

Confinement et consommation des animaux clonés et transgéniques

L.-M. Houdebine & J.-P. Renard

UMR Biologie du développement et reproduction, Institut national de la recherche agronomique, 78352 Jouy-en-Josas, France

Résumé

La reproduction par clonage supprime certains des problèmes qui accompagnent la reproduction sexuée mais elle en engendre d'autres. Le patrimoine génétique des cellules donneuses de noyau n'est pas strictement connu. Le statut génétique des clones ne l'est pas davantage. La reprogrammation du génome des cellules donneuses de noyau par le cytoplasme de l'ovocyte est fréquemment incomplète. Les animaux obtenus par clonage sont donc essentiellement génétiquement identiques à leurs géniteurs mais ils sont souvent épigénétiquement modifiés sans que l'on puisse en prévoir les effets. La transgénèse résulte le plus souvent de l'addition à un génome d'un ou de quelques gènes connus. Les effets directs et indirects des transgènes ne peuvent être tous prévisibles. Des mesures de confinement spécifiques permettent d'élever les animaux dans des conditions de sécurité élevée afin que ceux-ci ne soient pas disséminés dans la chaîne alimentaire humaine, l'alimentation du bétail ou l'environnement. Des tests permettent par ailleurs d'évaluer la toxicité, l'allergénicité et l'infectiosité des animaux obtenus par clonage ou transgénèse.

Mots-clés

Animal transgénique – Clonage – Confinement – Élevage – Sécurité sanitaire des aliments – Transgénèse.

Introduction

La reproduction sexuée offre au sélectionneur la possibilité d'échapper à certaines contraintes de l'environnement. Elle permet ainsi d'établir des lignées d'animaux qui répondent aux besoins humains, notamment alimentaires. Ce mode de sélection comporte des limites qui proviennent du fait que les modifications génétiques des individus soumis au choix du sélectionneur résultent de phénomènes aléatoires. Le sélectionneur ignore le plus souvent le gène ou les gènes qu'il sélectionne et qui sont à l'origine de l'effet phénotypique recherché. Il ignore encore plus la nature des gènes qui sont inévitablement cosélectionnés en raison des remaniements chromosomiques qui ont lieu lors de la gamétogénèse. La sélection génétique classique est donc à la fois créatrice et réductrice de biodiversité. Elle peut être à l'origine de la transmission de défauts génétiques à de nombreux descendants. La sélection classique peut également engendrer des animaux présentant une sensibilité élevée vis-à-vis de certains pathogènes. Pour

autant, les animaux issus de la sélection classique ne sont pas maintenus dans des espaces confinés. Leurs produits sont par ailleurs soumis à des évaluations qui concernent leur qualité sur le plan alimentaire mais non spécifiquement leurs éventuels effets néfastes vis-à-vis des consommateurs.

La reproduction par clonage, qui commence à devenir une réalité tangible chez les animaux, supprime, en principe, une partie de ces phénomènes aléatoires. Le clonage, s'il est mis en œuvre pour accélérer le progrès génétique, permet de donner la faveur aux géniteurs validés par une descendance abondante dont les qualités ont pu être largement évaluées. Le clonage réduit ainsi les probabilités que soient transmis au hasard certains gènes ayant des effets négatifs chez les animaux d'élevage. Le clonage est aussi, si l'on y prend garde, réducteur de la biodiversité. Ceci peut accentuer les effets indésirables de la sélection moderne qui repose sur un nombre de plus en plus restreint de géniteurs.

La reproduction par clonage suppose que le génome d'une cellule donneuse de noyau soit reprogrammé par le cytoplasme d'un ovocyte énucléé, au point de faire revenir la cellule pseudo-embryonnaire ainsi créée à l'état totipotent. Cette reprogrammation est souvent imparfaite, ce qui rend parfois impossible le développement des embryons ou altère la santé des animaux nouveaux-nés. Les clones ne sont pas pour autant maintenus dans des espaces confinés, mais les produits qui en dérivent ne sont actuellement pas proposés aux consommateurs humains.

La transgénèse appliquée à l'élevage a, en principe, pour but de modifier de manière connue le génome d'un animal, en lui ajoutant un gène bien défini ou, au contraire, en inactivant spécifiquement l'un de ses gènes. Ceci a créé, de manière abrupte, des géniteurs de lignées nouvelles présentant une biodiversité qui ne peut être obtenue aussi rapidement, voire pas du tout, par la sélection classique. Ces changements très divers ont conduit à définir les conditions de confinement dans lesquelles les animaux transgéniques doivent être maintenus. La consommation des produits issus des organismes transgéniques, qui est une réalité dans le domaine végétal, fait d'ores et déjà l'objet de réglementations pour les produits animaux à venir.

Ce chapitre se propose de faire le point sur les problèmes que posent le clonage et la transgénèse des animaux pour l'environnement, l'élevage et la consommation humaine.

Les problèmes résultant du clonage

Par essence, le clonage par transfert de noyau engendre des animaux génétiquement identiques au donneur de noyau. La réalité est plus complexe dans la mesure où la technique de clonage implique le plus souvent la fusion d'une cellule somatique avec un ovocyte énucléé. Le pseudo-embryon ainsi obtenu contient des mitochondries de l'ovocyte et de la cellule donneuse (10, 29). Les clones sont donc, de ce point de vue, moins identiques génétiquement que les jumeaux obtenus spontanément ou expérimentalement par clivage des embryons précoces.

Le statut génétique des cellules donneuses de noyau n'est que partiellement connu. Il est de plus en plus admis qu'une proportion non négligeable de fœtus sont des chimères, dans la mesure où ils résultent de l'agrégation de deux embryons précoces (21).

Les embryons émettent par ailleurs des cellules qui peuvent s'implanter dans les tissus de leur mère (2). De plus, il est impossible d'affirmer qu'une cellule somatique qui utilise moins de 10 % de ses gènes est génétiquement intègre. Certains échecs du clonage peuvent résulter du fait

que des gènes essentiels pour le développement embryonnaire et fœtal ne sont plus fonctionnels dans un certain nombre de cellules somatiques. Des études en cours devraient permettre de préciser ces points (6).

Des données convergentes indiquent par ailleurs que la reprogrammation des gènes de ces cellules somatiques donneuses de noyau n'est que partielle. Ainsi 400 des 10 000 gènes examinés chez les fœtus de souris clonées ont un taux d'expression anormal (8). Les anomalies dans l'expression des gènes est corrélée avec un taux de méthylation anormal de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (3, 25). Dans le même ordre d'idées, une hypométhylation de certaines régions de l'ADN peut conduire à une activation de transposons ainsi que de génomes rétroviraux endogènes et à la formation de particules virales infectieuses.

Il est admis que la non-disponibilité des gènes résultant d'une hyperméthylation de l'ADN est la cause principale de l'interruption du développement fœtal tout au long de la gestation. Il en est de même pour les anomalies diverses dont souffrent les nouveaux-nés. Il est important de noter que la plupart des gènes dont le fonctionnement est perturbé sont normalement exprimés dans le placenta. L'hypodéveloppement du placenta qui en résulte induit des perturbations diverses chez le fœtus jusqu'à la mise bas. Il est remarquable que ces anomalies chez les nouveaux-nés disparaissent progressivement chez les animaux qui survivent (5, 9, 36). En règle générale, les animaux clonés qui ont passé sans encombre la période qui suit leur naissance sont apparemment normaux. Les souris ont toutefois en moyenne une vie statistiquement plus courte. Ce phénomène ne paraît pas dû à un vieillissement prématuré mais plutôt à une sensibilité accrue des animaux vis-à-vis des pathogènes. Les défauts de reprogrammation du génome des clones pourraient donc concerner directement les tissus placentaires, mais indirectement les tissus fœtaux.

Les anomalies observées chez un certain nombre de clones semblent être abolies par la reproduction sexuée. Les descendants des clones ne présentent en effet pas les défauts de leurs géniteurs. Les souris clonées appartenant à une lignée particulière sont ainsi très fréquemment obèses, mais pas leurs descendants (30). La reproduction sexuée peut donc d'une part éliminer les gamètes anormaux et parfaire la reprogrammation des génomes. Les télomères anormalement courts chez certains clones retrouvent ainsi une longueur normale chez les descendants (27). En revanche, certains sites hyperméthylés de l'ADN de souris clonées ne deviennent pas normalement déméthylés chez tous les descendants (16).

Les souris résultant de six clonages successifs ne diffèrent pas des animaux témoins (34). Il n'en est toutefois pas de même chez les bovins, qui semblent accumuler les défauts induits à chaque opération de clonage (14).

Certaines observations suggèrent que le système immunitaire des clones est souvent imparfaitement fonctionnel. Il se pourrait par ailleurs que l'arrêt du développement de certains clones résulte de phénomènes de rejet à caractère immunitaire. En effet, des bovins clonés expriment des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité 1 (MHC1) à des taux variables et de manière non régulée. Un nombre anormalement élevé de lymphocytes T CD3⁺ a également été observé au voisinage des cellules endométriales chez les vaches portant des embryons clonés (7).

Les problèmes résultant de la transgénèse

La transgénèse est une opération relativement précise dans la mesure où les gènes transférés pour améliorer les caractéristiques génétiques des animaux ont des propriétés biologiques connues. Il est pour autant impossible de prévoir tous les effets secondaires des transgènes.

Certains de ces effets sont induits par les techniques de transgénèse en tant que telles. Dans la plupart des cas, le gène étranger est inséré dans le génome de l'organisme hôte par une recombinaison illégitime (11). Le site d'intégration est donc imprévisible ; il n'est peut-être pas pour autant totalement aléatoire. Il semble que les gènes étrangers s'intègrent plus fréquemment dans les régions ouvertes de chromatine, qui sont celles où se trouvent les gènes actifs. L'intégration aléatoire peut donc inactiver un gène de l'hôte en interrompant sa région codante ou ses éléments régulateurs. Il est ainsi admis que 7 % à 20 % des souris transgéniques obtenues par micro-injection d'ADN présentent des mutations insertionnelles qui inactivent des gènes de l'hôte (33). Les effets de ces mutations ne s'observent guère chez les animaux hétérozygotes pour le transgène, mais seulement chez les homozygotes. À l'inverse, la présence du promoteur d'un transgène peut activer indûment un gène de l'hôte dont les effets peuvent s'exercer même chez les animaux hétérozygotes.

Ces phénomènes sont assez fréquemment observés. Ils limitent la validité des modèles biologiques transgéniques et peuvent modifier le métabolisme des animaux avec des conséquences aussi variées qu'imprévisibles. L'intégration non ciblée des transgènes a lieu lorsque l'ADN étranger est introduit dans l'embryon par micro-injection dans les pronoyaux ou le cytoplasme et par transfection dans les gamètes incluant l'incubation des spermatozoïdes en présence d'ADN. C'est également le cas lorsque le gène étranger est porté par un transposon ou un vecteur rétroviral qui favorisent le transfert de l'ADN et son intégration dans le génome de l'hôte.

L'intégration du gène étranger peut être très précisément ciblée si le processus fait appel à une recombinaison homologue entre l'ADN exogène et le site choisi du génome de l'hôte. La recombinaison homologue est un phénomène peu fréquent. Ceci impose une sélection des cellules dans lesquelles l'intégration ciblée a eu lieu. Ces cellules peuvent être des cellules embryonnaires souches (ES) qui sont capables de se mêler aux cellules d'un embryon receveur au même stade de développement et de participer à la genèse de l'ensemble des organes de l'organisme. Des cellules ES ne sont en pratique disponibles que chez deux lignées de souris. Ceci limite l'utilisation de cette technique. Une alternative consiste à introduire le gène étranger dans des cellules somatiques utilisées ultérieurement pour engendrer des animaux clonés transgéniques. Les deux allèles de deux gènes ont ainsi pu être inactivés chez les mêmes vaches (15). L'intégration ciblée réduit très notablement les artefacts qui accompagnent l'intégration aléatoire.

Chez les animaux expérimentaux (en pratique, essentiellement chez la souris), il est possible de cibler l'intégration d'un gène étranger dans des sites prédéterminés sans devoir à chaque fois remplacer un gène de l'hôte par le gène étranger. Le locus du gène HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase) chez la souris est ainsi ciblé pour introduire des gènes étrangers qui s'expriment de manière spécifique à l'égard des tissus, avec un taux de succès élevé (4). Il est de même possible d'intégrer un gène étranger dans des sites préalablement choisis et contenant un site Lox P qui peut se recombiner avec un autre site Lox P présent dans l'ADN étranger (11). Il est possible également d'augmenter très notablement la fréquence d'intégration par recombinaison homologue en ajoutant au préalable au site choisi une séquence reconnaissant un enzyme de restriction telle que I-SceI capable d'induire une double coupure de l'ADN de l'hôte (11).

Les effets secondaires les plus importants des transgènes résultent de l'activité des protéines (ou des acides ribonucléiques [ARN]) pour lesquelles ils codent. Une protéine peut interagir avec divers composants des cellules et modifier leur métabolisme de manière imprévisible. Ceci peut augmenter la concentration de produits toxiques ou allergènes. Il est important de noter que les animaux ressemblent beaucoup plus aux humains que les plantes. De ce fait, il est peu probable que des toxines ayant une forte activité s'accumulent chez un animal qui serait la première victime aisément identifiable des molécules indésirables. Les animaux comme les plantes peuvent contenir des protéines dotées d'un pouvoir allergène. Celles-ci peuvent s'accumuler dans certains organes des animaux ou des fluides consommables comme le lait sous l'influence directe ou indirecte de transgènes.

Contrairement à ce qui est souvent affirmé, l'apport d'un gène très étranger au monde animal ne présente *a priori* pas

plus de risque ou d'inconnues qu'un gène appartenant au même règne, voire à la même espèce. Un gène et sa protéine ont plus de chances de passer inaperçus dans un monde qui leur est très étranger, dans la mesure où les interactions avec les molécules de l'hôte sont *a priori* moins probables. Le gène de l'hormone de croissance de saumon ajouté au génome des saumons pose ainsi, en principe, plus de problèmes que le gène Bt de la bactérie *Bacillus thuringiensis* ajouté au maïs ou au coton.

Il est concevable, mais très peu probable, qu'une protéine codée par un transgène adopte une conformation anormale ou induise un tel phénomène chez une protéine de l'hôte et se transforme ainsi en une amorce capable de déclencher l'accumulation de complexes insolubles de type amyloïdes, comme ceux qui sont impliqués dans les maladies à prion ou la maladie d'Alzheimer.

L'introduction d'un gène dans un génome animal peut réactiver un transposon ou génome rétroviral intégré et induire ainsi une multiplication du transposon ou la production de particules virales infectieuses potentiellement pathogènes. Plus généralement, la présence d'un transgène peut s'accompagner d'une augmentation de la sensibilité des animaux vis-à-vis de pathogènes de l'espèce considérée potentiellement capables d'infecter des organismes humains (31).

Le confinement des animaux clonés et transgéniques

Il est admis que les interventions humaines sur les organismes vivants ont peu de probabilités de créer des pathogènes fondamentalement plus dangereux que ceux que la nature engendre périodiquement. Les techniques utilisées depuis longtemps par les pathologistes ont fait leur preuve et le confinement des animaux génétiquement modifiés peut exploiter les techniques et les procédures préexistantes sans avoir à en inventer spécifiquement de nouvelles.

Il n'a pas été proposé jusqu'à ce jour de maintenir les animaux clonés dans des lieux confinés. Il en va tout autrement avec les animaux transgéniques. Les mesures de confinement ont pour but de protéger les expérimentateurs mais aussi de prévenir toute dissémination intempestive des transgènes dans la chaîne alimentaire humaine ou animale ainsi que dans l'environnement. Quatre classes de risques ont été définies pour évaluer les risques.

La classe 1 comprend les animaux abritant un gène considéré comme dépourvu de risques. Ces animaux peuvent être élevés sans précaution particulière sauf une : ils doivent être étiquetés et maintenus dans des conditions

qui empêchent la dissémination des transgènes aux animaux voisins de l'animalerie. Les prélèvements et les carcasses de ces animaux peuvent être mêlés aux autres déchets mais après que l'on se soit assuré qu'ils ne sont plus vivants.

Les animaux de classe 2 comportent des risques infectieux limités. Les maladies en résultant ne sont que moyennement dangereuses et une prophylaxie ou une thérapie existent contre ces maladies. Les animaux doivent être maintenus dans des cages fermées par un couvercle muni d'un filtre ne laissant passer aucun pathogène. Les animaux doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire de type II. Les résidus des animaux doivent être soumis à un processus d'inactivation dans un autoclave ou par toute autre technique conduisant au même résultat. Ces dispositifs, définis essentiellement pour des souris, doivent être adaptés aux animaux de plus grande taille ou vivant dans des milieux aquatiques ainsi qu'aériens pour assurer le même niveau de sécurité.

Les animaux de classe 3 comportent des risques infectieux élevés. Ils doivent être maintenus dans les mêmes conditions que ceux de la classe 2, mais dans un local étanche et en légère dépression dans lequel on pénètre par un sas après s'être muni de vêtements spéciaux. L'air qui sort du local traverse un filtre qui ne laisse passer aucun pathogène. Les expérimentateurs sont protégés par des combinaisons, des gants et éventuellement des masques. Le matériel expérimental et les résidus d'animaux sont évacués du local à travers un autoclave à double entrée.

Les animaux de classe 4 abritent des agents pathogènes exceptionnellement dangereux. Les conditions de confinement sont celles de la classe 3 mais le local est composé de matériaux résistants à des chocs mécaniques et à des agents chimiques désinfectants. Les animaux sont maintenus dans une boîte à gant. Les expérimentateurs sont protégés par des combinaisons totalement étanches qui les isolent de leur environnement.

La dissémination volontaire des animaux

Contrairement aux plantes, la plupart des animaux d'élevage ne rencontrent pas leurs homologues sauvages et n'ont que des chances limitées de se maintenir et surtout de se reproduire dans les conditions naturelles. L'élevage des animaux transgéniques domestiques pose donc *a priori* relativement peu de problèmes environnementaux.

Certaines espèces, essentiellement celles qui nagent ou volent et peuvent occuper de grandes espaces, posent au contraire des problèmes plus aigus que la plupart des

plantes. Il est en effet loisible, dans une certaine mesure au moins, d'enrayer la dissémination des plantes en les détruisant mécaniquement ou à l'aide d'herbicides. Il n'est pas possible de contrôler aisément la dissémination d'insectes ou des poissons, surtout si ceux-ci vivent dans les eaux marines. Des dispositifs spécifiques doivent être mis en œuvre pour rendre impossible une conquête intempestive de l'environnement par ce type d'animaux génétiquement modifiés. Ces dispositifs peuvent être des contraintes physiques (bassins non connectés avec la mer), des stérilisations par triploidie ou tout autre moyen.

Un classement communément admis des principaux animaux domestiques en fonction des risques décroissants d'une dissémination potentielle dans l'environnement est le suivant : insectes, coquillages, poissons, souris et rat, chat, porc, cheval, lapin, chien, poulet, mouton et enfin vache.

Il est important de rappeler que seuls les animaux comportant des risques de classe 1 peuvent prétendre à être candidats pour être disséminés volontairement dans l'environnement ou être proposés aux consommateurs humains. Ce type d'organismes présente *a priori* plutôt moins de risques que ceux qui accompagnent l'implantation d'une espèce dans un nouveau biotope.

La consommation des animaux clonés et transgéniques

Ces deux types d'animaux comportent des risques théoriques communs et d'autres qui leur sont spécifiques.

Dans les deux cas, il s'agit d'organismes vivants entiers, donc particulièrement complexes. Dans les deux cas également, la consommation des animaux fondateurs n'est pas envisagée. C'est leur descendance qui est potentiellement intéressante de ce point de vue.

Comme il a été montré plus haut, les descendants des clones ont récupéré l'essentiel de leur normalité. Les descendants des animaux fondateurs transgéniques sont peu différents de leurs géniteurs. Tout au plus peut-on prendre en compte le fait que les fondateurs sont parfois mosaïques pour leur transgène. Les descendants ont donc le transgène dans toutes leurs cellules mais pas toujours les fondateurs.

Les essais visant à évaluer les risques pour les consommateurs ne sauraient se dérouler sur les fondateurs. Il faut en effet un nombre suffisant d'animaux. Il est essentiel également que ceux-ci soient représentatifs, autant que possible, de ceux qui sont susceptibles d'être exploités dans les élevages. C'est donc sur les descendants des clones que doivent essentiellement porter les tests.

Chaque transgène pose, en principe, des problèmes spécifiques, en raison des artefacts dus au caractère aléatoire de l'intégration, mais surtout en raison de l'action du produit codé par le transgène, protéine ou ARN. Les anomalies observées chez les clones sont essentiellement les mêmes, pour une espèce donnée, dans les différents laboratoires concernés. Il n'apparaît donc pas nécessaire d'évaluer en détail les risques que peut comporter la reproduction de chaque clone. Il doit pouvoir être considéré que le clonage chez une espèce donnée engendre, ou non, des lignées d'animaux sains, ou non, après que les tests appropriés ont été réalisés.

Les tests appliqués aux animaux clonés

Les tests qui ont été appliqués aux animaux nés par clonage sont pour l'essentiel ceux qui sont communément utilisés pour évaluer les effets néfastes potentiels des aliments. Les tests préliminaires qui ont été utilisés, bien que très convergents, ne portent que sur un nombre très restreint d'animaux, lequel n'est d'ailleurs pas toujours bien précisé dans les publications. Ces tests sont énumérés ci-après.

Composition globale du lait et de la viande

Des mesures de la composition du lait et de la viande des vaches clonées ont révélé qu'il n'existait aucune différence mesurable avec leurs homologues nées par reproduction sexuée. Les paramètres retenus sont les suivants : quantité totale de matière solide (minéraux, protéines, lipides, lactose), pH, SCC (*somatic cell counts*), ADV (*acid degree value*), proportion des différentes protéines du lait (caséines et protéines du lactosérum), concentration des différents acides gras du lait, composition globale des neuf parties de la carcasse dont l'eau, les protéines, les lipides, les carbohydrates, les cendres et le cholestérol (19, 26, 28, 35).

Digestibilité

Des tests *in vitro* utilisant des extraits gastriques et intestinaux ont révélé que les produits issus des animaux obtenus par clonage ou reproduction sexuée ne présentaient aucune différence mesurable (26, 28).

Toxicité et alimentarité

Des rats ont été nourris pendant 14 semaines avec de la viande de vache lyophilisée provenant d'animaux nés par clonage ou reproduction sexuée. Les paramètres suivants ont été mesurés : état général, comportement, consommation de nourriture, létalité, croissance, reproduction, lactation, ainsi que 29 paramètres physiologiques comprenant entre autres l'analyse du sang et des urines et la mesure de neuf réactions réflexes. De plus, les organes des animaux ont été soumis à des examens histologiques. Aucune anomalie n'a été observée chez les rats ayant consommé la viande d'animaux clonés (26, 28, 32).

Allergénicité

Les tests classiques de sensibilisation chez les rats n'ont pas révélé l'existence d'allergènes dans les extraits de viande de vaches clonées (13). Des immunoglobulines de type IgG, IgA et IgM, mais non IgE, ont par ailleurs été trouvées chez les rats nourris avec du lait ou de la viande de vaches clonées (32). Ceci confirme que les clones ne contiennent pas de composés plus allergènes que les animaux contrôlés.

Mutagénicité

Aucun effet mutagène des extraits de viande de vaches clonées n'a pu être mis en évidence (28).

Présence de particules rétrovirales

Des anomalies de la méthylation de l'ADN chez les animaux clonés sont susceptibles de réactiver les génomes de rétrovirus intégrés. Des expériences préliminaires indiquent qu'aucune des séquences rétrovirales endogènes connues n'est exprimée chez les vaches clonées (L. Martignat et coll., résultats non publiés).

Les tests appliqués aux animaux transgéniques

Pour évaluer les effets des transgènes sur l'organisme des animaux, il est possible de procéder à des tests analytiques et à des tests globaux semblables en bien des points à ceux appliqués aux animaux clonés.

Équivalence en substance

La comparaison de la composition biochimique des animaux transgéniques et des témoins à l'aide de divers systèmes de fractionnement peut révéler la présence spécifique de substances, due, directement ou non, aux transgènes. La mesure de la composition des carcasses doit révéler des différences dues à la présence des transgènes. Ces mesures doivent prendre en considération la composition globale en protéines et en lipides, l'analyse détaillée des acides gras, du cholestérol, etc., la concentration des principales hormones et l'analyse des principaux paramètres sanguins.

Dans cet ordre d'idées, la comparaison des transcriptomes, protéomes et métabolomes pourrait, en principe, révéler des modifications de diverses fonctions biologiques chez les animaux transgéniques. En pratique, les choses sont moins simples. Les tests en question ne sont pas encore assez normalisés pour être fiables. Des variations de certains paramètres peuvent refléter des états physiologiques transitoires comme le stress, qui n'ont pas de rapport avec la présence du transgène. Il est, par ailleurs, peu probable qu'une variation spécifique de quelques paramètres soit aisément interprétable en termes de nocivité pour les consommateurs.

Il n'est donc pas certain que l'utilisation de ces nouvelles technologies comme outils de mesure de détermination des équivalences en substance soit pertinente au moment présent. L'approche actuelle préconisée pour les cultures transgéniques, c'est-à-dire l'analyse compositionnelle des éléments clés de l'aliment (les nutriments importants, mais aussi les facteurs anti-nutritionnels ou toxiques), reste probablement celle qui s'appliquerait aussi aux aliments dérivés d'animaux transgéniques.

Description du transgène

La structure complète de l'ADN étranger transféré doit être connue ainsi que la structure du même ADN à l'état intégré chez l'animal. La séquence des régions flanquantes du transgène au site d'intégration doit également être établie. Ceci permet dans le meilleur des cas de savoir si l'intégration a eu lieu dans un gène de l'hôte et si la nouvelle structure créée par l'intégration peut diriger la synthèse d'un ARN et de peptides potentiellement allergènes.

L'ADN étranger ne doit contenir, autant que cela se peut, que les séquences utiles à son action attendue. Les gènes de résistance à des antibiotiques doivent être exclus pour éviter leur éventuel transfert, même très improbable, aux bactéries du système digestif.

Il peut être utile de mesurer le niveau de méthylation du transgène et de ses séquences flanquantes. Ceci peut aider à prévoir des anomalies dans l'expression du transgène et des séquences voisines du génome de l'hôte.

La stabilité du transgène et de son expression doit être vérifiée sur plusieurs générations.

En règle générale, les gènes étrangers introduits par micro-injection sont très stables. Les gènes apportés par des vecteurs peuvent se recombiner, mais ce phénomène est, au pire, très rare. Les gènes apportés par les transposons peuvent se disséminer à faible taux dans le génome des animaux transgéniques et de leurs descendants. L'intensité de ce phénomène dépend des transposons utilisés. Il pose peu de problèmes pour les animaux expérimentaux. Il peut en poser davantage pour les animaux d'élevage.

Ces questions trouvent d'elles-mêmes une réponse, puisqu'une lignée d'animaux, transgéniques ou non, ne saurait être proposée aux éleveurs tant que la stabilité de leurs caractéristiques génotypiques et phénotypiques n'a pas été établie.

Toxicité et allergénicité

L'évaluation de ces deux types d'effets secondaires potentiels des transgènes peut s'inspirer de celle classiquement effectuée pour identifier les actions indésirables des substances chimiques utilisées en médecine vétérinaire.

Des tests classiques de toxicité aiguë peuvent être réalisés chez des souris ou des rats ayant reçu par voie orale et pendant des temps courts la protéine codée par le transgène.

Des tests de toxicité avec des rats pendant 14 semaines, semblables à ceux décrits plus haut pour les animaux clonés, peuvent être mis en œuvre.

Les tests d'allergénicité peuvent être réalisés à partir de la protéine codée par le transgène. La structure primaire de la protéine peut révéler des épitopes connus pour être des allergènes ou susceptibles de l'être. La rapidité de la digestion de la protéine codée par le transgène en présence de sucs gastriques et pancréatique est par ailleurs un bon indicateur d'une probable faible allergénicité. La nature de la réponse immunitaire aux extraits d'animaux clonés peut également révéler l'existence de substances allergènes, comme cela a été décrit plus haut pour les animaux clonés.

Susceptibilité vis-à-vis des pathogènes

Un transgène est susceptible de réactiver un génome rétroviral intégré en apportant un promoteur à son voisinage. Il peut, par ailleurs, conduire à l'augmentation de la concentration d'un récepteur viral. Les tests appliqués dans ce domaine aux animaux clonés valent pour les animaux transgéniques.

Les transgènes peuvent, directement ou non, augmenter la sensibilité des animaux vis-à-vis de divers pathogènes (virus, bactéries ou parasites). Ceci peut en principe contribuer à augmenter la fréquence des épizooties, voire des zoonoses. Les animaux transgéniques doivent donc être soumis à une surveillance particulière portant sur le long terme, comme cela est recommandé pour les clones et leurs descendants.

Conclusion et perspectives

Les animaux clonés et transgéniques sont respectivement épigénétiquement et génétiquement modifiés à des degrés divers. Les effets néfastes qui en résultent potentiellement ne peuvent être complètement évalués par des tests analytiques pointus. Les événements qui accompagnent ces opérations sont en partie imprévisibles, en raison même de la complexité des organismes concernés. Des tests globaux sont les plus susceptibles de révéler des effets intégrés, qui ne se manifestent qu'*in vivo* et ne peuvent faire tous l'objet d'hypothèses précises de la part des expérimentateurs.

Les risques potentiels propres aux animaux clonés ont déjà fait l'objet de rapports et de colloques depuis cinq ans : Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA),

1999 (31) ; National Academy of Sciences (NAS), 2002 (17); Pew Initiative, 2002 (22) ; International Council for Science (ICSU), 2003 (12) ; Seamark et coll., 2003 (26). La plus récente de ces manifestations est un colloque organisé en novembre 2003 par l'Organisation de coopération et de développement économiques et l'Institut national de la recherche agronomique. Elle recouvrait l'ensemble des problèmes concernant les animaux clonés qui ont été traités par les spécialistes des principaux laboratoires impliqués dans ces recherches. Les données ont été publiées dans le numéro du mois de juin 2004 du journal *Cloning and Stem Cells* (5, 6, 7, 9, 10, 19, 24, 28, 32).

Les données acquises par les différents groupes sont très convergentes. Selon les critères classiques appliqués pour la mise en vente des carcasses, les animaux clonés qui ont atteint l'âge adulte pourraient être considérés comme normaux du point de vue sanitaire. *A fortiori*, leurs descendants, qui sont les seuls candidats pour la consommation humaine, peuvent être considérés comme une nourriture ne comportant pas plus de risque que les animaux témoins. Il paraît donc actuellement acceptable de considérer les produits issus des animaux clonés comme une variante des produits classiques (*new food*) plutôt que comme une nouvelle nourriture (*novel food*). Certains pays, notamment les États-Unis d'Amérique, préconisent pour ces raisons de ne pas faire de différence entre les animaux issus de clones et leurs homologues nés par reproduction sexuée.

La santé des animaux clonés est toutefois souvent altérée au début de leur vie. Il se pourrait donc qu'aucun d'entre eux ne soit normal au sens strict (13, 23, 37). Il paraît donc judicieux de poursuivre les observations des animaux clonés et surtout de leurs descendants jusqu'à la deuxième, voire la troisième génération, pour confirmer ces conclusions préliminaires. Ceci apporterait des arguments supplémentaires pour autoriser la mise sur le marché future des produits issus des animaux clonés. Ces observations doivent être de plusieurs ordres : état de santé général des animaux, performances zootechniques, susceptibilité vis-à-vis des maladies, mesure de la toxicité et de l'allergénicité des produits issus des animaux clonés, état de méthylation de certaines gènes. Une liste détaillée des paramètres qui devraient être examinés a été récemment proposée (24).

En ce qui concerne les animaux transgéniques, l'expérience qui s'accumule avec l'utilisation agroalimentaire de plantes génétiquement modifiées offre une panoplie d'observations intéressantes, en grande partie extrapolables aux animaux. Ces études ont révélé, entre autres, que les plantes transgéniques ne transmettaient ni leurs protéines (1), ni leurs gènes (18) aux animaux qui les consomment. Aucune des plantes transgéniques consommées depuis bientôt dix ans par des centaines de millions d'animaux d'élevage n'altère en quoi que ce soit leur santé.

La consommation des produits issus des animaux transgéniques a déjà fait l'objet d'un rapport de l'AFSSA en 1999 (31) et de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation mondiale de la santé en 2003 (20).

Les effets potentiels du clonage et de la transgénèse sur les consommateurs sont trop complexes pour être tous strictement révélés par les tests actuellement disponibles. Une surveillance reposant sur la traçabilité des produits s'impose, pour mettre en évidence *a posteriori* d'éventuelles corrélations entre la consommation de ces produits et la survenue de certaines pathologies chez les consommateurs.

Les tests actuellement en vigueur pour évaluer les risques potentiels de l'utilisation agroalimentaire des animaux clonés et transgéniques tendent à devenir plus nombreux et plus sophistiqués. Cette situation offre un contraste frappant avec les pratiques traditionnelles qui n'imposent pas ou très peu de tests pour évaluer les risques de la consommation des produits conventionnels, pourtant non dépourvus d'inconnues. Ce fait a retenu l'attention de certains experts de la NAS aux États-Unis d'Amérique. ■

Ceux-ci recommandent d'introduire progressivement un examen plus approfondi des produits conventionnels. Il se pourrait donc qu'à l'avenir, les tests imposés aux produits conventionnels aillent en augmentant, alors que ceux actuellement appliqués aux animaux clonés et transgéniques diminuent pour rejoindre le niveau des premiers.

Confinement and consumption of cloned and transgenic animals

L.-M. Houdebine & J.-P. Renard

Summary

Reproduction by cloning can eliminate some of the problems inherent to sexual reproduction, but it creates others. The genetic heritage of nucleus donor cells and the genetic status of clones are not precisely known. Furthermore, reprogramming of the genome of nucleus donor cells by the ovocyte cytoplasm is often incomplete. Animals obtained through cloning are thus essentially genetically identical to their genitors, but they are often epigenetically modified, with unpredictable effects. Transgenesis results in most cases from the addition to a genome of one or more known genes. The direct and indirect effects of transgenesis cannot all be predicted. Specific confinement measures make it possible to raise animals in high-security conditions, preventing their dissemination in the human food chain, in animal feed or in the environment. The toxicity, allergenicity and infectiousness of cloned or transgenic animals can be evaluated by means of tests.

Keywords

Breeding – Cloning – Confinement – Food safety – Transgenesis – Transgenic animal. ■

Confinamiento y consumo de animales clonados y transgénicos

L.-M. Houdebine & J.-P. Renard

Resumen

La reproducción por clonación elimina algunos de los problemas ligados a la reproducción sexual, pero a la vez plantea otras dificultades. No se conoce cabalmente el patrimonio genético de las células donantes de núcleo, como tampoco el estatuto genético de los clones resultantes. La reprogramación del nuevo genoma nuclear desde el citoplasma del ovocito suele ser incompleta, y por ello los animales obtenidos por clonación, aunque en esencia sean genéticamente idénticos a sus genitores, suelen presentar cambios epigenéticos, cuyos efectos por lo demás son imprevisibles. Lo más común es que la transgénesis se opere por agregación a un genoma de uno o varios genes conocidos. No siempre es posible predecir los efectos directos e indirectos de los transgenes. Para criar a los animales en condiciones de seguridad adecuadas e impedir la propagación de efectos indeseables en la cadena alimentaria humana o ganadera o en el medio natural, se requieren medidas específicas de confinamiento. Por otra parte, existen técnicas que permiten determinar la toxicidad, alergenicidad e infecciosidad de los animales obtenidos por clonación o transgénesis.

Palabras clave

Animal transgénico – Clonación – Confinamiento – Ganadería – Inocuidad de los alimentos – Transgénesis.



Références

1. Aumaître L.A. (2002). – Les aliments issus de plantes génétiquement modifiées : équivalence, efficacité et sécurité chez les animaux de ferme. *INRA Prod. anim.*, **15**, 97-108.
2. Barinaga M. (2002). – Cells exchanged during pregnancy live on. *Science*, **296**, 2169-2172.
3. Beaujean N., Taylor J., Gardner J., Wilmut I., Meehan R. & Young L. (2004). – Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, **71**, 185-193.
4. Bronson S.K., Plaehn E.G., Kluckman K.D., Hagaman J.R., Maeda N. & Smithies O. (1996). – Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **93**, 9067-9072.
5. Chavatte-Palmer P., Remy D., Cordonnier N., Richard C., Issenman H., Laigre P., Heyman Y. & Mialot J.P. (2004). – Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 94-100.
6. De Montera B., Boulanger L., Taourit S., Renard J.P. & Eggen A. (2004). – Genetic identity of clones and methods to explore DNA. *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 133-139.
7. Ellis S.A. (2004). – Immune status: normal expression of MHC class I in the placenta and what is expected in clones. *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 121-125.
8. Fulka J. Jr, Miyashita N., Nagai T. & Ogura A. (2004). – Do cloned mammals skip a reprogramming step? *Nature Biotechnol.*, **22**, 25-26.
9. Heyman Y., Richard C., Rodriguez-Martinez H., Lazzari G., Chavatte-Palmer P., Vignon X. & Galli C. (2004). – Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 111-120.
10. Hiendleder S., Bebbere D., Zakhartchenko V., Reichenbach H.D., Wenigerkind H., Ledda S. & Wolf E. (2004). – Maternal-fetal transplacental leakage of mitochondrial DNA in bovine nuclear transfer pregnancies: potential implications for offspring and recipients. *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 150-156.
11. Houdebine L.M. (2003). – Animal transgenesis and cloning. Wiley and Sons, Chichester, 234 pp.

12. International Council for Science (ICSU) (2003). – New genetics and agriculture: scientific discoveries – society dilemmas (G.J. Persley, édit.). The Doyle Foundation for International Council for Science, 56 pp. (http://www.icsu.org/Gestion/img/ICSU_DOC_DOWNLOAD/90_DD_FILE_ICSU_GMO%20report_May%202003.pdf, page consultée le 4 avril 2005).
13. Jouneau A. & Renard J.P. (2003). – Reprogramming in nuclear transfer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 486-491.
14. Kubota C., Tian X.C. & Yang X. (2004). – Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnol.*, **22**, 693-694.
15. Kuroiwa Y., Kasinathan P., Matsushita H., Sathiyaselan J., Sullivan E.J., Kakitani M., Tomizuka K., Ishida I. & Robl J.M. (2004). – Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-micro and prion protein in cattle. *Nature Genet.*, **7**, 671-672.
16. Lane N., Dean W., Erhardt S., Hajkova P., Surani A., Walter J. & Reik W. (2003). – Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*, **35**, 88-93.
17. National Academy of Sciences (NAS) (2002). – Animal biotechnology. Science-based concerns. National Academies Press, Washington, DC, 201 pp.
18. Netherwood T., Martin-Orue S.M., O'Donnell A.G., Gockling S., Graham J., Mathers J.C. & Gilbert H.J. (2004). – Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnol.*, **22**, 204-209.
19. Norman H.D. & Walsh M.K. (2004) – Performance of dairy cattle clones and evaluation of their milk composition. *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 157-164.
20. Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)/Organisation mondiale de la santé (OMS) (2003). – Expert consultation on the safety assessment of foods derived from genetically modified animals. FAO Food and Production Papers no. 79. FAO, Rome, 47 pp.
21. Pearson H. (2002). – Dual identities. *Nature*, **417**, 10-11.
22. Pew Initiative (2002). – Animal cloning and the production of food products. Perspectives from the food chain. September 26, 2002. Pew Initiative, Dallas (<http://pewagbiotech.org/events/0924/>, page consultée le 4 avril 2005).
23. Rhind S.M., Taylor J.E., De Sousa P.A., King T.J., McGarry M. & Wilmut I. (2003). – Human cloning: can it be made safe? *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 855-864.
24. Rudenko L., Matheson J.C., Adams A.L., Dubbin E.S. & Grenlees K.J. (2004). – Food consumption risks associated with animal clones: what should be investigated? *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 79-93.
25. Santos F., Zakhartchenko V., Stojkovic M., Peters A., Jenuwein T., Wolf E., Reik W. & Dean W. (2003). – Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.*, **13**, 1116-1121.
26. Seamark D.A., Backhouse S.N. & Powell R. (2003). – Field-testing and validation in a primary care setting of a point-of-care test for C-reactive protein. *Ann. clin. Biochem.*, **40**, 178-180.
27. Shiels P.G. & Jardine A.G. (2003). – Dolly, no longer the exception: telomeres and implications for transplantation. *Cloning Stem Cells*, **5** (2), 157-160.
28. Takahashi S. & Ito Y. (2004). – Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 165-171.
29. Takeda K., Akagi S., Kaneyama K., Kojima T., Takahashi S., Imai H., Yamanaka M., Onishi A. & Hanada H. (2003). – Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Molec. Reprod. Dev.*, **64**, 429-437.
30. Tamashiro K.L., Wakayama T., Akutsu H., Yamazaki Y., Lachey J.L., Wortman M.D., Seeley R.J., D'Alessio D.A., Woods S.C., Yanagimachi R. & Sakai R.R. (2002). – Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nature Med.*, **8**, 262-267.
31. Thibier M. (1999). – Biotechnologie de la reproduction animale et sécurité sanitaire des aliments. Rapport de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA). AFSSA, Maisons-Alfort, 117 pp.
32. Tome D., Dubarry M. & Fromentin G. (2004). – Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cells*, **6** (2), 172-177.
33. Van Reenen C.G., Meuwissen T.H., Hopster H., Oldenbroek K., Kruip T.H. & Blokhuis H.J. (2001). – Transgenesis may affect farm animal welfare: a case for systematic risk assessment. *J. Anim. Sci.*, **79**, 1763-1779.
34. Wakayama T. (2004). – On the road to therapeutic cloning. *Nature Biotechnol.*, **22**, 399-400.
35. Walsh M.K., Lucey J.A., Govindasamy-Lucey S., Pace M.M. & Bishop M.D. (2003). – Comparison of milk produced by cows cloned by nuclear transfer with milk from non-cloned cows. *Cloning Stem Cells*, **5** (3), 213-219.
36. Wells D.N., Forsyth J.T., McMillan V. & Oback B. (2004). – The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells*, **6**, 110.
37. Wilmut I. (2002). – Are there any normal cloned mammals? *Nature Med.*, **8**, 215-216.