Expression transgénique (suite)

Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie								
Effets délétères	Technique associée				Mécanismes	Génération ou type d'animal biotechnol. ¹	Mode de dissémination	Mode d'exposition
	T N	T G - M I	T G - R V	T G - T N				
Changement des voies métaboliques avec accumulation de toxines dans les tissus associés à l'expression du transgène		X	X	X	<ul style="list-style-type: none"> - effet direct du produit transgénique, c'est-à-dire d'une enzyme, entraînant un changement d'excrétion, la dégradation ou la rétention d'une substance normalement non toxique ou conférant la sensibilité à une substance normalement non toxique - nouvelles voies métaboliques résultant de l'expression d'un transgène (habituellement une protéine) 	G ₀ , DTG, MOS	- dans les produits	NA
Expression / production excessive du produit du transgène ou de ses métabolites		X	X	X	<ul style="list-style-type: none"> - insertion d'un nombre excessif de copies du transgène - effet de position en rapport avec l'action des promoteurs / inhibiteurs endogènes 	G ₀ , DTG, MOS	- produit TG dans les produits d'origine animale	- ingestion de produits d'origine animale
Effets pléiotropes de l'expression du transgène		X	X	X	<ul style="list-style-type: none"> - l'insertion du transgène influe sur l'activité de gènes non ciblés chez l'hôte - l'expression accrue des gènes endogènes peut entraîner une augmentation de la concentration de produits et des effets allergènes, toxiques ou autrement nuisibles pour la santé des animaux transgéniques 	G ₀ , DTG, MOS	- produit TG dans les produits d'origine animale	- ingestion de produits d'origine animale, contamination environnementale

2.1 Expression transgénique (suite)

Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie								
Effets délétères	Technique associée				Mécanismes	Génération ou type d'animal biotechnol. ¹	Mode de dissémination	Mode d'exposition
	T N	T G - M I	T G - R V	T G - T N				
Présence inopportune de produits transgéniques - Expression ectopique de transgènes		X	X	X	- insertion d'un nombre excessif de copies du TG - effet de position en rapport avec les voies d'action des promoteurs / inhibiteurs endogènes	G ₀ , DTG, MOS	- produit TG dans les produits d'origine animale	- ingestion de produits d'origine animale, contact avec des sécrétions (lacrymales, reproduction) et des excréments, de l'urine, contamination environnementale
3. Dangers liés aux mutations et à la mutagenèse								
3.1 Mutagenèse d'insertion / mutation								
Perturbation du fonctionnement de gènes endogènes par mutagenèse d'insertion / mutation donnant lieu à un effet immunosuppresseur et à des maladies infectieuses		X	X	X	- changement de la résistance aux maladies dû à un effet de position / mutagenèse d'insertion touchant un gène à fonction immunitaire - effet inhibiteur que certains rétrovirus ont spécifiquement sur le système immunitaire - perturbation ou stimulation de protooncogènes, de gènes suppresseurs de tumeurs ou de gènes liés au rejet des tumeurs	G ₀ , DTG, MOS, TNE	Mutation : - héréditaire Agent infectieux : - sécrétions - excréments	- contact direct ou indirect avec un animal ou un produit animal - ingestion de produits

3.1 Mutagenèse d'insertion / mutation (suite)

Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie								
Effets délétères	Technique associée				Mécanismes	Génération ou type d'animal biotechnol. ¹	Mode de dissémination	Mode d'exposition
	T N	T G - M I	T G - R V	T G - T N				
Changement de voies métaboliques entraînant la formation de produits toxiques associés à une mutagenèse d'insertion / mutation		X	X	X	- dommages touchant un gène endogène (ex. celui d'une enzyme) entraînant un changement d'excrétion, la dégradation ou la rétention d'une substance normalement non toxique ou conférant la sensibilité à une substance normalement non toxique	G ₀ , DTG, MOS, TNE	- sécrétions - excréctions - dans le produit - héréditaire (gamètes)	- contact direct ou indirect - héréditaire
Anomalies du développement ou anomalies congénitales : effets létaux associés à la mutagenèse d'insertion / mutation		X	X	X	- effet de position / mutation d'insertion touchant un gène intervenant dans le développement fœtal et placentaire et le fonctionnement des organes	G ₀ , DTG, MOS, TNE	- héréditaire (gamètes)	- héréditaire
4. Autres dangers								
4.1 Transfert de gènes de résistance aux antibiotiques de cellules d'animaux transgéniques à l'environnement								
Transfert de gènes de résistance aux antibiotiques à l'environnement		X	X	X	- excrétion du transgène - ADN libre se liant aux minéraux du sol et aux polysaccharides des plantes, nucléotide résistant	G ₀ , DTG, MOS, TNE	- sécrétions - excréctions	- transformation de l'environnement et des bactéries
4.2 Passage d'ADN comprenant des transgènes dans le système digestif								

Effets délétères associés aux dangers que posent les animaux et produits d'origine animale issus de la biotechnologie								
Effets délétères	Technique associée				Mécanismes	Génération ou type d'animal biotechnol. ¹	Mode de dissémination	Mode d'exposition
	T N	T G - M I	T G - R V	T G - T N				
Passage et persistance d'ADN comprenant des transgènes dans le système digestif		X	X	X	- L'ADN libre se lie à des produits	G ₀ , DTG, MOS, TNE	- Produit du transgène dans les produits d'origine animale	- ingestion de produits d'origine animale
4.3 Transfert de transgènes à des animaux domestiques, à des animaux sauvages et aux écosystèmes								
Dissémination du transgène chez les animaux domestiques et sauvages		X	X	X	- animaux transgéniques échappés des zones de confinement et se reproduisant avec des animaux d'espèces génétiquement compatibles	G ₀ , DTG, MOS, TNE	- dans les gènes - héréditaire	- reproduction
5. Production <i>in vitro</i> d'animaux hybrides interspécifiques								
Caractéristiques génétiques des hybrides associées à la taille et à la forme disproportionnées des descendants	Techniques de production des HIS : FIV, IICS, TN				- incompatibilités chromosomiques et physiques liées à la taille et au comportement des parents	G ₀ (HIS) descendants	-dans les gènes - héréditaire	- reproduction

Annexe 7

LE BIEN-ÊTRE ANIMAL AU CANADA ET LES CODES DE BONNES PRATIQUES – MISE EN CONTEXTE

LOIS, CODES ET PRATIQUES EN APPLICATION AU CANADA

Le bien-être des animaux d'élevage est une question très vaste qui touche entre autres les pratiques de l'élevage intensif, du transport, de l'abattage sans cruauté et de la biotechnologie.

<http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/heasan/transport/infrastructuref.shtml>

1. Lois

Code criminel (fédéral) : en vertu des dispositions contre la cruauté envers les animaux, qui visent les actes criminels moralement répréhensibles contre les animaux, il est interdit de négliger les animaux, de les blesser ou de les tuer intentionnellement et malicieusement. Le projet de loi C-15B, actuellement devant le sénat, vise à moderniser les dispositions relatives à la cruauté envers les animaux et à renforcer les peines; il ne rendrait pas illégales les pratiques d'élevage actuellement autorisées par le Code criminel.

Loi sur la santé des animaux (fédérale) : dans cette loi sont énoncées des dispositions pour que les animaux soient transportés sans cruauté, et ce, par tous les moyens de transport utilisés au Canada, avec des précisions, entre autres, sur les conditions de chargement et de déchargement, l'alimentation et l'abreuvement, la durée du transport, les périodes de repos, la litière et les soins vétérinaires à donner aux animaux malades ou blessés durant le transport.

Loi sur l'inspection des viandes (fédérale et provinciale) : dans la loi fédérale sont définies les normes relatives à la manutention et à l'abattage sans cruauté des animaux de boucherie dans les établissements dont les produits peuvent être exportés ou vendus dans une autre province ou à l'étranger. Les autorités provinciales et territoriales ont adopté des lois comparables pour une partie ou pour la totalité des établissements dont les produits sont vendus dans les limites de leur territoire.

Autres lois provinciales ou territoriales

Les provinces et les territoires ont tous des lois concernant le bien-être des animaux. Les lois et la réglementation provinciales ou territoriales sont habituellement générales et visent des aspects divers du bien-être animal. Dans certaines provinces, des règlements ont été adoptés à propos de certains aspects ou de certaines espèces en particulier.

2. Codes

Codes de pratique pour le soin et la manipulation des animaux de ferme

Les Codes de pratiques regroupent une série de lignes directrices nationales d'application volontaire concernant certaines espèces d'animaux; ils visent à encourager des pratiques axées sur le bien-être animal dans la conduite des élevages et dans la manutention des animaux. Nés d'une initiative d'Agriculture et Agroalimentaire Canada et de la Fédération des sociétés canadiennes d'assistance aux animaux, ils ont été élaborés et mis à jour avec la contribution de comités de producteurs, de vétérinaires, de transporteurs, de chercheurs, de transformateurs et de représentants des autorités de réglementation et des organismes s'occupant de soin des animaux et de bien-être animal.

En 1995, le Conseil de recherches agroalimentaires du Canada s'est chargé de la gestion des codes. Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC), l'Agence canadienne d'inspection des aliments, l'industrie et d'autres intervenants ont apporté leur appui sous forme de fonds ou de ressources.

3. Organisations non gouvernementales de protection des animaux

Un certain nombre d'organisations non gouvernementales s'occupent de bien-être animal et sont responsables de divers aspects relatifs au bien-être des animaux. Le rôle des principales organisations est décrit à : <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/heasan/transport/infrastructuref.shtml>

- Conseil de recherches agroalimentaires du Canada
- Fédération des sociétés canadiennes d'assistance aux animaux
- Association canadienne des médecins vétérinaires
- Conseil canadien de protection des animaux
- Soins des animaux de ferme
- Comité permanent de la manipulation sans cruauté des animaux
- Groupe de travail de l'Ontario sur le transport sans cruauté
- Canadian Farm Animal Care Trust
- Fondation du bien-être animal du Canada
- Établissements de recherche et d'enseignement
- Société pour la prévention contre la cruauté envers les animaux (SPCA)

Le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) a été fondé en 1982. En tenant compte de l'intérêt des canadiens, il veille, par des programmes d'éducation, des évaluations et la persuasion, à ce que les animaux qui doivent être utilisés pour la recherche, l'enseignement et les essais soient traités de façon optimale aux points de vue physique et psychologique, conformément aux normes scientifiques acceptables, et à faire connaître et comprendre les règles d'éthique applicables.

4. Nouvelles exigences et défis

Le consommateur accorde maintenant plus d'importance non seulement à la sécurité des aliments, mais aussi à divers facteurs de qualité, dont le bien-être des animaux d'élevage. Il ne suffit plus de dire qu'on fait le nécessaire ou que tout est conforme aux attentes. De plus en plus, on exige des preuves, soit sur l'étiquette du produit, soit chez le grossiste. Parmi les grandes questions de l'heure figurent en bonne place la manipulation génétique des animaux et les points de vue très divers (bien-être des animaux, droits des animaux) qui s'expriment dans la société à propos du soin des animaux.

La Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), en Grande-Bretagne, et l'American Humane Association, aux États-Unis, ont déjà mis sur pied des programmes qui permettent de certifier les aliments produits conformément à des lignes directrices plus rigoureuses visant à ce que les animaux soient traités le moins cruellement possible. Ces programmes sont destinés à protéger les animaux d'élevage à cinq points de vue : les animaux ne doivent éprouver ni peur ni détresse, n'avoir ni faim ni soif, n'être pas inconfortables, n'avoir ni douleur, ni blessures, ni maladies et pouvoir se comporter normalement.

Récemment, en raison de l'insistance de l'opinion publique, des démarches des groupes de pression et des exigences des grandes chaînes de restauration et d'épicerie, l'industrie de l'élevage a entrepris une démarche décisive, en collaboration avec les gouvernements et les milieux de la recherche, vers l'application de normes de bien-être animal auditables au Canada. Il s'agit là d'un grand pas, car, actuellement, l'application des Codes de pratiques est entièrement volontaire. La "Canadian Federation of Humane Societies (CFHS)" jouera vraisemblablement un rôle déterminant dans la création des nouvelles politiques (<http://www.cfhs.ca/Programs/programs/faranimals.htm>).

5. Autres

En plus de se conformer à la loi et de s'appuyer sur les Codes de pratiques, les éleveurs canadiens contribuent au progrès du bien-être animal par d'incessants efforts d'apprentissage et d'adaptation et par des programmes d'assurance de la qualité à la ferme comprenant des composantes relatives au bien-être animal.

Annexe 8

ÉVALUATION DU BIEN-ÊTRE DES ANIMAUX AUX TROIS STADES D'UN PROGRAMME DE PRODUCTION D'ANIMAUX TRANSGÉNIQUES

Stade	Objectifs	Animaux transgéniques	Base de l'évaluation du bien-être
Première génération de fondateurs transgéniques	Essai de nouvelles méthodes expérimentales et évaluation de la faisabilité	Petit nombre d'animaux fondateurs (uniques)	Données descriptives et information non formelle
Accroissement du nombre d'animaux	Étude de l'expression du transgène et des propriétés phénotypiques	Groupes de clones ou de descendants transgéniques	Recherche quantitative et comparaisons exactes
Établissement de troupeaux de production	Utilisation des animaux ou des produits (géniques)	Nombreux animaux	Surveillance épidémiologique et méta-analyses

source: extrait de Van Reenen *et al.* (2001).

RÉFÉRENCES UTILISÉES POUR LA PRÉPARATION DES ANNEXES

- Aarts, H.J.M. *et al.*, (2001). «Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria». *Vet Res* 32: 363-380.
- Adlakha-Hutcheon, G., (2001). «Transgenic Animal Safety Assessments: Transgenic Avian Species / Internal Report», Animal Biotechnology Unit», Animal Health and Production Division, CFIA.
- Agriculture and Environment Biotechnology Commission (2002). «Animals and Biotechnology: A Report by the AEBC».
- Agence canadienne d'inspection des animaux, (2001a). «Les dangers de la santé associés aux animaux clonés». (ÉBAUCHE 2001), Section des produits biologiques vétérinaires (Division de la santé des animaux et de la production), ACIA.
- Agence canadienne d'inspection de aliments (ACIA), (2001b). «La communication des risques et le gouvernement : théorie et application à l'Agence canadienne d'inspection des aliments». Direction générale des affaires publiques et réglementaires, (<http://merlin/francais/pubaff/riscomm/riscommf.asp>)
- Analyse des risques zoosanitaires (GARZ), (2004). «Cadre de l'analyse des risques de la santé des animaux et de l'élevage», ACIA, Division des sciences, 2004. (<http://www.inspection.gc.ca/francais/sci/ahra/rianfrwk/rianfrwkf.shtml>)
- Analyse des risques zoosanitaires (GARZ), (2001). «A scientific review on transgenic animal safety assessments: Identification and characterization of potential biological hazards associated with transgenic livestock generated by microinjection, recombinant retroviruses and nuclear transfer» (H-68). ACIA, Division des sciences, 2001.
- Archer, J.S. *et al.*, (1994). «Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors». *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 6840-6844.
- Babiuk, S. *et al.*, (2002). «Electroporation improves the efficacy of DNA vaccines in large animals». *Vaccine* 20: 3399-3408
- Baguishi, A. *et al.*, (1999). «Production of goats by somatic cell nuclear transfer». *Nat Biotech* 17: 456-61.
- Baran, V. *et al.*, (2002). «Nucleolar changes in bovine nucleotransferred embryos». *Biol Reprod* 66: 534-543.
- Basrur, P.K., (1986). «Bovine hybrids». In *Current Therapy in Theriogenology* ed. Morrow D. Saunders. pp 433-437.
- Baur, B. *et al.*, (1996). «Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence». *Appl Env Micro* 62: 3673-3678.
- Behboodi, E. *et al.*, (2001). «Transgenic production from *in vivo*-derived embryos: effect on calf birth weight and sex ratio. *Mol Reprod Dev* 60: 27-37
- Belay, E.D., (1999). «Transmissible spongiform encephalopathies in humans». *Annu Rev Microbiol* 53: 283-314.

- Betthausen, J. *et al.*, (2000). «Production of cloned pigs from *in vitro* systems». *Nature Biotechnology* 18: 1055-1059.
- Bielanski, A. *et al.*, (2002). «Effect of *Neospora caninum* on *in vitro* development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida». *Vet Rec* 150: 316-318.
- Bielanski, A. *et al.*, (2001a). «Experimental collection and transfer of embryos from bovine immunodeficiency virus (BIV) infected cattle». *Theriogenol* 55: 641-648.
- Bielanski, A. *et al.*, (2001b). «Bovine immunodeficiency virus in relation to embryos fertilized *in vitro*». *Vet Res Comm* 25: 663-673.
- Bielanski, A., (1997). «A review on transmission studies in relationship to production of embryos by *in vitro* fertilization and related new reproductive technologies». *Biotechnology Advances* 5(3/4): 633-656.
- Boerjan, M.L. *et al.*, (2000). «Embryonic origins of health: long term effects of IVF in humans and livestock». *Theriogenol* 53: 537-547.
- Brophy, B. *et al.*, (2003). «Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein». *Nat Biotechnol.* Feb;21(2):157-62.
- Bughio, N.I., (2001). «A scientific review on transgenic animal safety assessments: Identification and characterization of potential biological hazards associated with transgenic livestock generated by microinjection, recombinant retroviruses and nuclear transfer», AHRA, (H-68), Canadian Food Inspection Agency, 191 p.
- Cabot, R.A. *et al.*, (2001). «Transgenic pigs produced using *in vitro* matured oocytes infected with a retroviral vector». *Animal Biotechnol* 12: 205-14.
- Canadian Food Inspection Agency, (2002). Draft: «Farm animal welfare infrastructure». CFIA Performance Measurement and Program Support, Animal Health and Production Division.
- Chan, A.W.S. *et al.*, (2001). «Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer in mature oocytes». *Science* 291: 309-312.
- Chan, A.W.S. *et al.*, (1998). «Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14028-14033.
- Chang, K. *et al.*, (2002). «Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer». *MC Biotechnology* 2002 2:5: Website: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/5>.
- Chavatte-Palmer, P. *et al.*, (2002). «Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells». *Biol Reprod* 66:1596-1603,
- Cibelli, *et al.*, (2002). «The health profile of cloned animals». *Nature Biotechnology* 20(1)13-14.
- Clark, A.J. *et al.*, (2000). «Gene targeting in livestock: a preview». *Transgenic Research*: 263-275.
- Cockerill III, F.R., (1999). «Genetic methods for assessing antimicrobial resistance». *Antimicrobial Resistance Chemotherapy* 43:199-212.
- Comité consultatif canadien de la biotechnologie, (2002). «Améliorer la réglementation des aliments génétiquement modifiés et des autres aliments nouveaux au Canada». Rapport présenté au Comité de

coordination ministérielle de la biotechnologie du gouvernement du Canada,
(<http://cbac-cccb.ca/epic/internet/incbac-cccb.nsf/fr/ah00186f.html>).

Cummins, J.M., (2001). «Mitochondria: potential roles in embryogenesis and nucleocytoplasmic transfer». Human Reproduction Update 7 (2):217-228.

Denner, J., (1998). «Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation». Ann NY Acad Sci 862: 75-76.

Dominko, T. *et al.*, (1999). «Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species». Biol Reprod. 60(6): 1496-1502.

Dove, A., (2000). «Milking the genome for profit». Nat Biotech 18: 1045-1048.

Droge, M., Puhler, A. et Selbitschka, W., (1998). «Horizontal gene transfer as a biosafety issue. A natural phenomenon of public concern». Journal of Biotechnology, 64: 75-90.

Dubnau, D., (1999). «DNA uptake in bacteria». Annual Review of Microbiology, 53: 317-344.

Duggan, P. *et al.*, (2000). «Survival of free DNA encoding antibiotic resistance genes from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent». FEMS Microbiol Lett 191:71-77.

Dyck, M.K. *et al.*, (1999). «Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid». Nat Biotech 17(11) 1087-1090.

Dyer, O., (2002). «Black twins are born to white parents after infertility treatment». Brit Med J, 325: 64.

Eriksson, K. et Holmgren, J., (2002). «Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants». Curr Opin Immunol 14: 666-672.

Flint, H. *et al.*, (2001). «Survival of ingested DNA in the gut and the potential for genetic transformation of resident bacteria». UK Food Standards Agency Report GO1007.
Website: http://www.food.gov.uk/science/sciencetopics/gmfoods/gm_reports

Forbes, J.M. et Heritage, J.,(2002). «Assessment of risks of transferring antibiotic resistance determinants from transgenic plants to micro-organisms». UK Food Standards Agency Report GO1010.
Website: http://www.food.gov.uk/science/sciencetopics/gmfoods/gm_reports

Gavora, J., (2002a). Communication personnelle, Note de service à l'ACIA, Section des produits biologiques vétérinaires.

Gavora, J., (2002b). «Mitochondria in animal clones», Section des produits biologiques vétérinaires, ACIA.

Gray, A.P., (1972). «Mammalian hybrids»: In Technical Communication no. 10: Commonwealth Agricultural Bureau. Farham Royal, Slough, England. pp.125-128.

Harvey, A.J. *et al.*, (2002). «Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high-throughput screening procedures». Poultry Sci 81: 202-212.

Heinkelein, M., *et al.*, (2002). «Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs». J Virol 76: 3774-3783.

Heyman, Y. *et al.*, (2002). «Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos». Biol Reprod 66: 6-13.

Hiendleder, S. *et al.*, (1999). «Transmitochondrial Differences and Varying Levels of Heteroplasmy in Nuclear Transfer Cloned Cattle, Molecular Reproduction and Development, Mol Reprod Dev 54, p. 24-31.

Hill, J.R. *et al.*, (2001). «Placental abnormalities in a viable cloned calf». Cloning 3: 83-88.

Humphreys, D. *et al.*, (2002). «Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei». PNAS 99:12889-12894.

Kato, Y. *et al.*, (1998). «Eight calves cloned from somatic cells of a single adult». Science 282: 2095-98.

Kelk, D.A. *et al.*, (1997). «The interbreeding of sheep and goat». Can Vet J. 38: 235-237.

Kochhar, H.P.S. *et al.*, (2002). «*In vitro* production of cattle–water buffalo (*Bos taurus*–*Bubalus bubalis*) hybrid embryos». Zygote 10: 155-162.

Kruip, T.A.M. et den Daas, J.H.G., (1997). «*In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition, and offspring». Theriogenol 47:53-52.

Kuroiwa, Y. *et al.*, (2002). «Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin». Nat Biotech (advanced online publication, doi 10.1038 / nbt727).

Lai, L. *et al.*, (2002). «Production of alpha-1,3 galactosyl transferase knockout pigs by nuclear transfer cloning». Science 95: 1089-1092.

Latham, K.E., (1999). «Epigenetic modification and imprinting of the mammalian genome during development». Current Topics Development Biology 43: 1-49.

Lee, C.E., (2002). «Evolutionary genetics of invasive species». Trends Ecol Evol, 17: 386-391.

Li, Z. *et al.*, (2002). «Murine leukemia induced by retroviral gene marking». Science 296: 497.

Mang, R., (2001). «Endogenous retroviruses and xenotransplantation». Vet Sciences Tomorrow (4). Website: http://www.vetscite.org/cgi_bin/pw.exe/Issue4/000052/000052.htm

Marshall, E., (2002). «What to do when clear success comes with an unclear risk?» Science 298: 510-511.

McEvoy, T.G. *et al.*, (2001). «Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals». Reproduction 122:507-58.

McTaggart, S. et Al-Rubeai, M., (2002). «Retroviral vectors for human gene delivery». Biotechnology Advances, 20: 1-31.

Meisler, M.H., (1992). «Insertional mutation of 'classical' and novel genes in transgenic mice». Trends In Genetics 8: 341-344.

Meirelles, F.V. et Smith, L.C., (1998). «Mitochondrial genotype segregation during preimplantation development in mouse heteroplasmic embryos». Genetics 148:877-883.

Meirelles, F.V. *et al.*, (2001). «Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte». Genetics 158: 351-356.

Miller, D.G. *et al.*, (2002). «Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration». Nature Genetics 30: 147-148.

- Mizuarai, S. *et al.*, (2001). «Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector». *Biochem Biophys Res Commun* 286: 46-63.
- Muir, W.M. et Howard, R.D., (2002a). «Assessment of possible ecological risks and hazards of transgenic fish with implications for other sexually reproducing organisms». *Transgenic Research* 11: 101-114.
- Muir, W.M. et Howard, R.D., (2002b). «Methods to assess ecological risks of transgenic fish releases». In: *Genetically Engineered Organisms: Assessing Environmental and Human Health Effects*. CRC Press, Boca Raton FL.
- Muir, W.M. et Howard, R.D., (2001). «Fitness components and ecological risk of transgenic releasea model using Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)». *American Naturalist* 158: 1-16.
- Naito, M., (1997). «The microinjection of DNA in the early chicken embryo». In: *Transgenic Animals: Generation and Use*, LM Houbedine (ed) Harwood Academic Publishers pp. 69-73.
- National Academy of Sciences (The US), (2002). *Animal Biotechnology: Science-based concerns*. National Academy Press, Washington, DC, USA. <http://www.nap.edu/books/0309084393/html/>
- Negrone, M. et Buc, H., (2001). «Mechanisms of retroviral recombination». *Anu rev Genet* 35: 275-302.
- Nielsen, K.M. *et al.*, (1998). «Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria—a rare event?» *FEMS Microbiology Reviews* 22: 79-103.
- Office International des Épizooties (OIE), (2001). «Évaluation des services vétérinaires». Code zoonosaire international., Chapitre 1.3.3.
- Oppenheim, S.M. *et al.*, (2001). «Evidence against humoral immune attack as the cause of sheep-goat inter-species and hybrid pregnancy failure in a doe». *Theriogenol.* 55(7): 1567-1581.
- Pfeifer, A. *et al.*, (2002). «Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos». *PNAS*, 99:2140-2145.
- Piedrahita, J.A., (2000). «Targetted modification of the domestic animal genome». *Theriogenol* 53: 105-116.
- Pimm, S.L., (1984). «The complexity and stability of ecosystems». *Nature* 30: 32–326.
- Pinheiro, *et al.*, (1989). «The natural occurrence of sheep and goat hybrids». *Theriogenol.* 32: 987-994.
- Polejaeva, I.A. et Campbell, K.H.S., (2000). «New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis». *Theriogenol* 53:117-126.
- Renard, J-P. *et al.*, (2002). «Nuclear transfer technologies: between successes and doubts». *Theriogenol* 57; 203-222.
- Rideout III, W.M. *et al.*, (2001). «Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293: 1093-1097.
- Rigg, R.J. *et al.*, (1996). «A novel amphotropic packaging cell line high titer, complement resistance and improved safety». *Virology*, 218: 290-295.
- Roemer, I. *et al.*, (1997). «Epigenetic inheritance in the mouse». *Current Biology* 7: 277-280.

Ronfort, C. *et al.*, (1997). «The use of retroviral vectors for gene transfer into bird embryos». In: *Transgenic Animals: Generation and Use*, LM Houbedine (ed) Harwood Academic Publishers pp. 83-94.

Saikhun, J. *et al.*, (2002). «Xenonuclear transplantation of buffalo (*Bubalus bubalus*) fetal and adult somatic cell nuclei into bovine (*Bos indicus*) oocyte cytoplasm and their subsequent development». *Theriogenol.* 57(7): 1829-1837.

Scientist's Working Group on Biosafety, (1998). *Manual for Assessing Ecological and Human Health Effects of Genetically Engineered Organisms*. The Edmonds Institute, Washington DC.
<http://www.edmonds-institute.org/manp1os.pdf>

Schubbert, R. *et al.*, (1998). «On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus». *Mol Gen Genet* 259: 569-576.

Schupbach, J., (2001). «Induction/ activation and detection of occult viral agents present in mammalian cells». *Dev Biol Basel* 106: 425-437.

Shin, T. *et al.*, (2002). «A cat cloned by nuclear transplantation». *Nature* 415: 859.

Smith, L.C. *et al.*, (2000). «Mitochondrial genotype segregation and effects during mammalian development: applications to biotechnology». *Theriogenol* 53: 35-46.

Solomon, J.M. et Grossman, A.D., (1996). «Who's competent and when: Regulation of natural genetic competence in bacteria». *Trends in Genetics*, 12: 150-155.

Steele, N.C. et Pursel, V.G., (1990). «Nutrient partitioning by transgenic animals». *Ann Rev Nutr* 10: 213-32.

Steinborn, R. *et al.*, (2000). «Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned bovine embryos». *Nature Genetics* 25: 255-257.

Steinborn, R. *et al.*, (1998). «Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos». *FEBS Letters* 426: 352-356.

Stringfellow, D.A. et Seidel, S.M., (editors), (1998). *Manual of the International Embryo Transfer Society*.

Stringfellow, D.A. et Givens, M.D., (2000a). «Epidemiologic concerns relative to *in vivo* and *in vitro* production of livestock embryos». *Anim Reprod Sci* 60-61: 629-642.

Stringfellow, D.A. et Givens, M.D., (2000b). «Infectious agents in bovine embryo production: Hazards and solutions». *Theriogenol* 53: 85-94.

Sutcliffe, A.G., (2002). «Health risks in babies born after assisted reproduction». *British Medical Journal* 25:117-118.

Sutmoller, P. et Wrathall, A.E., (1997). «A quantitative assessment of the risk of transmission of foot-and-mouth disease, bluetongue and vesicular stomatitis by embryo transfer in cattle». *Prev Vet Med* 32: 111-132.

Taylor, M., (2002). «BSE Update: BSE and embryo transfer». *Anim Health News* 08/02/2002.

Ting, *et al.*, (1994). «Insertional mutation on mouse chromosome 18 with vestibular and craniofacial abnormalities». *Genetics* Jan;136(1): 247-254.

Tirlapur, U.K. et Konig, K., (2002). «Targetted transfection by femtosecond laser». *Nature* 418: 290-91.

- Traulis, M.A., (2002). «Influence of the prion protein gene, *Prnp*, on scrapie susceptibility in sheep». *Acta Path Micro Immunol Sci* 110: 33-43.
- Tsukui, T. *et al.*, (1996). «Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs». *Nat Biotech* 14: 982.
- United States National Academy of Sciences, (2002). *Animal Biotechnology: Science-based concerns*. National Academy Press, Washington, DC, USA, <http://www.nap.edu/books/0309084393/html/>.
- Van Reenen, C.G. *et al.*, (2001). «Transgenesis may affect farm animal welfare: A case for systematic risk assessment». *J Anim Sci* 79: 1763-1779.
- Vose, D. *et al.*, (2001). «Antimicrobial resistance: risk analysis methodology for the potential impact on public health of antimicrobial resistant bacteria of animal origin» («Antibiorésistance : méthodologie d'analyse du risque appliquée à l'impact potentiel sur la santé publique des bactéries d'origine animale résistantes aux antibiotiques» - résumé). *Rev. Sci. Tech. Off. int. Épizoot.* 20: 811-827.
- Wakayama, T. *et al.*, (1998). «Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei». *Nature*: 394: 369-74.
- Wall, R.J., (2002). «New gene transfer methods». *Theriogenol* 57: 189-201.
- Wall, R.J. *et al.*, (1996). «Synthesis and secretion of the mouse whey acidic protein in transgenic sheep». *Transgenic Res* 5: 67-72.
- Weiher, H. *et al.*, (1990). «Transgenic mouse model of kidney diseaseinsertional inactivation of ubiquitously expressed gene leads to nephrotic syndrome». *Cell* 62: 425-434.
- Weiss, R.A., (2001). The Leeuwenhoek Lecture 2001. «Animal origins of humans infectious disease». *Phil Trans Roy Soc Lond B*, 356: 957-977.
- White, D.G. *et al.*, (2001). «Antimicrobial resistance: standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance» («Antibiorésistance : standardisation et harmonisation des méthodes de laboratoire pour la détection et la quantification de l'antibiorésistance» - résumé). *Rev. Sci. Tech. Off. int. Épizoot.* 20: 849-858.
- Willadsen, *et al.*, (1991). «The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle». *Theriogenol* 35: 161-170.
- Wilmot, I., (1995). «Modification of farm animals by genetic engineering and immunomodulation». In: *Issues in Agricultural Bioethics* (ed. TB Mepham, GA Tucker and J Wiseman). Nottingham: Nottingham University Press.
- Woegerbauer, M. *et al.*, (2002). «Natural genetic transformation of clinical isolates of *Escherichia coli* in urine and water». *Appl Env Microbiol* 440-443.
- Wolf, E. *et al.*, (2000). «Transgenic technology in farm animals—progress and perspectives». *Exp Physiol* 85: 615-625.
- Wu, Y. *et al.*, (2001). «M cell-targeted DNA vaccination». *PNAS* 98: 9318-9323.
- Yin, X.J. *et al.*, (2002). «Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear- transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells». *Reproduction* 124: 41-47.

Young, L.E. *et al.*, (2001). «Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture». *Nat Genet* 2001: 153-154.

Young, L.E. *et al.*, (1998). «Large offspring syndrome in cattle and sheep». *Review of Reproduction* 3: 155-163.

Yu, S.S., Kim. J-M. et Kim, S., (2000). «High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences». *Gene Therapy* 7: 797-804.