



Evaluation des risques relatifs à la consommation de produits alimentaires composés ou issus d'organismes génétiquement modifiés

JANVIER 2002

SOMMAIRE

PREAMBULE -----	5
LA SAISINE ET SON CONTEXTE -----	7
1 Définitions -----	7
2 Les OGM autorisés -----	7
3 la réglementation des OGM -----	8
4 Les lignes directrices européennes et internationales pour l'évaluation de l'innocuité des OGM et des produits issus d'OGM destinés à la consommation humaine et animale avant leur mise sur le marché -----	8
5 Equivalence substantielle-----	9
METHODOLOGIE -----	10
LES QUESTIONS	
QUESTION 1	
QUELS SONT LES POINTS SENSIBLES DE L'EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES LIES A LA CONSOMMATION HUMAINE ET ANIMALE D'OGM OU DE PRODUITS QUI EN SONT ISSUS ET QUELS SONT LES ELEMENTS PERTINENTS DE CETTE EVALUATION ? -----	11
1 Informations relatives à la modification génétique et à la plante génétiquement modifiée -----	12
2 Informations relatives à l'analyse du produit fini -----	12
2.1 Provenance des plantes génétiquement modifiées soumises à l'évaluation -----	13
2.2 Essai de toxicité subchronique sur animaux de laboratoire avec le produit d'expression du gène -----	13
2.3 Evaluation sur animal de la tolérance au produit fini, obtenu à partir de la plante génétiquement modifiée -----	15
2.4 Dégradation dans le tube digestif-----	17
2.5 Evaluation du pouvoir allergénique -----	17
3 Limites des essais -----	20
3.1 Limites liées à la mise en œuvre de nouvelles techniques encore au stade de la recherche -----	20
3.2 Limites liées à la faisabilité de certains essais-----	20
3.3 Limites liées au principe même de l'évaluation des effets à long terme, quelle que soit l'innovation technologique, par une extrapolation des essais à court terme -----	21
4 Evaluation des risques après la mise sur le marché-----	22

QUESTION 2

QUELS SONT LES RISQUES LIES A LA CONSOMMATION HUMAINE ET ANIMALE D'OGM

CONTENANT DES GENES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ?-----23

- A Quelles sont les conditions d'utilisation de gènes de résistance dans les plantes génétiquement modifiées ?----- 23
- B Quelles sont les conditions du transfert d'un gène d'une plante à une bactérie ? Bien que ce transfert n'ait jamais été observé, est-il envisageable ?----- 24
- C Quelle est la contribution du réservoir naturel de gènes de résistance aux antibiotiques au développement et/ou à la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques ?----- 25
- D L'utilisation massive d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire crée une pression de sélection en faveur de bactéries ayant acquis des gènes de résistance. Un élargissement possible du spectre de résistance au cours des transferts successifs de gènes doit-il être pris en considération ?----- 25
- E Quel risque supplémentaire apporterait la transgénèse végétale par rapport à la situation actuelle au regard du développement des résistances aux antibiotiques constaté ?-----26

CONCLUSIONS-----28

ANNEXE 1 : Puissance du test statistique des essais sur animaux cibles dans le cadre de l'évaluation des risques liés à la consommation d'OGM ----- 33

ANNEXE 2 : Bibliographie----- 38

ANNEXE 3 : Personnes ayant contribué à l'élaboration de cet avis -----40

PREAMBULE

L'évaluation et la maîtrise des risques liés à l'utilisation des Organismes génétiquement modifiés (OGM) intéressent l'ensemble de la société. En introduction aux recommandations nécessairement très techniques contenues dans ce rapport, il est donc opportun de rappeler quelques éléments permettant de replacer la question posée dans son contexte scientifique et historique. L'utilisation d'OGM recouvre une multitude de situations différentes allant d'une recherche en amont de toute application à la commercialisation de plantes de grande consommation. L'attention du public porte surtout sur les variétés de plantes transgéniques destinées à l'alimentation animale ou humaine, mais les OGM touchant la vie quotidienne de chacun d'entre nous peuvent également être des microorganismes (utilisés dans un processus industriel ou dans la production de médicaments) ou, dans un avenir prévisible, des animaux domestiques. Par ailleurs, la distinction entre les OGM eux-mêmes et les produits alimentaires transformés qui en sont issus est essentielle sur le plan de l'évaluation des risques

Contexte

- Les premiers OGM ont été obtenus en laboratoire dans les années 70. Il s'agissait de microorganismes (bactéries, levures...), puis d'animaux (1980) et de plantes (1983) transgéniques. Très tôt a été élaboré un ensemble cohérent de réglementations tant pour les expérimentations en laboratoire que pour la dissémination des OGM et a été mis en place un système d'évaluation et de maîtrise des risques qui s'est avéré opérant jusqu'à ce jour. Aujourd'hui, l'utilisation d'OGM est une pratique quotidienne et banale dans la plupart des laboratoires de recherche biologique et médicale mais elle est soumise à l'évaluation d'une instance scientifique spécialisée, la Commission du Génie Génétique (CGG).
- Avec l'utilisation en agriculture de plantes obtenues par transgénèse, c'est l'ensemble des consommateurs qui est en contact avec des OGM, ou peut consommer des produits alimentaires ou industriels issus d'OGM. Un tournant avait d'ailleurs déjà été pris dans les années 80, avec les premiers médicaments obtenus par transgénèse (l'insuline humaine et l'hormone de croissance maintenant issues d'OGM qui offrent dans ces conditions spécificité, qualité et sécurité). A la même époque la lutte antirabique a fait usage (avec un succès considérable conduisant à une quasi-éradication de la rage) de vaccins appâts issus d'OGM et disséminés à grande échelle sur une partie du territoire français. Il y a désormais une exigence d'information (notamment au niveau de l'étiquetage des produits) qui est à l'origine d'un débat intense sur l'innocuité des OGM et des produits qui en sont issus.
- La dissémination volontaire des OGM est strictement encadrée en France, où elle est soumise à autorisation, après consultation et évaluation par la Commission du Génie Biomoléculaire (CGBM), dans un cadre réglementaire européen bien défini. La méfiance, voire l'hostilité de l'opinion sont malgré tout patentées, surtout en ce qui concerne les plantes transgéniques. De fait, si certaines sont "juridiquement" commercialisables en Europe, leur culture est réduite à quelques milliers d'hectares et des plantes comme le colza et la betterave font toujours l'objet d'un moratoire strict. Le contraste est saisissant avec l'agriculture nord-américaine (EU, Canada), où les cultures transgéniques comptent des dizaines de millions d'hectares.

Nature et maîtrise du risque dans le domaine de la sécurité alimentaire pour les végétaux transgéniques

Dans les conditions actuelles d'obtention des OGM végétaux, les dangers objectifs et potentiels, concernant la sécurité sanitaire des aliments, peuvent naître essentiellement des faits suivants :

- 1) une plante transgénique peut synthétiser une protéine étrangère qui pourrait produire des effets toxiques aigus ou à long terme et/ou des effets allergéniques ;
- 2) l'extinction de gènes ou l'expression de séquences silencieuses propres au génome de la plante d'origine pourrait conduire à un effet inattendu. Dans le cas des plantes transgéniques, l'insertion du transgène pourrait induire de tels phénomènes dans la plante transformée ;
- 3) les interactions métaboliques, discrètes ou non, pourraient faire apparaître des métabolites non prévisibles et toxiques.

Seul, le premier danger potentiel est spécifique des plantes transgéniques ; les dangers 2 et 3 concernent aussi les plantes issues de l'application des méthodes de sélection classique de croisement , notamment lors de croisements entre espèce.

Ces phénomènes peuvent ou non se manifester et donc se traduire en risques objectifs ou potentiels.

Les risques objectifs (protéine toxique par exemple) et les risques potentiels (ceux mentionnés aux points 2 et 3 qui ne peuvent être que rarement définis *a priori*) impliquent, pour garantir la sécurité des consommateurs, la mise en oeuvre d'un ensemble de protocoles expérimentaux d'évaluation quelle que soit le niveau de la toxicité et/ou allergénicité potentielles à court et long terme.

LA SAISINE ET SON CONTEXTE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été saisie le 22 octobre 1999 par les ministres chargé de la santé, de l'agriculture et de la consommation d'une demande d'avis sur les risques relatifs à la consommation de produits alimentaires composés ou issus d'organismes génétiquement modifiés (OGM).

Cette saisine identifie deux questions à traiter :

Question 1 : Quels sont les points sensibles de l'évaluation des risques sanitaires liés à la consommation humaine et animale d'OGM ou de produits qui en sont issus et quels sont les éléments pertinents de cette évaluation ?

Question 2 : Quels sont les risques liés à la consommation humaine et animale d'OGM contenant des gènes de résistance aux antibiotiques ?

Cette demande d'avis concerne l'ensemble des produits alimentaires génétiquement modifiés d'origine animale ou végétale et les microorganismes. Dans la mesure où aucun animal ou microorganisme génétiquement modifié n'est actuellement sur le marché, même si des discussions sont en cours dans les instances européennes ou internationales visant à déterminer des critères d'évaluation pour ces organismes, l'avis ne portera que sur les plantes et les produits qui en sont issus.

1 DEFINITIONS

Organisme

Toute entité biologique capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique (cf directive 2001/18/CE) [3].

Organisme génétiquement modifié (OGM)

Organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle (cf directive 2001/18/CE).

Aux fins de la directive 2001/18/CE :

- a) la modification génétique se fait au moins par l'utilisation des techniques énumérées à l'annexe IA, première partie ;
- b) les techniques énumérées à l'annexe IA, deuxième partie, ne sont pas considérées comme entraînant une modification génétique.

Produit issu d'OGM

Aliment et ingrédient alimentaire produits à partir d'organismes génétiquement modifiés au sens de la directive 2001/18/CE.

2 LES OGM AUTORISES EN FRANCE

A ce jour, seulement quatre événements de transformation végétale sont autorisés pour toute utilisation (culture, importation et transformation industrielle) :

- le tabac " ITB-1000-0X " tolérant à un herbicide, mais dont la commercialisation n'a pas été développée ;

- le maïs Bt-176 résistant à la pyrale et tolérant à un herbicide ;
- le maïs MON 810 résistant à la pyrale ;
- le maïs T 25 tolérant à un herbicide.

Deux évènements de transformation végétale sont autorisés seulement à l'importation en vue de leur transformation industrielle (leur culture n'est donc pas autorisée en Europe).

- le soja 40-3-2 tolérant à un herbicide;
- le maïs BT-11 résistant à la pyrale et tolérant à un herbicide.

Concernant les produits issus de plantes génétiquement modifiées, entre 1997 et 1999, 11 aliments ou ingrédients alimentaires pour la consommation humaine ont été mis sur le marché selon une procédure simplifiée telle que prévue par le règlement (CE) n°258/97 [2] : huiles de colza et ingrédients (farine, semoule, amidon, gluten, glucose, huile) obtenus à partir de maïs¹.

3 LA REGLEMENTATION DES OGM

La mise sur le marché des OGM et des produits issus d'OGM est soumise à **autorisation expresse**, accordée **au cas par cas** au niveau européen.

Lorsqu'il s'agit d'OGM vivants destinés à être cultivés (dissémination) sur le territoire français ou européen, que ce soit en recherche ou à des fins de production pour la consommation humaine ou animale, l'autorisation est accordée sur le fondement d'un dossier technique permettant d'évaluer les risques pour la santé publique et pour l'environnement liés à la dissémination de cet OGM. Cette autorisation est régie par la directive 90/220/CEE [1] qui sera abrogée le 17 octobre 2002 et remplacée par la directive 2001/18/CE.

Lorsqu'il s'agit d'aliments ou d'ingrédients alimentaires composés d'OGM ou issus d'un OGM (exemple : lécithine de soja), l'autorisation de mettre sur le marché ces produits (cultivés sur le territoire européen ou importés dans la Communauté) ou de les utiliser en vue de leur transformation industrielle pour la consommation humaine est accordée sur le fondement d'un dossier technique permettant d'évaluer les risques pour la santé publique conformément au règlement (CE) n°258/97.

La mise sur le marché d'OGM destinés à la consommation animale relève actuellement de la directive 90/220/CEE. La Commission Européenne, conformément à ses engagements pris dans le Livre Blanc sur la sécurité alimentaire [4], a soumis au Conseil et au Parlement européen le projet d'un nouveau règlement qui couvrira la mise sur le marché de l'ensemble des OGM ou produits issus d'OGM destinés à la consommation humaine ou animale.

4 LES LIGNES DIRECTRICES EUROPEENNES ET INTERNATIONALES POUR L'EVALUATION DE L'INNOCUITE DES OGM ET DES PRODUITS ISSUS D'OGM DESTINES A LA CONSOMMATION HUMAINE ET ANIMALE AVANT LEUR MISE SUR LE MARCHE

La directive 90/220/CEE (2001/18/CE) et le règlement (CE) n°258/97 définissent les éléments qui doivent figurer dans un dossier d'autorisation de mise sur le marché ainsi que, dans le cas du règlement, un guide à l'usage de l'évaluateur [5].

Les Comités scientifiques spécialisés proposent, à la demande de la Commission Européenne des lignes directrices à l'intention des pétitionnaires qui précisent les éléments techniques à faire figurer dans les dossiers pour permettre l'évaluation des OGM ou des produits issus d'OGM pour l'alimentation humaine et l'alimentation animale.

¹ Sur son site internet : www.finances.gouv.fr/ogm/ « les OGM en questions » la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes présente la liste des OGM et produits issus d'OGM autorisés.

Au plan international, le Codex alimentarius a également élaboré un projet de lignes directrices pour l'évaluation des dossiers OGM (Guideline for the conduct of safety assessment of foods derived from modified plants), en se fondant, notamment, sur la consultation FAO/OMS d'experts internationaux (Safety aspects of genetically modified foods of plant origin).

5 EQUIVALENCE SUBSTANTIELLE

L'OCDE a développé initialement le concept d'équivalence en substance pour les nouveaux aliments, qui a été repris par la FAO/OMS et par le règlement sur les nouveaux aliments.

Le **concept d'équivalence substantielle**², caractérise une approche qui vise à comparer les caractéristiques analytiques d'un nouveau produit (alimentaire) avec celles d'un produit "conventionnel"³ (pour une plante OGM, par rapport à la lignée parentale de la même plante non modifiée). L'application de ce concept ne constitue pas une preuve définitive de l'innocuité d'un nouveau produit ; le résultat de la comparaison est un des éléments de l'évaluation de risques d'un produit issu d'OGM ou en contenant.

Trois scénarios peuvent être envisagés :

- l'équivalence substantielle peut être établie ; dans ce cas, il n'est pas nécessaire de faire d'autres essais que ceux réalisés sur la protéine introduite par transformation génétique ;
- l'équivalence substantielle peut être établie à partir de la composition en nutriments et en facteurs anti-nutritionnels éventuels sauf en ce qui concerne le ou les nouveaux éléments introduits ; l'évaluation de la sécurité doit alors se focaliser sur les caractéristiques de ce ou ces nouveaux éléments ;
- l'équivalence substantielle ne peut pas être établie ; le nouveau produit doit alors être soumis à une évaluation approfondie de la sécurité.

Dans le cas d'un OGM, du fait de l'introduction, de la modification ou de la suppression d'un caractère, l'organisme résultant est *a priori* différent ; l'évaluation du risque sur la seule démonstration de l'équivalence substantielle n'est donc pas suffisante et ne permet pas de s'exonérer de l'évaluation de la sécurité de tels produits.

Il convient de noter que cette notion d'équivalence substantielle pour les OGM étant très controversée au sein de l'Union européenne, le projet de nouveau règlement relatif aux aliments génétiquement modifiés destinés à l'homme et à l'animal prévoit de supprimer la procédure simplifiée du règlement (CE) n°258/97.

² **Equivalence substantielle** : La notion d'équivalence substantielle exprime l'idée que les organismes existants qui sont utilisés en tant qu'aliments ou source d'aliments peuvent servir de base à une comparaison lors de l'évaluation de l'innocuité d'un aliment nouveau ou modifié. (*Recommandation de la Commission relative au règlement (CE) n°258/97*).

³ **Conventional counterpart** : a related plant variety that has a history of safe use for consumption as food. (Document du Codex – Guideline for the conduct of safety assessment of foods derived from modified plants).

METHODOLOGIE

Pour traiter cette saisine, l'Afssa s'est appuyée sur des groupes de travail nommés auprès du comité d'experts spécialisé Biotechnologie, et sur la consultation d'experts. L'ensemble des personnes ayant contribué à l'élaboration ou à la validation de cet avis figurent dans la liste qui constitue l'annexe 3.

LES QUESTIONS

Question 1 : Quels sont les points sensibles de l'évaluation des risques sanitaires liés à la consommation humaine et animale d'OGM ou de produits qui en sont issus et quels sont les éléments pertinents de cette évaluation ?

Toute modification d'un aliment est susceptible d'avoir des répercussions éventuelles directes sur la sécurité du consommateur via l'aliment lui-même ou indirectes via les produits provenant d'animaux ayant ingérés des OGM. Il convient donc, avant la mise sur le marché d'un nouvel aliment issu ou composé d'OGM, de s'assurer de son innocuité.

Aucun animal⁴ ou microorganisme génétiquement modifié n'est actuellement sur le marché, les éléments d'évaluation développés ci-dessous ne porteront que sur les plantes et les produits qui en sont issus.

Etant donné la très grande diversité des produits, et de leurs applications, qui existent actuellement ou qui peuvent être envisagés, le principe retenu est celui d'une évaluation de l'innocuité de ces produits au cas par cas. Cette évaluation est fondée sur :

- l'analyse de la modification génétique,
- l'analyse du produit fini par :
 - la caractérisation physico-chimique et fonctionnelle des produits d'expression des transgènes et l'évaluation toxicologique,
 - l'identification des effets éventuels non intentionnels ou inattendus induits par la modification génétique et leur répercussion sur la sécurité du produit,
 - la composition chimique et la valeur nutritionnelle.

La réflexion scientifique conduite au sein de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été centrée sur les points sensibles de l'évaluation de l'innocuité des OGM ou des produits qui en sont issus, destinés à la consommation humaine et animale, au regard des dispositions réglementaires prévues par la directive 90/220/CEE (ou 2001/18/CE) (Annexe III) et le règlement (CE) n°258/97 (Recommandations de la Commission du 29 juillet 1997) et des projets de révision des lignes directrices européennes ou internationales (Codex alimentarius).

Au regard des informations qui doivent figurer dans un dossier avant la mise sur le marché d'une nouvelle plante génétiquement modifiée ou d'un produit qui en est issu, destinés à la consommation humaine ou animale, les informations relatives à la **modification génétique**, d'une part, les informations **toxicologiques et relatives à l'évaluation du pouvoir allergène**, d'autre part, sont essentielles pour établir l'innocuité *a priori* d'un nouvel aliment. L'intérêt de disposer d'informations sur les effets des produits des transgènes ou de la plante génétiquement modifiée dans le tube digestif sera rappelé pour mémoire.

⁴ Concernant les risques susceptibles de résulter de la consommation d'animaux ou de produits animaux dérivés des biotechnologies, se reporter au colloque organisé par l'Afssa le 29 septembre 1999 sur "Biotechnologies de la reproduction animale et sécurité alimentaire des aliments".

Pour quelques uns de ces points sensibles, l'Afssa a identifié un certain nombre de données actuellement manquantes ou insuffisamment documentées qui peuvent aider à affiner l'évaluation de la sécurité alimentaire des OGM ou des produits qui en sont issus avant leur mise sur le marché.

La mise en œuvre des essais évoqués dans cet avis est à documenter au cas par cas en tenant compte de la modification génétique introduite, de la nature de la protéine exprimée et d'éventuelles spécificités propres à l'OGM considéré.

1 INFORMATIONS RELATIVES A LA MODIFICATION GENETIQUE ET A LA PLANTE GENETIQUEMENT MODIFIEE

La mise sur le marché d'une nouvelle plante génétiquement modifiée (plantes GM) implique la constitution d'un dossier comportant un ensemble d'informations relatif à la modification génétique et à la plante génétiquement modifiée. Ces informations concernent la description des méthodes utilisées pour obtenir la modification génétique, la nature et la source du vecteur utilisé, la taille et la source du fragment d'ADN inséré (insert), la description du ou des caractères introduits ou modifiés, la séquence de l'ADN réellement inséré ou supprimé (nombre de copies, localisation dans les cellules de la plante, expression).

Il apparaît que les données habituellement fournies dans les dossiers décrivant les séquences d'ADN insérées ou supprimées devraient être complétées par la séquence⁵ du transgène et des régions faisant la jonction avec le génome.

Ces données supplémentaires permettraient en effet :

- de vérifier si le fragment inséré est bien identique à celui qui avait été introduit dans le vecteur transformant ;
- d'examiner l'environnement du gène inséré ;
- de localiser l'insert dans le génome de la plante.

2 INFORMATIONS RELATIVES A L'ANALYSE DU PRODUIT FINI

Le dossier de demande de mise sur le marché d'un nouvel aliment, au titre du règlement (CE) n°258/97, doit contenir les informations suivantes : spécification du nouvel aliment, effet éventuel du procédé d'obtention de l'aliment, utilisation de l'organisme d'origine, niveaux de consommation et types d'utilisation prévus, propriétés nutritionnelles et toxicologiques.

Concernant plus particulièrement la toxicité éventuelle, les méthodes classiques d'évaluation de la toxicité des médicaments ou des produits chimiques ne sont pas en principe applicables pour les aliments, *a priori* dénués de pouvoir toxique.

Cependant, il convient de s'assurer de l'absence de toxicité des produits par les mesures suivantes :

- des essais de toxicité subchronique sur animaux de laboratoire avec le produit d'expression du gène. Ces essais pourront apporter des informations sur les effets potentiellement toxiques dus à la modification génétique ;
- des essais de tolérance sur animaux de laboratoire et des essais complémentaires de tolérance, d'alimentarité et de digestibilité sur animaux cibles avec des parties de la plante et ses produits dérivés destinés à la consommation. Ces essais pourront apporter des informations sur les conséquences potentielles d'une consommation répétée d'un produit par l'homme ou l'animal.

⁵ Afin de faciliter la comparaison des séquences fournies avec des bases de données, il serait souhaitable de mettre à la disposition de l'évaluateur ces séquences sur support informatique.

De plus, toute modification génétique peut influencer sur la synthèse de facteurs anti-nutritionnels ou de substances toxiques naturellement présentes dans la plante. Des études de tolérance chez l'animal de laboratoire et sur l'animal cible devraient permettre de révéler la présence de facteurs potentiellement néfastes.

Ces deux approches complémentaires, essais de tolérance sur animal de laboratoire et essais d'alimentarité sur animaux cibles, comportent cependant chacune des contraintes ou des difficultés techniques : préparation de matériel à tester en quantité suffisante pour une expérimentation animale pendant de longues périodes, choix judicieux de l'échantillonnage, interprétation statistique des tests de tolérance et coût au regard de la balance bénéfice-risque.

2.1 Provenance des plantes génétiquement modifiées soumises à l'évaluation

Il importe que l'évaluation de la sécurité d'une nouvelle plante génétiquement modifiée, ou d'un nouveau produit qui en est issu, se fasse toujours par comparaison avec la plante, ou ses produits, constituant un référentiel approprié (produit isogénique apparenté ou variété conventionnelle).

Compte tenu de l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance végétale, cette évaluation doit porter sur des plantes cultivées pendant au moins deux saisons dans des sites différents et représentatifs de divers environnements.

2.2 Essai de toxicité subchronique sur animaux de laboratoire avec le produit d'expression du gène

2.2.1 Origine des produits des gènes utilisés pour l'évaluation de la sécurité alimentaire

Lorsqu'il est difficile ou impossible d'obtenir une quantité suffisante du produit d'un gène à l'état pur à partir de la plante elle-même, il est nécessaire de cloner le gène dans un microorganisme qui exprimera ce produit de gène. Toutefois, le risque réside en ce que le produit ainsi obtenu ne soit pas rigoureusement identique à celui synthétisé par la plante.

Il convient donc de connaître et de comparer systématiquement les **modifications post-traductionnelles** du produit du gène provenant de la plante et du microorganisme :

- le produit de gène extrait de la plante (à partir de plantes cultivées en serre) et celui extrait du microorganisme dans lequel le gène a été cloné devraient être analysés et comparés (poids moléculaire, données de séquence en acides aminés, glycosylation, équivalence immunologique, activité biologique et sensibilité aux protéases en milieu digestif simulé).
- La détermination par western blot du poids moléculaire du produit du ou des gènes insérés pourrait être complétée, lorsque cela est possible, par une analyse par spectrométrie de masse qui permettrait de mettre en évidence une éventuelle modification post traductionnelle.

2.2.2 Evaluation de la toxicité subchronique du produit de gène sur animal de laboratoire (rat, souris, cobaye)

Limite des essais de toxicité aiguë par administration unique

A quelques exceptions près, les seuls éléments disponibles relatifs à la toxicité ont été obtenus par des administrations uniques (toxicité aiguë) à des animaux de laboratoire, réalisées avec la protéine purifiée.

En 1997-1999, dans le cadre de leurs réflexions pour la mise sur le marché de nouveaux aliments destinés à l'alimentation animale et humaine, les experts de la CIIAA⁶ et du CSHPF⁷ évoquaient l'importance des essais de toxicité à plus long terme sur animal de laboratoire afin de mettre en évidence des effets délétères potentiels sur les systèmes vitaux, notamment immunitaire et reproducteur.

Difficultés de la mise en œuvre d'un essai de toxicité subchronique dans le cas des plantes

Au regard de ce qui est fait pour les médicaments et les enzymes utilisés en alimentation humaine ou animale, une toxicité subchronique pourrait être envisagée sur animal de laboratoire (rat, souris, cobaye). Toutefois, on se heurte à certaines difficultés dans le cas des plantes :

- le produit du gène n'est pas consommé à l'état pur mais avec d'autres composants de la plante,
- il peut être difficile d'obtenir des quantités suffisantes du produit du gène (voir 2.2.1) et de s'assurer que la préparation soumise à l'essai après extraction est bien équivalente à celle qui sera effectivement consommé,
- l'administration d'une dose suffisamment élevée doit respecter l'équilibre alimentaire de l'animal.

Éléments sur lesquels fonder le choix de la durée de l'essai

a) Administration orale répétée pendant 28 jours

Certains experts estiment que la durée minimale d'exposition pour mettre en évidence des effets sur les organes sexuels chez le rat est de 28 jours, du fait notamment des caractéristiques du cycle de maturation des gamètes.

Une étude de toxicité de 28 jours est généralement considérée comme préliminaire à une étude à long terme. Elle est acceptable lorsque le produit bénéficie déjà d'un historique et donc de données bibliographiques et/ou de pharmacovigilance attestant de sa bonne tolérance. Le corollaire de cette durée d'exposition courte est l'utilisation de doses fortes, qui peuvent être atteintes avec les médicaments ou les produits chimiques, mais pas avec un aliment. Celui-ci constitue généralement plus de 50 % de la ration, si l'on veut strictement respecter l'équilibre nutritionnel de l'animal.

b) Administration orale répétée pendant 3 ou 6 mois

Le fait que l'exposition animale ou humaine aux OGM soit chronique, impose que l'on procède à des expositions, elles aussi, de type chronique. La durée d'exposition de 3 mois paraît être un bon compromis entre une étude de toxicité de 28 jours et une étude de 6 mois. Elle permet en effet de révéler, avec une meilleure probabilité, des effets potentiels sur les systèmes vitaux, notamment immunitaires, hormonaux et reproducteurs et de possibles effets liés à des phénomènes d'accumulation. C'est par ailleurs la durée d'exposition recommandée et habituellement suivie pour l'évaluation de la sécurité des enzymes utilisées comme auxiliaires technologiques en alimentation humaine ou comme additifs en alimentation animale.

Protocole retenu pour l'évaluation de la toxicité subchronique du produit de gène sur animal de laboratoire (rat, souris, cobaye)

- Durée d'exposition : 90 jours

Cette étude vise à mettre en évidence de potentiels effets délétères sur le développement d'organes ou systèmes vitaux lors d'une exposition à long terme. Une durée d'exposition de 90 jours paraît appropriée.

⁶ CIIAA : Commission interministérielle et interprofessionnelle de l'alimentation animale

⁷ CSHPF : Comité supérieur d'hygiène publique de France

- **Détermination des doses**

Afin d'exposer l'animal à des doses qui reflèteront ce qui peut être consommé par l'homme, et pour éviter d'éventuels effets additionnels de carence alimentaire, il convient d'établir les doses à administrer, en tenant compte de l'équilibre nutritionnel de l'animal, la dose la plus élevée ne devant pas dépasser l'apport protéique global, soit environ 15% du régime alimentaire de l'animal.

Le produit de gène peut être obtenu à partir d'un microorganisme dans lequel le gène a été cloné ou à partir de la plante. Dans les deux cas, il convient de vérifier sa pureté et son identité (voir 2.2.1).

- **Observations et type d'examen à pratiquer**

Pour connaître la liste des observations cliniques, des organes à examiner et des examens histopathologiques à pratiquer, on pourra se référer aux protocoles publiés comme la méthode d'essai B.26 de la directive 67/548/CEE [6] ou la ligne directrice de l'OCDE n° 408 [7] pour l'évaluation des produits chimiques.

2.3 Evaluation sur animal de la tolérance au produit fini, obtenu à partir de la plante génétiquement modifiée

L'objectif de ces études, réalisées avec le produit OGM ou issu d'OGM (parties de la plante ou produits dérivés destinés à la consommation), **d'abord sur animal de laboratoire, puis éventuellement sur animal cible** est de mettre en évidence des effets potentiels d'une consommation régulière d'un produit par l'homme ou l'animal, et des effets toxiques inattendus ou non intentionnels qui ne se seraient pas révélés dans les études de toxicité aiguë ou subchronique.

Les essais sur animal cible, c'est à dire sur au moins une espèce d'animaux de ferme (monogastriques, ruminants), consommateurs habituels des produits désignés apparaissent nécessaires en raison :

- de la sensibilité différente des espèces à certains facteurs anti-nutritionnels, hormonomimétiques, etc et aux particularités de leur physiologie digestive ;
- du fait que leur ration peut contenir jusqu'à 90 % de la plante génétiquement modifiée durant la vie entière de l'animal ;
- du métabolisme particulier de certains animaux et du risque de stockage éventuel de produits potentiellement toxiques dans certains organes et tissus spécifiques (le foie par exemple).

2.3.1 Etude sur animal de laboratoire de la toxicité/tolérance des parties de la plante destinées à la consommation ou de leurs produits dérivés

Il convient que ces essais soient réalisés, conformément aux recommandations classiques qui s'appliquent aux études de toxicité des substances médicamenteuses, sur des animaux de laboratoire, en principe des rongeurs, pendant 90 jours, avec des lots d'animaux jeunes composés de 10 animaux de chaque sexe. Les animaux devront être nourris individuellement. La dose devra être la plus élevée possible en restant compatible avec l'équilibre nutritionnel de l'animal.

Les observations cliniques et la liste des organes à examiner sont les mêmes que ceux retenus dans l'essai de toxicité subchronique. En cas d'anomalies observées à l'autopsie, il conviendra de pratiquer un examen histopathologique. Seront également déterminés le taux de croissance et la consommation de nourriture des animaux ainsi que la mortalité éventuelle (cause identifiée à l'autopsie).

Selon le type d'aliment à évaluer, l'essai sur animal de laboratoire pourra être remplacé par un essai sur des lapins (durée de l'essai : du sevrage jusqu'à l'abattage) ou des poulets (durée de l'essai : de 1 jour jusqu'à l'abattage).

2.3.2 Etude de tolérance, d'alimentarité et de digestibilité sur animal cible des parties de la plante destinées à la consommation ou de leurs produits dérivés

Depuis 1995, bien que ce type d'essai ne soit pas inclus dans le dossier type d'évaluation pour la mise sur le marché des OGM, plusieurs études expérimentales ont été réalisées sur animaux de ferme (bovins, vaches laitières, moutons, poulets, porcs) visant à évaluer l'innocuité des produits génétiquement modifiés pour les animaux et l'homme [30-33]. Les points suivants ont été considérés :

- la composition chimique de ces nouveaux aliments : teneurs en protéines et acides aminés, lipides et acides gras, minéraux, vitamines, ADF⁸, NDF⁹, facteurs anti-nutritionnels connus ;
- le devenir des produits génétiquement modifiés dans les aliments des animaux lors de leur transformation (ensilage, traitement thermique) ;
- les performances comparées des animaux nourris avec ces nouveaux aliments et ceux nourris avec des produits issus de plantes parentales non génétiquement modifiées ;
- la digestibilité des principaux constituants, matière sèche, matière organique, énergie, azote total, NDF, ADF ;
- la démonstration de l'absence de substances étrangères ou nouvelles dues à la modification génétique dans le lait, la viande et les œufs.

Les résultats de ces études ont montré, dans la limite des essais réalisés, la similitude des performances entre des animaux (vache laitière, poulet ou porc) recevant un aliment à base de plantes génétiquement modifiées ou ceux nourris avec un aliment à base de plantes d'une lignée isogénique.

Toutefois, il convient de prendre en considération, dans l'interprétation de ces résultats, la notion de **puissance statistique**¹⁰ d'un essai, permettant d'avoir une probabilité importante de mettre en évidence une différence donnée (voir annexe 1). La puissance statistique d'un essai est liée au nombre d'animaux utilisés. Les résultats de tels essais pourraient ne pas être statistiquement significatifs en raison d'un effectif trop limité d'animaux testés.

Détermination du nombre d'animaux par essai

Le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'une puissance statistique donnée (voir annexe 1) dépend de plusieurs facteurs :

- la variabilité naturelle du caractère étudié : plus le caractère est naturellement stable dans une population, plus il est facile de mettre en évidence une faible différence ;
- la puissance statistique désirée, définie *a priori* ;
- la différence que l'on veut pouvoir mettre en évidence : plus cette différence est faible, plus il faut d'individus.

⁸ ADF : acid detergent fiber

⁹ NDF : neutral detergent fiber

¹⁰ La puissance d'un test statistique correspond à la probabilité de conclure à une différence statistiquement significative, si celle-ci existe réellement. Cette notion ne doit pas être confondue avec le risque α , de valeur généralement choisie 5%, correspondant à la probabilité de conclure en une différence significative en l'absence de différence réelle.

Choix de l'espèce cible et paramètres d'observation¹¹

Le choix de l'animal cible dépend de la plante à tester.

Dans le cas d'un aliment destiné à un monogastrique, un essai d'alimentarité sur rat ou sur poulet, tel que décrit précédemment, sera généralement suffisant. Dans certains cas (présence de substances à caractère oestrogénique, de facteurs antinutritionnels) un essai sur porc pourrait s'avérer plus informatif. Les paramètres d'observation sont le gain de poids, la consommation et l'efficacité de l'aliment, et/ou éventuellement la digestibilité de la matière sèche, de la matière organique, l'azote total et de l'énergie.

Dans le cas d'un aliment destiné plus spécialement aux volailles, telles que poule pondeuse , ou caille , les paramètres à observer sont le taux de ponte, le poids de l'œuf, l'efficacité de l'aliment, la qualité de l'œuf (norme AFNOR). Si l'essai est réalisé avec des poulets ou des dindons, les paramètres à observer sont le gain de poids, la consommation et l'efficacité de l'aliment, et/ou éventuellement la digestibilité des composants de la ration

Dans le cas d'un aliment destiné plus spécialement à un ruminant, l'essai peut être réalisé sur petits ruminants, bovins à l'engrais ou vaches laitières. Les paramètres d'observation sont les performances de croissance et la consommation d'aliment (petits ruminants et bovins) et la production laitière globale et corrigée du taux butyreux (fat corrected milk), la consommation d'aliment et la composition du lait (vaches laitières). Dans le cas des essais sur petits ruminants, on mesurera la digestibilité de la matière sèche, de la matière organique, de l'énergie, l'ADF, le NDF.

Les effectifs d'animaux, leur stade physiologique (stade de la lactation, âge/poids en début d'essai, ...), les paramètres choisis pour le suivi et la durée de l'essai¹² seront définis de manière à pouvoir mettre en évidence une différence éventuelle d'un écart-type entre les traitements avec une puissance d'au moins 80 % (voir annexe 1).

2.4 Dégradation dans le tube digestif

L'étude de la dégradation du produit de gène dans le tube digestif peut être un élément décisif de l'évaluation. L'étude doit comporter une étape *in vitro* (simulation d'une digestion gastrique et intestinale) et une étape *in vivo*. Compte tenu du fait qu'un aliment (ou le produit de gène) peut se comporter différemment (être plus stable *in vivo* qu'*in vitro*) dans le tube digestif de l'animal, l'étude de toxicité subchronique sur animal de laboratoire et les essais de tolérance, d'alimentarité et de digestibilité des constituants majeurs ou des parties de plantes GM sur animal cible pourront utilement contribuer à l'étude de la dégradation du nouvel aliment dans l'appareil digestif.

2.5 Evaluation du pouvoir allergénique

Le Codex alimentarius a, dans le cadre du projet de lignes directrices pour l'évaluation des dossiers OGM (Guideline for the conduct of safety assessment of foods derived from modified plants), élaboré des recommandations particulières sur l'évaluation du pouvoir allergène des protéines, en se fondant sur les conclusions de la consultation FAO/OMS des experts internationaux (Foods derived from biotechnology, allergenicity of genetically modified foods, 22-25 janvier 2001) [8]. Le rapport de la FAO/OMS propose une démarche d'évaluation fondée sur une approche par arbre de décision (voir schéma) et donne des recommandations sur le développement de procédures standardisées et pour une surveillance après mise sur le marché.

¹¹ Les observations obtenues seront à confronter à celles recueillies dans le cadre du plan de surveillance mis en place après autorisation de mise sur le marché, conformément aux dispositions prévues dans la directive 2001/18/CE.

¹² Durées d'essai indicatives pour le porc : 100 jours, poule pondeuse ou caille : 2 mois autour du pic de ponte, poulet ou dindon : de 1 jour jusqu'à l'abattage, petits ruminants : 3 mois, vache laitière : 2 mois

Après avoir identifié si le gène d'intérêt est issu ou non d'un organisme connu pour être allergénique, l'étape initiale de l'évaluation du pouvoir allergénique d'un OGM consiste à comparer, dans tous les cas, l'homologie de séquences de la protéine nouvelle avec celle de séquences d'allergènes connus répertoriés dans des banques de données. S'il y a homologie de séquence, le produit est considéré comme présentant un risque d'allergénicité.

Si la protéine nouvelle ne présente pas d'homologie de séquences :

- **lorsque la protéine provient d'une source connue pour être non allergénique**, il convient de tester cette protéine sur une cinquantaine d'échantillons de *sérums ciblés*, sérums provenant de sujets allergiques choisis en fonction de l'origine de la protéine responsable de l'allergie (6 groupes d'organismes source sont distingués : levures/moisissures, mono et dicotylédones, vertébrés et invertébrés, divers). Si la protéine ne présente pas d'immuno-réaction croisée, on évalue la résistance de la protéine à la dégradation par la pepsine selon un protocole établi conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire. En principe si les fragments peptidiques obtenus sont inférieurs à 3,5 KDa, il y a peu de chance que la protéine soit allergénique. La sensibilité de la protéine à la digestion pepsique n'est cependant qu'un paramètre pour la mise en évidence d'un allergène.

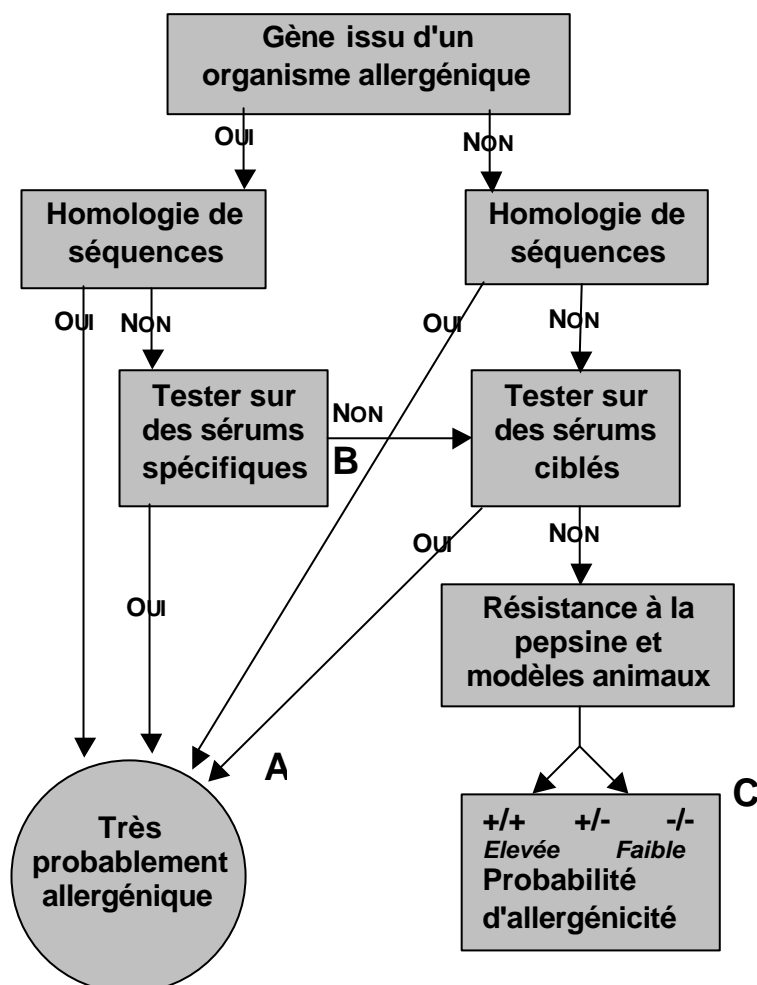
Le modèle *in vitro* n'a pas la prétention de mimer les conditions de la digestion gastrique, c'est pourquoi, des informations complémentaires sur l'immunoallergénicité de la protéine peuvent être obtenues par des études sur des modèles animaux. Toutefois, ces modèles présentent aussi des limites ; ils ne reflètent pas tous les aspects des allergies alimentaires médiées par les IgE ;

- **lorsque la protéine provient d'une source connue pour être allergénique**, il convient de tester cette protéine sur des *sérums spécifiques* de patients connus pour présenter des allergies (le nombre et la qualité de tels sérums est discuté dans le document FAO/OMS 2001 [8]). Si la protéine ne présente pas d'immuno-réaction croisée avec ces sérums spécifiques, l'absence de réaction croisée avec des sérums ciblés est également vérifiée. Puis le pouvoir de résistance de la protéine à la dégradation par la pepsine est évalué ainsi que son comportement allergénique sur animaux.

Enfin, dans des cas particuliers, pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus dans les tests précédents, des tests cliniques sur des patients allergiques à certains aliments pourront éventuellement être réalisés, après accord du Comité d'Ethique.

C'est l'ensemble des tests réalisés qui permettra d'écarter un éventuel pouvoir allergénique. Mais, comme dans le cas du médicament où la pharmacovigilance peut révéler des effets inattendus à moyen ou long terme, la mise en place d'un système de surveillance après la mise sur le marché s'avère absolument nécessaire. Ceci n'est cependant pas sans difficultés car l'OGM ou le produit issu d'OGM étant intégré dans une alimentation complexe qui contient naturellement un certain nombre de substances allergéniques, l'attribution d'une réaction allergique à un OGM sera difficile à établir.

**Evaluation du pouvoir allergénique des
aliments dérivés des biotechnologies
FAO/OMS 2001 ***



Notes

- A Tous résultats positifs obtenus à partir des comparaisons d'homologie de séquences avec des allergènes connus figurant dans des bases de données ou à partir de tests sur sérums, réalisés selon les lignes directrices définies dans le document FAO/OMS 2001*, indiquent que la protéine exprimée est très probablement allergénique.
- B Le degré de fiabilité des résultats négatifs obtenus dans le test sur sérums spécifiques est augmenté en examinant un nombre plus important de sérums individuels tel que précisé dans le document FAO/OMS 2001*. La réalisation d'un test sur sérums spécifiques avec un nombre plus faible de sérums individuels devrait être déconseillée lorsqu'un plus grand nombre de tels sérums est aisément disponible.
- C Lorsque des résultats positifs sont obtenus dans les essais de résistance à la pepsine et sur modèles animaux, la protéine exprimée présente une forte probabilité de devenir un allergène. Lorsque des résultats négatifs sont obtenus dans ces deux types d'essais, il est peu probable que la protéine exprimée devienne un allergène. Lorsque des résultats différents sont obtenus dans les essais de résistance à la pepsine et sur modèles animaux, la probabilité d'allergénicité est intermédiaire, bien que, dans certaines situations, des explications rationnelles puissent être envisagées.

* Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO Expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001 [8]. (La version anglaise est la version de référence.)

3 LES LIMITES DES ESSAIS

Aussi approfondie que soit l'évaluation *a priori* qui vise, notamment, à mettre en évidence des effets potentiels inattendus et à prévoir d'éventuels effets à long terme, elle présente des limites de trois niveaux différents :

- ◆ limites liées à la mise en œuvre de nouvelles techniques encore au stade de la recherche,
- ◆ limites liées à la faisabilité de certains essais,
- ◆ limites liées de l'évaluation des effets à long terme chez l'animal et des effets chez l'homme.

3.1 Limites liées à la mise en œuvre de nouvelles techniques encore au stade de la recherche

Certains aspects de l'évaluation des risques pourront être approfondis dans le futur en utilisant les nouvelles techniques ou méthodes analytiques et statistiques qui se développent actuellement. Elles pourraient permettre d'avoir une vision globale des modifications induites par la modification génétique introduite sur la synthèse des ARNm, des protéines (notamment la création de protéines de fusion ou l'expression d'autres gènes) et des métabolites (notamment de détecter un effet inattendu sur d'autres ou entre différentes voies métaboliques (amplification, suppression). Ces nouvelles techniques ou méthodes permettront :

- l'identification et la quantification des ARNm transcrits dans la cellule, le tissu ou l'organe végétal (transcriptome);
- la caractérisation des protéines produites dans la cellule, le tissu ou l'organe végétal (protéome);
- la caractérisation des métabolites produits dans la cellule, le tissu ou l'organe végétal (métabolome).

Concernant plus particulièrement la caractérisation des protéines et des métabolites produits par la plante génétiquement modifiée et de son isogénique cultivées l'une et l'autre dans plusieurs environnements, la mise en œuvre de ces nouvelles techniques permettrait :

- 1) d'approcher l'influence de la modification génétique sur l'expression protéique (apparition et disparition de protéines, extinction ou modification de voies métaboliques),
- 2) d'identifier les produits d'expression résultant de la modification génétique introduite dans une plante placée dans des environnements contrastés et connus,
- 3) d'analyser les réponses adaptatives du génome de la plante GM et ainsi de conclure avec plus de connaissances quant aux conséquences de la modification génétique sur la composition et la sécurité.

Ces techniques pourront contribuer à interpréter les différences éventuelles de composition des nouveaux produits dès lors que l'on disposera d'un certain référentiel fondé sur la connaissance des variations naturelles des divers composants cellulaires existant dans les plantes.

3.2 Limites liées à la faisabilité de certains essais

Les essais de tolérance, d'alimentarité et de digestibilité sur animaux cibles, pourront apporter des informations sur des effets potentiels d'une consommation chronique et massive (jusqu'à 90 % de la

ration) d'un produit par l'animal ou l'homme . Ils devraient permettre de révéler également la présence de facteurs potentiellement néfastes ou de facteurs antinutritionnels.

Ces essais comportent cependant des contraintes ou des difficultés pratiques liées à :

- la nécessité d'un effectif suffisamment important d'animaux pour pouvoir observer un effet éventuel,
- la préparation de matériel à tester en quantité suffisante pour exposer les animaux pendant de longues périodes.

Pour assurer une puissance du test statistique suffisante, c'est à dire avoir une probabilité de mettre en évidence une différence statistiquement significative, il est nécessaire de réunir un effectif d'animaux approprié. De plus, en dehors de problèmes de coût, des quantités importantes de plantes génétiquement modifiées vont être nécessaires pour nourrir cet effectif important d'animaux pendant toute la durée des essais. Les produits, soumis à des essais sur animal cible dans le cadre de l'évaluation avant la mise sur le marché, ne sont autorisés que dans le cadre d'une dissémination expérimentale, ne faisant donc appel qu'à des parcelles de taille limitée. Actuellement et depuis 1998, au moins en Europe, les cultures expérimentales sont mal acceptées. Ceci explique que la plupart des expérimentations avec des effectifs importants ont été réalisées aux Etats-Unis avec des plantes génétiquement modifiées déjà autorisées à la culture et en nombre limité en France (1) et en Allemagne (10) en 1998.

3.3 Limites liées de l'évaluation des effets à long terme chez l'animal et des effets chez l'homme

• **Evaluation des effets toxiques à long terme sur animal de laboratoire**

Les études de toxicité à court terme (90 j) sur animal de laboratoire réalisées pour évaluer la protéine modifiée ou la plante transformée elle-même devrait permettre de révéler d'éventuels effets toxiques ou néfastes en rapport avec la modification génétique introduite.

Dans le cas d'un OGM destiné à l'alimentation, si les études de toxicité aiguë et subchronique avaient révélé un éventuel effet toxique, l'OGM n'aurait pas été autorisé. Il n'aurait d'ailleurs pas été proposé pour une évaluation en vue de la mise sur le marché par le pétitionnaire.

On peut cependant s'interroger sur la nécessité de prolonger (jusqu'à 2 ans par exemple) ce type d'essai sur animal de laboratoire pour rechercher d'autres effets toxiques ou néfastes qui ne se manifesteraient que tardivement après une administration répétée.

Dans la majorité des cas, et jusqu'à aujourd'hui, les modifications génétiques introduites dans des plantes n'ont pas conduit à créer de nouvelles entités chimiques. C'est la raison pour laquelle, comme dans le cas des produits biologiques produits par organismes vivants (bactéries, levures, plantes, animaux) destinés à être utilisés comme médicaments, sauf exception, de telles études à long terme ne se justifient pas. Toutefois, dans certains cas particuliers, si des éléments d'alerte issus des données disponibles dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché, suggéraient l'existence d'un danger particulier, il conviendrait alors d'approfondir, au cas par cas, l'évaluation par des essais complémentaires.

De tels essais présentent de nombreuses difficultés de réalisation :

- on ne connaît pas, *a priori*, l'élément potentiellement toxique et ses conséquences éventuelles ;
- ce type d'essai nécessite, pour espérer observer un effet, l'administration des doses élevées, tout en respectant l'équilibre nutritionnel de l'animal, alors que l'élément potentiellement toxique est généralement synthétisé en quantité très faible, et d'utiliser un effectif important d'animaux.

· **Evaluation des effets chez l'homme (essais cliniques)**

L'éventualité de la mise en oeuvre pour les OGM ou les produits qui en sont issus de protocoles d'études chez l'Homme, type essais cliniques, c'est à dire de les "tester" sur un nombre limité de volontaires avant une diffusion plus large à l'ensemble d'une population, constitue un concept qui mérite *a priori* d'être examiné.

Dans le cas d'un OGM destiné à l'alimentation qui revendiquerait un bénéfice pour la santé, la réalisation de tels essais se justifierait pleinement pour démontrer l'allégation avancée. Cette dimension n'est pas développée plus avant dans cet avis, dès lors que celui-ci ne concerne que l'évaluation des risques¹³.

Pour ce qui concerne les OGM dont les seuls effets recherchés ne concernent pas la santé (amélioration agronomique, protection de l'environnement ...), de telles études seraient très difficiles à justifier sur le plan éthique. De plus, elles apparaissent moins bien adaptées à l'évaluation des risques que le renforcement des études sur animaux, tel qu'évoqué dans cet avis. Pour être mises en oeuvre, elles nécessiteraient en effet de pouvoir surmonter de nombreuses difficultés théoriques, éthiques et pratiques :

- d'une manière générale, la mise en évidence des effets à long terme de l'alimentation sur la santé dépend davantage du régime global et de l'interaction de cette alimentation avec l'ensemble du mode de vie que d'un aliment particulier ;
- de tels essais nécessiteraient des études rigoureuses (randomisées, double aveugle), longues et d'autant plus difficiles à réaliser que l'ingestion du même (et unique) aliment OGM, même sous des formes variées, pourrait se révéler impraticable sur des durées d'observation prolongées ;
- lorsqu'il n'est pas revendiqué une allégation santé, il paraît extrêmement difficile d'identifier *a priori* les critères de jugement d'une telle étude, l'effet attendu à tester - moins encore l'ampleur de cet effet - ainsi que le nombre de sujets à inclure dans l'étude ;
- il est difficile de concevoir quel type d'étude permettrait de cerner des effets potentiels sur l'ensemble des systèmes physiologiques (cardiovasculaire, cognitif, reproductif, immunologique, osseux....).

Cette réflexion pourrait d'ailleurs être élargie, au delà des OGM, aux nutriments tels que les vitamines ou les minéraux parfois consommés en quantités importantes sous des formes concentrées.

4 EVALUATION DES RISQUES APRES LA MISE SUR LE MARCHÉ

Aussi approfondie que soit l'évaluation des risques avant la mise sur le marché, il apparaît nécessaire d'assurer un suivi des produits commercialisés afin de pouvoir détecter l'éventuelle survenue d'effets potentiels inattendus ou cumulatifs à long terme, ou la manifestation d'éventuels effets néfastes qui pourraient se révéler chez des sujets ou des populations particulièrement sensibles. A cet effet, de nouvelles dispositions ont été introduites dans la directive 2001/18/CE et le projet de règlement relatif aux denrées alimentaires issues d'OGM qui prévoient la conception et la mise en place d'un plan de surveillance pour le suivi des OGM après leur mise sur le marché. Cette surveillance fait partie de l'évaluation des risques et les données recueillies viendront compléter l'ensemble des données de l'évaluation *a priori*.

¹³ Sur la notion de l'évaluation des bénéfices des OGM pour la santé, se reporter aux actes du colloque organisé par l'Afssa "OGM et alimentation : Peut-on évaluer des bénéfices pour la santé" qui s'est tenu les 17 et 18 décembre 2001.

Question 2 : Quels sont les risques liés à la consommation humaine et animale d'OGM contenant des gènes de résistance aux antibiotiques ?

L'émergence de bactéries pathogènes résistantes à de nombreux antibiotiques depuis plus d'une décennie est un sujet de préoccupations en pathologie humaine et vétérinaire. Ceci explique que l'opinion publique et les scientifiques soient aujourd'hui, à juste titre, préoccupés par l'apparition et l'utilisation de plantes transgéniques porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques comme marqueurs de sélection dans la préparation de ces nouvelles plantes.

Les gènes de résistance aux antibiotiques introduits dans le génome d'une plante transgénique sont-ils susceptibles, dans différentes situations écologiques, de retourner vers des bactéries et conduire à une extension des résistances aux antibiotiques susceptibles d'avoir des effets préjudiciables sur la santé humaine ?

Cette question a déjà été examinée par un collège d'experts dans le cadre d'un séminaire conjoint des commissions du génie génétique et du génie biomoléculaire en janvier 1999 et conduit à la signature en janvier 2000 d'un avis conjoint de ces deux instances scientifiques [9,10].

Dans la mesure où la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries de l'environnement est un risque objectif mais que la probabilité de transfert de ces gènes à partir d'une plante vers les bactéries du sol est un risque potentiel, il convient de comparer et d'évaluer ces deux risques en examinant les points suivants :

- A** Quelles sont les conditions d'utilisation de gènes de résistance dans les plantes génétiquement modifiées ?
- B** Quelles sont les conditions du transfert d'un gène d'une plante à une bactérie ? Bien que ce transfert n'ait jamais été observé, est-il envisageable ?
- C** Quelle est la contribution du réservoir naturel de gènes de résistance aux antibiotiques au développement et/ou à la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques ?
- D** L'utilisation massive d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire crée une pression de sélection en faveur de bactéries ayant acquis des gènes de résistance. Un élargissement possible du spectre de résistance au cours des transferts successifs de gènes doit-il être pris en considération ?
- E** Quel risque supplémentaire apporterait la transgénèse végétale par rapport à la situation actuelle au regard du développement des résistances aux antibiotiques constaté ?

Dans la mesure où, à l'heure actuelle, les seuls OGM sur le marché sont des plantes, les éléments d'évaluation développés ci-dessous porteront sur le cas des plantes. Cependant, bien qu'aucun microorganisme génétiquement modifié ne soit encore utilisé en alimentation humaine ou animale, nous évoquerons les risques liés à l'utilisation de gènes de résistance à un antibiotique comme marqueurs de sélection dans le cas des microorganismes.

A Quelles sont les conditions d'utilisation de gènes de résistance dans les plantes génétiquement modifiées ?

Il convient de différencier l'utilisation des gènes de résistance à un antibiotique selon que ces gènes sont utilisés : i) comme marqueurs au moment de la construction des plasmides transformants,

l'ampicilline étant dans ce cas, et ii) pour la sélection des cellules végétales transformées, la kanamycine étant le plus utilisé.

Les gènes de résistance à des antibiotiques sont ainsi utilisés comme marqueurs pour la sélection :

- du vecteur de la séquence génique d'intérêt ; dans ce cas, le gène de résistance à l'antibiotique (type ampicilline) est sous contrôle d'un promoteur bactérien,
- des éléments transformés de la plante destinés à générer les plantes transgéniques recherchées ; dans ce second cas, le gène de résistance à l'antibiotique (type kanamycine) est sous contrôle d'un promoteur de type eucaryote végétal.

L'évaluation des risques liés à l'utilisation de ce type de gènes marqueurs se situe maintenant dans un cadre réglementaire un peu différent puisque la nouvelle directive 2001/18/CE [3] prévoit dans ses dispositions (article 4-2) "...d'éliminer progressivement des OGM les marqueurs de résistance aux antibiotiques qui sont susceptibles d'avoir des effets préjudiciables sur la santé humaine et l'environnement." Le texte précise que cette élimination progressive aura lieu d'ici le 31 décembre 2004 dans le cas des OGM mis sur le marché conformément à la partie C (autorisation de mise sur le marché d'OGM) et d'ici le 31 décembre 2008 dans le cas des OGM autorisés en vertu de la partie B (dissémination volontaire à tout autre fin que la mise sur le marché).

Concernant les marqueurs utilisés pour la sélection du vecteur de la séquence génique d'intérêt, en dehors du maïs BT 176 (construction ancienne) qui contient un gène de résistance à l'ampicilline, il est à noter que les constructions récentes autorisées ont été débarrassées des gènes marqueurs utilisés pour la construction du plasmide transformant.

En ce qui concerne les marqueurs de sélection des cellules végétales transformées, l'utilisation en médecine humaine comme en médecine vétérinaire de la kanamycine est devenue très limitée. Il a été avancé que l'utilisation de gène de résistance à la kanamycine pourrait provoquer l'apparition d'une résistance à l'amikacine par des mutations ponctuelles du gène NPTII ou augmenter son niveau de résistance. Cependant, d'une part l'amikacine¹⁴ est un mauvais substrat pour l'enzyme d'inactivation NPTII (néomycine phospho-transférase), d'autre part, ces mutations ont été obtenues chez *Escherichia coli*, exclusivement au laboratoire dans des conditions de sélection très contraignantes [11-16]. L'hygromycine, susceptible d'être utilisé dans de futures constructions, n'est plus utilisée en thérapeutique humaine (*communication du Dr P. Berche*).

B Quelles sont les conditions du transfert d'un gène d'une plante à une bactérie ? Bien que ce transfert n'ait jamais été observé, est-il envisageable ?

La mobilisation d'une séquence génique de résistance à un antibiotique à partir de plantes GM vers des bactéries du sol, du tractus intestinal des herbivores ou de l'homme implique une cascade de processus de transferts horizontaux interspécifiques [17]. De plus il sera nécessaire que la séquence soit intégrée chez l'hôte final dans des conditions où elle pourra s'exprimer. Ces étapes sont les suivantes :

- libération de l'ADN de la plante dans le milieu ;
- persistance de fragments d'ADN dans le milieu ;
- transformation de bactéries compétentes (état physiologique à un moment donné de certaines bactéries qui leur permet d'incorporer dans leur cytoplasme des fragments d'acides nucléiques) par l'ADN conservé (l'adsorption de l'ADN sur les argiles [18,19] dans le sol peut favoriser la conservation des fragments d'ADN mais rend ceux-ci moins disponibles pour la transformation) ;

¹⁴ Les enzymes de résistance inactivant l'amikacine sont essentiellement des acétylases et des adénylases ou nucléotidyl-transférases et non des phosphotransférases (NPT). Les gènes codant pour ces enzymes d'inactivation sont différents et il semble peu probable qu'un gène tronqué de NPTII, tel que présent dans certaines constructions, conduise à une résistance à l'amikacine.

- intégration (ou maintien) dans le génome bactérien de cet ADN provenant de la plante transformée ; cette étape est limitante du fait de l'existence de systèmes de restriction efficaces (après passage dans la plante, un ADN d'origine bactérienne n'est plus reconnu comme un ADN bactérien), de la nécessité de séquences homologues pour qu'il y ait recombinaison, et généralement de l'absence d'origine de réplication ;
- expression/sélection ; la pression de sélection qui peut exister dans le sol au niveau des microniches, peut jouer un rôle important.

La réunion de ces conditions rend la réalisation d'un tel transfert très peu probable.

Les calculs pour estimer les fréquences de transfert de séquences géniques d'origine procaryotique à partir de plantes GM vers des bactéries sont peu convaincants. Ces transferts sont théoriquement envisageables, mais aucune étude publiée à ce jour n'a démontré un tel transfert. De plus, aucune donnée ne conduit à supposer que des séquences géniques d'origine non végétale introduites dans le génome de la plante se comporteraient différemment des autres séquences géniques végétales quant à la pénétration et à l'effet des enzymes de restriction.

C Quelle est la contribution du réservoir naturel existant de gènes de résistance aux antibiotiques au développement (ou à la dissémination ?) de gène de résistance aux antibiotiques ?

Les antibiotiques sont des substances, synthétisées par des organismes vivants, en particulier, certains champignons, qui ont la propriété de stopper la croissance des microorganismes. Afin de se protéger des effets délétères de ces substances, certains microorganismes ont ainsi développés des résistances à ces antibiotiques. Les bactéries du sol contiennent naturellement des gènes de résistance aux antibiotiques qu'elles ont acquis sous la pression de sélection. Ces gènes sont le plus souvent portés par des éléments génétiques mobiles de la cellule bactérienne (transposons, plasmides).

Ainsi, dès avant l'utilisation de la plupart des antibiotiques, l'existence de résistance aux antibiotiques avait été reconnue [20].

Une étude [21] montre que les tubes digestifs de l'homme et de l'animal contiennent déjà beaucoup de plasmides portant des gènes de résistance aux antibiotiques, même chez le nouveau né, deux jours après la naissance.

D L'utilisation massive d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire crée une pression de sélection en faveur de bactéries ayant acquis des gènes de résistance. Un élargissement possible du spectre de résistance au cours des transferts successifs de gènes doit-il être pris en considération ?

Les antibiotiques sont largement utilisés en thérapeutique humaine et vétérinaire. Ils sont également administrés sous contrôle vétérinaire en traitement prophylactique chez les animaux à des doses proches des doses thérapeutiques. Enfin, ils ont été très utilisés comme facteur de croissance en alimentation animale à des doses beaucoup plus faibles. Cette cause potentielle de résistance devrait diminuer à l'avenir puisque sur 8 antibiotiques qui avaient été autorisés au titre de la directive 70/524/CEE [22] comme facteur de croissance, seulement 4 sont encore autorisés dont 2 ionophores.

L'ensemble de ces emplois contribue à accroître la sélection des résistances. Dans le domaine vétérinaire, l'évolution des résistances aux antibiotiques est relativement bien connue [23, 24] et régulièrement suivie au travers des plans de surveillance réalisés dans le cadre du contrôle des médicaments vétérinaires.

Dans le domaine humain, bien que la recherche des résistances aux antibiotiques chez l'homme adulte n'ait pas fait l'objet d'études très larges, un certain nombre d'études multicentriques ayant pour but d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques de souches courantes prélevées chez des patients en médecine de ville [25] ou en services hospitaliers [26] ont été réalisées. Ces études montrent, dans la limite des types d'infections étudiés, de la nature des germes isolés et des antibiotiques utilisés, une évolution vers la résistance des souches d'*E.coli* à certaines β -lactamines, aussi bien en pratique de ville qu'hospitalière, en particulier dans les associations amoxicilline-acide clavulanique ; la résistance aux quinolones et aux aminosides serait plus marquée chez les souches d'origine hospitalière en raison d'une moindre utilisation des quinolones en pratique de ville. Par ailleurs, le suivi des résistances aux antibiotiques dans les hôpitaux est assuré par les comités de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN).

E Quel risque supplémentaire apporterait la transgène végétale par rapport à la situation actuelle au regard du développement des résistances aux antibiotiques constaté ?

A partir des éléments développés ci-dessus, il apparaît que :

- le risque de transfert de séquences géniques d'origine procaryotique à partir de plantes transgéniques vers des microorganismes du sol est un risque théorique mais qu'il n'a pas de réalité à ce jour. Il n'a été démontré ni en conditions naturelles ni en conditions expérimentales. ;
- la probabilité de transfert d'un gène de résistance à un antibiotique de la plante vers les bactéries est très faible compte tenu de la réunion de l'ensemble des conditions qui permettrait qu'un tel transfert ait lieu ;
- la prévalence naturelle des gènes de résistance à la kanamycine et à l'ampicilline est très élevée dans les bactéries telluriques, le tractus digestif de l'animal et de l'homme ;
- l'utilisation d'antibiotiques comme facteur de croissance en nutrition animale et leur emploi en médecine humaine et vétérinaire sont reconnus comme une source majeure d'émergence et de diffusion des résistances aux antibiotiques, sans commune mesure avec le risque hypothétique lié à la présence d'un gène de résistance à un antibiotique dans une plante génétiquement modifiée.

En l'état actuel des connaissances, la consommation par l'homme ou les animaux de produits alimentaires composés ou issus de plantes génétiquement modifiées contenant des gènes de résistance à la kanamycine et/ou à l'ampicilline ne présente en conséquence qu'un risque théorique et en tout état de cause négligeable pour la santé humaine et animale au regard de la présence de ces gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries de l'environnement. Si les constructions avec l'ampicilline comme marqueur de sélection du vecteur transformant sont désormais débarrassées de ce genre de marqueur, les méthodes substitutives qui permettraient de s'affranchir de marqueur de sélection végétale (type kanamycine) sont encore en développement et nécessitent d'être validées.

Pour les constructions à venir, comme le prévoit la directive 2001/18/CE [3], il convient de recommander d'éviter, la présence, dans des plantes génétiquement modifiées destinées à la consommation humaine et animale, de gènes de résistance à un antibiotique susceptible d'avoir des effets préjudiciables sur la santé humaine et animale.

Cas des microorganismes génétiquement modifiés

Il convient de ne pas mettre sur le même plan le risque de transfert de gène de résistance à un antibiotique à partir des plantes qui est très peu probable et celui à partir des microorganismes qui pourrait présenter un risque beaucoup plus élevé, les barrières génétiques (telles que promoteurs eucaryote/procaryote, présence de système de restriction) n'existant plus ou n'étant plus aussi efficaces.

Bien qu'aucun microorganisme génétiquement modifié destiné à la consommation humaine et animale n'ait encore reçu d'autorisation de mise sur le marché dans l'Union européenne, il convient d'être beaucoup plus restrictif, sur l'utilisation de gènes de résistance à un antibiotique comme marqueur de sélection, chez des microorganismes¹⁵ destinés à la consommation humaine ou animale ; le risque de transfert de ces gènes à des bactéries de la flore intestinale serait alors non négligeable.

¹⁵ Certains microorganismes utilisés en production alimentaire possèdent des résistances intrinsèques à des antibiotiques. Il n'y a pas de raison d'exclure de tels microorganismes comme organisme receveur pour autant qu'il aura été vérifié que ces gènes de résistance ne sont pas portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons et intégrons) du microorganisme.

CONCLUSIONS

QUESTION 1

Quels sont les points sensibles de l'évaluation des risques sanitaires liés à la consommation humaine et animale d'OGM ou de produits qui en sont issus et quels sont les éléments pertinents de cette évaluation ?

La réflexion scientifique conduite au sein de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été centrée sur les points sensibles de l'évaluation de l'innocuité des OGM ou des produits qui en sont issus, destinés à la consommation humaine et animale, au regard des dispositions réglementaires prévues par la directive 90/220/CEE (ou 2001/18/CE qui remplacera la directive 90/220/CEE en octobre 2002) et le règlement (CE) n°258/97 (Recommandations de la Commission du 29 juillet 1997) et des projets de révision des lignes directrices européennes ou internationales (Codex alimentarius).

Les informations relatives à la modification génétique, d'une part, et les informations toxicologiques, d'autre part, sont essentielles pour établir l'innocuité *a priori* d'un nouvel aliment. Pour quelques uns de ces points sensibles, l'Afssa a identifié un certain nombre de données actuellement manquantes ou insuffisamment documentées qui peuvent aider à affiner l'évaluation de la sécurité alimentaire des OGM ou des produits qui en sont issus avant leur mise sur le marché.

Informations relatives à la modification génétique et à la plante génétiquement modifiée

Les données habituellement fournies dans les dossiers décrivant les séquences d'ADN insérées ou supprimées devraient être complétées par la séquence¹⁶¹⁶ du transgène et des régions faisant la jonction avec le génome. Ces données supplémentaires auront pour but :

- de vérifier si le fragment inséré est bien identique à celui qui avait été introduit dans le vecteur transformant ;
- d'examiner l'environnement du gène inséré ;
- de localiser l'insert dans le génome de la plante.

Provenance des plantes génétiquement modifiées

Compte tenu de l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance végétale, cette évaluation doit porter sur des plantes cultivées pendant au moins deux saisons dans des sites différents et représentatifs de divers environnements.

Evaluation de la toxicité subchronique du produit de gène sur animal de laboratoire

A quelques exceptions près, les seuls éléments disponibles relatifs à la toxicité ont été obtenus par des administrations uniques (toxicité aiguë) à des animaux de laboratoire, réalisées avec la protéine purifiée.

Le fait que l'exposition animale ou humaine aux OGM soit chronique, impose que l'on procède à des expositions, elles aussi, de type chronique. Elles permettent en effet de révéler, avec une meilleure probabilité, des effets potentiels sur les systèmes vitaux, notamment immunitaires, hormonaux et reproducteurs et de possibles effets liés à des phénomènes d'accumulation.

¹⁶ Afin de faciliter la comparaison des séquences fournies avec des bases de données, il serait souhaitable de mettre à la disposition de l'évaluateur ces séquences sur support informatique.

Un essai de toxicité subchronique 90 jours du produit de gène sur animal de laboratoire (rat, souris, cobaye) vise à mettre en évidence de potentiels effets délétères sur le développement d'organes ou systèmes vitaux lors d'une exposition à long terme.

Evaluation sur animal de la tolérance au produit fini

L'objectif de ces études, réalisées avec le produit OGM ou issu d'OGM (parties de la plante ou produits dérivés destinés à la consommation), est de mettre en évidence des effets potentiels d'une consommation régulière d'un produit par l'homme ou l'animal, et des effets toxiques inattendus ou non intentionnels qui ne se seraient pas révélés dans les études de toxicité aiguë ou subchronique.

Deux types d'études permettraient de mettre en évidence de tels effets :

- des études de la toxicité/tolérance sur animal de laboratoire des parties de la plante destinées à la consommation ou de leurs produits dérivés ;
- des études de tolérance, d'alimentarité et de digestibilité sur animal cible des parties de la plante destinées à la consommation ou de leurs produits dérivés.

Les résultats de tels essais pourraient ne pas être statistiquement significatifs en raison d'un effectif trop limité d'animaux testés. Il convient donc de prendre considération la notion de puissance statistique d'un essai (voir annexe 1). Les effectifs d'animaux, leur stade physiologique (stade de la lactation, âge/poids en début d'essai, ...), les paramètres choisis pour le suivi et la durée de l'essai devront être définies de manière à pouvoir mettre en évidence une différence éventuelle d'un écart-type entre les traitements avec une puissance statistique d'au moins 80 %.

Les limites des essais

Aussi approfondie que soit l'évaluation *a priori* qui vise, notamment, à mettre en évidence des effets potentiels inattendus et à prévoir d'éventuels effets à long terme, elle présente des limites de trois niveaux différents :

- ◆ limites liées à la mise en œuvre de nouvelles techniques encore au stade de la recherche,
- ◆ limites liées à la faisabilité de certains essais,
- ◆ limites de l'évaluation des effets à long terme chez l'animal et des effets chez l'homme.

· Limites liées à la mise en œuvre de nouvelles techniques

Certains aspects de l'évaluation des risques pourront être approfondis dans le futur en utilisant les nouvelles techniques ou méthodes analytiques et statistiques qui se développent actuellement. Elles pourraient permettre d'avoir une vision globale des modifications induites par la modification génétique introduite sur la synthèse des ARNm, des protéines (notamment la création de protéines de fusion ou l'expression d'autres gènes) et des métabolites (notamment de détecter un effet inattendu sur d'autres ou entre différentes voies métaboliques (amplification, suppression).

· Limites liées à la faisabilité de certains essais

Les essais de tolérance, d'alimentarité et de digestibilité sur animaux cibles comportent des contraintes ou des difficultés pratiques liées à :

- la nécessité d'un effectif suffisamment important d'animaux pour avoir une probabilité de mettre en évidence une différence statistiquement significative ;
- la préparation de matériel à tester en quantité suffisante pour exposer les animaux pendant de longues périodes dans la mesure où les produits, soumis à des essais dans le cadre de l'évaluation avant la mise sur le marché, ne sont autorisés que dans le cadre d'une dissémination expérimentale, ne faisant donc appel qu'à des parcelles de taille limitée.

· Limites de l'évaluation des effets à long terme

L'évaluation des effets toxiques à long terme sur animal de laboratoire présentent de nombreuses difficultés de réalisation :

- on ne connaît pas, *a priori*, l'élément potentiellement toxique et ses conséquences éventuelles ;
- ce type d'essai nécessite, pour espérer observer un effet, l'administration des doses élevées, tout en respectant l'équilibre nutritionnel de l'animal, alors que l'élément potentiellement toxique est généralement synthétisé en quantité très faible, et d'utiliser un effectif important d'animaux.

L'évaluation des effets chez l'homme par des protocoles d'études de type essais cliniques apparaît moins bien adaptée à l'évaluation des risques que le renforcement des études sur animaux tel qu'évoqué dans cet avis. Leur mise en œuvre nécessiteraient, en effet, de pouvoir surmonter de nombreuses limites théoriques, éthiques et pratiques. Cependant, dans le cas d'un OGM destiné à l'alimentation qui revendiquerait un bénéfice pour la santé, la réalisation de tels essais se justifierait pleinement pour démontrer l'allégation avancée¹⁷ (dimension non développée dans cet avis relatif à l'évaluation des risques. Cette réflexion pourrait d'ailleurs être élargie, au delà des OGM, aux nutriments tels que les vitamines ou les minéraux parfois consommés en quantités importantes sous forme concentrée.

La conception et la mise en place d'un plan de surveillance pour le suivi des OGM après leur mise sur le marché (cf directive 2001/18/CE et projet de règlement relatif aux denrées alimentaires issues d'OGM) devrait permettre la mise en évidence d'éventuels effets néfastes qui pourraient se révéler chez des sujets ou des populations particulièrement sensibles.

QUESTION 2

Quels sont les risques liés à la consommation humaine et animale d'OGM contenant des gènes de résistance aux antibiotiques ?

En d'autres termes, *les gènes de résistance aux antibiotiques introduits dans le génome d'une plante transgénique sont-ils susceptibles, dans différentes situations écologiques, de retourner vers des bactéries et conduire à une extension des résistances aux antibiotiques susceptibles d'avoir des effets préjudiciables sur la santé humaine ?*

Antibiotiques utilisés comme marqueurs pour la sélection

Dans la construction des OGM, les gènes de résistance à des antibiotiques sont utilisés comme marqueurs pour la sélection :

- du vecteur de la séquence génique d'intérêt ; dans ce cas, le gène de résistance à l'antibiotique (type ampicilline) est sous contrôle d'un promoteur bactérien,
- des éléments transformés de la plante destinés à générer les plantes transgéniques recherchées ; dans ce second cas, le gène de résistance à l'antibiotique (type kanamycine) est sous contrôle d'un promoteur de type eucaryote végétal.

¹⁷ cf actes du colloque Afssa 17/18-12-01 "OGM et alimentation : peut-on évaluer des bénéfices pour la santé ?"

Afin de répondre à cette question¹⁸, les experts de l'Afssa ont examiné les points suivants

Quelles sont les conditions d'utilisation de gènes de résistance dans les plantes génétiquement modifiées ?

Quelles sont les conditions du transfert d'un gène d'une plante à une bactérie ? Bien que ce transfert n'ait jamais été observé, est-il envisageable ?

Quelle est la contribution du réservoir naturel de gènes de résistance aux antibiotiques au développement et/ou à la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques ?

L'utilisation massive d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire crée une pression de sélection en faveur de bactéries ayant acquis des gènes de résistance. Un élargissement possible du spectre de résistance au cours des transferts successifs de gènes doit-il être pris en considération ?

Quel risque supplémentaire apporterait la transgénèse végétale par rapport à la situation actuelle au regard du développement des résistances aux antibiotiques constaté ?

Les experts ont considéré que

- le risque de transfert de séquences géniques d'origine procaryotique à partir de plantes transgéniques vers des microorganismes du sol est un risque théorique mais qu'il n'a pas de réalité à ce jour. Il n'a été démontré ni en conditions naturelles ni en conditions expérimentales ;
- la probabilité de transfert d'un gène de résistance à un antibiotique de la plante vers les bactéries est très faible compte tenu de la réunion de l'ensemble des conditions qui permettrait qu'un tel transfert ait lieu ;
- la prévalence naturelle des gènes de résistance à la kanamycine et à l'ampicilline est très élevée dans les bactéries telluriques, le tractus digestif de l'animal et de l'homme ;
- l'utilisation d'antibiotiques comme facteur de croissance en nutrition animale et leur emploi en médecine humaine et vétérinaire sont reconnus comme une source majeure d'émergence et de diffusion des résistances aux antibiotiques.

En l'état actuel des connaissances, la consommation par l'homme ou les animaux de produits alimentaires composés ou issus de plantes génétiquement modifiées contenant des gènes de résistance à la kanamycine et/ou à l'ampicilline ne présente en conséquence qu'un risque théorique et en tout état de cause négligeable pour la santé humaine et animale au regard de la présence de ces gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries de l'environnement. Si les constructions avec l'ampicilline comme marqueur de sélection du vecteur transformant sont désormais débarrassées de ce genre de marqueur, les méthodes substitutives qui permettraient de s'affranchir de marqueur de sélection végétale (type kanamycine) sont encore en développement et nécessitent d'être validées.

Pour les constructions à venir, comme le prévoit la directive 2001/18/CE, il convient de recommander d'éviter, la présence, dans des plantes génétiquement modifiées destinées à la consommation humaine et animale, de gènes de résistance à un antibiotique susceptible d'avoir des effets préjudiciables sur la santé humaine et animale.

¹⁸ Cette question a déjà été examinée par un collège d'experts dans le cadre d'un séminaire conjoint des commissions du génie génétique et du génie biomoléculaire en janvier 1999 et conduit à la signature en janvier 2000 d'un avis conjoint de ces deux instances scientifiques.

**Cas des
microorganismes
génétiquement
modifiés**

Bien qu'aucun microorganisme génétiquement modifié destiné à la consommation humaine ou animale n'ait encore reçu d'autorisation de mise sur le marché dans l'Union européenne, l'utilisation de gènes de résistance à un antibiotique comme marqueurs de sélection pourrait présenter un risque non négligeable de transfert de ces gènes à des bactéries de la flore intestinale, les barrières génétiques (telles que promoteurs eucaryote/procaryote, présence de système de restriction) n'existant plus ou n'étant plus aussi efficaces.

Il convient donc d'être beaucoup plus restrictif sur l'utilisation de gènes de résistance à un antibiotique comme marqueur de sélection, chez des microorganismes¹⁹ destinés à la consommation humaine ou animale.

¹⁹ Certains microorganismes utilisés en production alimentaire possèdent des résistances intrinsèques à des antibiotiques. Il n'y a pas de raison d'exclure de tels microorganismes comme organisme receveur pour autant qu'il aura été vérifié que ces gènes de résistance ne sont pas portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons et intégrons) du microorganisme.

ANNEXE 1

PUISSANCE DU TEST STATISTIQUE DES ESSAIS SUR ANIMAUX CIBLES DANS LE CADRE DE L'EVALUATION DES RISQUES LIES A LA CONSOMMATION D'ORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES

Les essais sur animaux cibles ont pour objectif de **montrer que l'incorporation d'OGM dans la ration n'a pas d'effet néfaste sur un certain nombre de critères zootechniques** à définir, soit **l'équivalence** de ces critères entre les animaux recevant un aliment à base de nouvelles variétés de plantes et les animaux recevant un aliment à base de variétés de plantes non modifiées. Or, "les expériences [classiques] sont destinées à la mise en évidence d'une **différence** entre deux ou plusieurs traitements. Il se pourrait, cependant, que le but de l'expérimentateur soit de prouver qu'il n'existe pas de différence entre ces traitements. On sait qu'on ne peut se contenter d'effectuer le test habituel en espérant qu'il sera non significatif, car un résultat non significatif veut seulement dire qu'on n'a pas réussi à prouver que la différence existait. De plus, il suffirait pour avoir un résultat non significatif de travailler sur des effectifs très réduits"[27].

Lors de ces essais, il est nécessaire d'utiliser un nombre d'animaux suffisant pour assurer une **puissance du test statistique**²⁰, c'est à dire une **probabilité de mettre en évidence une différence donnée**, suffisante et contrôlée.

"La puissance d'un test peut être comparée à celle d'une loupe : si on perçoit un signe, on peut affirmer son existence; si on ne le perçoit pas, on ne peut affirmer qu'il n'existe pas, peut-être serait-il perceptible avec une loupe plus puissante." [28]

Le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention d'une puissance donnée dépend de plusieurs facteurs :

- la variabilité naturelle du caractère étudié : plus le caractère est naturellement stable dans une population, plus il est facile de mettre en évidence une petite différence ;
- la puissance désirée, définie *a priori* (i.e. avant la réalisation du protocole) : plus la puissance désirée est élevée, plus le nombre d'animaux nécessaire est élevé ;
- la différence que l'on veut pouvoir mettre en évidence : plus cette différence est faible, plus il faut d'individus ;
- le risque de première espèce α consenti (classiquement : 5%) ;
- le caractère unilatéral ou bilatéral du test statistique : en pratique, on pourra utiliser un test **bilatéral** si l'effet néfaste correspond à une diminution **ou** à une augmentation du paramètre étudié. On pourra utiliser un test **unilatéral** si l'effet néfaste se traduit par une variation du paramètre dans un seul sens, connu *a priori*²¹.

La méthode statistique permet de calculer une taille minimale d'échantillon en fonction de cette différence, du risque α consenti (généralement 5%), de la puissance souhaitée, de la variabilité du caractère étudié et du caractère bilatéral ou unilatéral du test effectué. Une illustration de ce calcul est donnée plus loin.

²⁰ La puissance d'un test statistique correspond à la probabilité de conclure à une différence statistiquement significative, si celle-ci existe réellement. Cette notion ne doit pas être confondue avec le risque α , de valeur généralement choisie 5%, correspondant à la probabilité de conclure en une différence significative en l'absence de différence réelle.

²¹ Par exemple, si le paramètre étudié est le Gain Moyen Quotidien (GMQ), l'effet néfaste est une **diminution** du GMQ (une augmentation du GMQ n'est *a priori* pas considéré comme un effet néfaste) : on utilisera un test unilatéral. Si le paramètre est une sécrétion d'hormone, l'effet néfaste peut être une augmentation **ou** une diminution de la sécrétion : on utilisera un test bilatéral. Nota : Si l'objectif des essais est d'assurer une stricte équivalence entre OGM et non OGM (pas de variation du paramètre désirée, quel qu'en soit le sens) : on utilisera toujours un test bilatéral.

Pour calculer le nombre de sujets à étudier, il faut donc définir **la différence que l'on veut pouvoir démontrer** entre un groupe témoin et un groupe traité. Plus cette différence "**biologiquement significative**" sera faible, et plus il faudra d'animaux pour une même puissance.

La différence à mettre en évidence peut être exprimée soit par un pourcentage de variation acceptable (différence de 1%, 2%, ...), soit une valeur de variation acceptable (différence de 1 unité, 2 unités, ...). L'expression de cette différence en nombre d'écart-type peut permettre de s'affranchir de la fixation d'une différence pour chaque paramètre (cf. illustration plus loin).

En pratique, il convient de définir :

- le caractère unilatéral ou bilatéral du test statistique nécessaire, selon le paramètre étudié :
 - si l'effet néfaste correspond à une diminution du paramètre (l'augmentation du paramètre n'est pas considéré comme néfaste) : test unilatéral ;
 - si l'effet néfaste correspond à une augmentation du paramètre (la diminution du paramètre n'est pas considéré comme néfaste) : test unilatéral ;
 - si l'effet néfaste correspond à une augmentation **ou** à une diminution du paramètre, ou si l'objectif est strictement un objectif d'équivalence entre OGM et non OGM (pas de variation du paramètre souhaitée, ni dans un sens, ni dans l'autre) : test bilatéral ;
- les principaux indicateurs biologiques, noté F permettant de montrer une différence de comportement physiologique des animaux après ingestion d'OGM ;
- pour chacun de ces critères, un seuil de variation, noté r ou d considéré comme **biologiquement significatif** ;
- la puissance du test statistique minimale, noté x , considérée comme nécessaire pour ces essais ;

Les essais sur animaux cibles devront montrer qu'il n'existe pas de différence statistique significative au seuil $\alpha\%$ pour le facteur F (test unilatéral/test bilatéral) entre des animaux témoins et des animaux nourris avec des OGM, le protocole devant pouvoir mettre en évidence une différence de r (%) (ou de d écart-types²²) avec une puissance de x %.

Illustration d'un calcul de détermination d'un nombre d'animaux selon le choix des paramètres statistiques

A partir de résultats de diverses expériences de mesure d'un paramètre biologique, réalisées sur 60 poulets, on évalue la variabilité "naturelle" irréductible de ce paramètre biologique.

Cette variabilité peut être estimée quel que soit le protocole expérimental (carré latin, bloc complet équilibré, bloc incomplet déséquilibré, ...), après prise en compte des divers effets contrôlés par l'expérimentateur (effet traitement ou effet bloc par exemple). En pratique, si l'on considère que la variance de ce paramètre est la même dans tous les groupes (témoins et traités), la meilleure estimation de cette variabilité est la variance résiduelle obtenue suite à analyse de variance.

A partir des groupes "témoins" (14 individus), on estime la moyenne d'une population nourrie à l'aide d'une ration normale.

A l'aide de ces deux estimations, il est possible de calculer un ordre de grandeur du nombre de sujets nécessaires dans chaque groupe (témoins et traités) pour assurer une **puissance** donnée, selon le pourcentage de différence par rapport à la moyenne que l'on **veut** pouvoir mettre en évidence.

²² Voir exemple

Si on appelle s^2 l'estimation de la variabilité du caractère étudié (s est donc l'écart-type), $a = 5\%$ le risque de première espèce consenti par l'expérimentateur, b le risque de seconde espèce ($1 - b$ est donc la puissance), r le pourcentage de diminution (ou d'augmentation) du caractère que l'on considère comme **biologiquement** significatif et m l'estimation de la moyenne, on obtient le nombre de sujets nécessaire n dans chaque groupe (témoins et traités) pour un test **unilatéral** selon :

$$n = \frac{2 s^2}{(r m)^2} (t_{2n-2, 1-a} - t_{2n-2, b})^2 \quad (1);$$

où $t_{2n-2, 1-a}$ est le percentile $(1-a)$ d'une distribution de Student à $2n-2$ degrés de liberté, pour un test **bilatéral** selon :

$$n = \frac{2 s^2}{(r m)^2} (t_{2n-2, 1-a/2} - t_{2n-2, b})^2 \quad (1);$$

où $t_{2n-2, 1-a/2}$ est le percentile $(1-a/2)$ d'une distribution de Student à $2n-2$ degrés de liberté. La condition d'application de cette formule est une distribution normale du paramètre, de variance identique dans chacun des groupes.

Résultats (exemple : test unilatéral, $a = 5\%$):

$$m = 13.12$$

$$s = 0.31$$

r	rm	Puissance				
		80%	85%	90%	95%	99%
-1%	-0.13	68	79	94	119	173
-2%	-0.26	18	21	25	31	45
-3%	-0.39	9	10	12	15	21
-4%	-0.52	6	6	7	9	13
-5%	-0.66	4	5	5	6	9

Tableau 1 : nombre d'animaux nécessaire dans chaque groupe pour assurer une puissance donnée, selon la diminution relative du paramètre que l'on désire mettre en évidence (test unilatéral)²³

Lecture

Statistique : Pour avoir une puissance de 90%²⁴ de mettre en évidence une **diminution** du paramètre de 1% par rapport à la moyenne (soit une diminution de 0,13), il faut utiliser un minimum de **94** poulets par groupe. Pour une puissance de 99%, il faut **173** poulets par groupe.

Ou, plus pratique :

Si la **diminution** du paramètre dans le groupe traité est **réellement** de 1% (soit -0,13), on a au moins 90% de chance de la détecter à l'aide d'une expérience portant sur **94** poulets par groupe. Si, avec une telle expérience, le test unilatéral n'est pas significatif au seuil a de 5%, on pourra donc dire sans trop de chance de se tromper (moins de 10%) que la diminution réelle du paramètre liée à la consommation d'OGM est inférieure ou égale à 1%.

²³ Comme pour toute évaluation du nombre de sujets nécessaire à une expérimentation, ces chiffres, établis à partir d'estimations, ne sont à considérer que comme des ordres de grandeur.

²⁴ Les valeurs choisies ne sont fournies que pour illustrer l'exemple et ne préjuge en rien de la signification biologique des seuils de différences proposées.

Avec 173 poulets par groupe, on a au moins 99% de chance de détecter une différence inférieure ou égale à 1%.

On note que la variabilité résiduelle de ce caractère est très faible : il faut donc assez peu d'animaux pour mettre en évidence, avec une bonne puissance, une faible variation de ce critère.

Note: Le calcul précédent ne peut être effectué que par itérations. Un calcul plus direct de n peut être réalisé en utilisant l'approximation de la loi de Student par la loi Normale. Le calcul est alors direct :

- test unilatéral :

$$n = \frac{2 s^2}{(rm)^2} (e_{1-a} - e_b)^2 \quad (3)$$

où e_{1-a} est le percentile (1-a) d'une distribution normale centrée réduite ($e_{1-a} = 1,64$ si $a = 5\%$)

- test bilatéral :

$$n = \frac{2 s^2}{(rm)^2} (e_{1-a/2} - e_b)^2 \quad (3)$$

où e_{1-a} est le percentile (1-a/2) d'une distribution normale centrée réduite ($e_{1-a/2} = 1,96$ si $a = 5\%$), et e_b est le percentile **b** d'une distribution normale centrée réduite ($e_b = -0,84$ pour une puissance de 80%, $-1,28$ pour une puissance de 90%, $-1,64$ pour une puissance de 95% et $-2,33$ pour une puissance de 99%) [29]. La condition d'application de cette formule est une distribution normale du paramètre dans les deux populations et $n \geq 30$.

Généralisation

Il est possible d'exprimer la différence que l'on veut mettre en évidence, non pas en variation relative par rapport à la moyenne (paramètre r), mais en nombre d'écart-type (que nous nommerons d). Si, dans la formule (1) on remplace le paramètre rm par un paramètre ds , on obtient alors les formules :

- test unilatéral :

$$n = \frac{2}{(d)^2} (t_{2n-2,1-a} - t_{2n-2,b})^2 \quad (5)$$

- test bilatéral :

$$n = \frac{2}{(d)^2} (t_{2n-2,1-a/2} - t_{2n-2,b})^2 \quad (5)$$

qui ne dépendent plus de l'écart-type du paramètre s . Le paramètre d représente le nombre d'écart-type de différence que l'on veut pouvoir mettre en évidence. On obtient le tableau suivant :

	Puissance				
d	80%	85%	90%	95%	99%
1/4	199	231	275	348	506
1/2	51	59	70	88	128
1	14	16	18	23	33
3/2	7	8	9	11	16
2	5	5	6	7	10

Tableau 2 : nombre d'animaux nécessaire dans chaque groupe pour assurer une puissance donnée, selon la diminution du paramètre que l'on désire mettre en évidence (unité : nombre d'écart-type, $a = 5\%$, test unilatéral)

Lecture

Pour mettre en évidence une diminution de 1 écart-type entre le groupe témoins et le groupe traité avec une puissance de 95%, il faut utiliser 28 individus dans chaque groupe.

	Puissance				
<i>d</i>	80%	85%	90%	95%	99%
1/4	253	289	338	417	590
1/2	64	73	86	106	149
1	17	19	23	28	39
3/2	9	10	11	13	18
2	6	6	7	8	11

Tableau 3 : nombre d'animaux nécessaire dans chaque groupe pour assurer une puissance donnée, selon la diminution du paramètre que l'on désire mettre en évidence (unité : *nombre d'écart-type*, $\alpha = 5\%$, test bilatéral)

Lecture

Pour mettre en évidence une modification (diminution ou augmentation) de 1 écart-type entre le groupe témoins et le groupe traité avec une puissance de 95%, il faut utiliser 28 individus dans chaque groupe.

Ces tableaux sont en théorie applicables pour tous paramètres de distribution normale dans une population.

ANNEXE 2 : BIBLIOGRAPHIE

- [1] Directive 90/220/CEE du Conseil du 23 avril 1990 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement. JOCE L117, 08-05-90, p. 15-27.
- [2] Règlement (CE) n°258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. JOCE L43, 14-02-97, p; 1-7.
- [3] Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil. JOCE L106, 17-04-2001,p; 1-39.
- [4] Livre Blanc sur la sécurité alimentaire. Commission des communautés européennes, COM (1999) 719 final, 12-01-2000.
- [5] Recommandations de la Commission du 20 juillet 1997, concernant les aspects scientifiques relatifs à la présentation des informations requises pour étayer des demandes d'autorisations de mise sur le marché de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires et l'établissement des rapports d'évaluation initiale au titre du règlement (CE) n° 258/97 du parlement et du Conseil. JOCE L253, 16-09-97, p1-28.
- [6] B.26. Essai de toxicité subchronique par voie orale ; toxicité orale à doses répétées – rongeurs : 90 jours. Directive 96/54/CE de la Commission du 30 juillet 1996, portant 22^{ème} adaptation au progrès technique de la directive 67/548CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses. JOCE L248 30-09-96.
- [7] Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : toxicité orale à doses répétées – rongeurs : 90 jours n° 408, 1998
- [8] Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001.
- [9] Avis conjoint des commissions du génie génétique et du génie biomoléculaire, 4 janvier 2000 publié dans le rapport d'activité 1999 de la Commission du Génie Biomoléculaire.
- [10] Gènes de résistance aux antibiotiques et plantes transgéniques. Ed. L. Clavilier, F. Hervieu, O. Letodé. INRA Editions. ISBN : 2-7380-0967-0.
- [11] Kocabiyik S., Perlin M.H. (1992). Altered substrate specificity by substitutions at Tyr218 in bacterial aminoglycoside 3'-phosphotransferase-II. FEMS Microbiology Letters, 93, 199-202.
- [12] Bongaerts C.P.A., Kaptijn G.M.F. (1981). Aminoglycoside phosphotransferase-II-mediated amikacin resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 20, 344-350.
- [13] Blasquez J., Martinez J.L., Baquero F. (1993). Bleomycin increases amikacin and streptomycin resistance in *Escherichia coli* harboring transposon Tn5. Antimicrob. Agents Chemother., 37, 1982-1985.
- [14] Perlin M.H., Lerner S.A. (1982). Decreased susceptibility to 4'-desoxy-6'-N-methylamikacin (BB-K311) conferred by a mutant plasmid in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 22, 78-82.
- [15] Perlin M.H., Lerner S.A. (1979). Amikacin resistance associated with a plasmid-borne aminoglycoside phosphotransferase in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 16, 598-604.
- [16] Perlin M.H., Lerner S.A. (1986). High-level amikacin resistance in *Escherichia coli* due to phosphorylation and impaired aminoglycoside uptake. Antimicrob. Agents Chemother., 29, 216-224.

- [17] Bertolla F., Simonet P. (1999). Horizontal gene transfers in the environment : natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms Res. Microbiol., 150, 375-384.
- [18] Demanèche S. *et al* (2001). Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA. Appl. Environ. Microbiol., 67, 293-299.
- [19] Poly F. *et al* (2000). Differences between linear chromosomal and supercoiled plasmid DNA in their mechanisms and extent of absorption on clay minerals. Langmuir, 16, 1233-1238.
- [20] Abraham E.P. and Chain E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature, 146, 837.
- [21] Duval-Iflah Y. *et al* (1982). Implantation précoce d'une souche d'*Escherichia coli* dans l'intestin de nouveau-nés humains : effet de barrière vis-à-vis de souches de *E. coli* antibiorésistantes. Ann. Microbiol., 133A, 393-408.
- [22] Directive 70/524/CEE du Conseil du 23 novembre 1970 concernant les additifs dans l'alimentation des animaux. JOCE L270, 14-12-70
- [23] Sanders, P. (2001). Résistance aux antibiotiques en pratique vétérinaire, état des lieux et mesures de prévention. Antibiotiques, 3, 225-232.
- [24] Anonyme (28 may 1999). Opinion of the scientific steering committee on antimicrobial resistance. European Commission.
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out50_en.pdf
- [25] Weber P., Durand-Héraud C. et le réseau Epiville (2000). Etat actuel de la sensibilité à dix antibiotiques des bactéries isolées d'infections non urinaires en médecine de ville : enquête multicentrique Epiville 1997-1998. Méd. Mal. Infect., 30, 745-752.
- [26] Soussy C.J. *et al* (2000). Sensibilité aux antibiotiques de souches d'*Escherichia coli* isolées en 1998 et 1999 : résultats d'une étude multicentrique française. Méd. Mal. Infect., 30, 650-655.
- [27] Lelouch J., Lazar P. (1991). Méthodes statistiques en expérimentation biologique. Collection statistique en biologie et en médecine. Médecine-Sciences, Flammarion, page 233.
- [28] Schwartz D. (1996). Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 4^{ème} édition, Collection statistique en biologie et en médecine. Médecine-Sciences, Flammarion, 1991, page 42.
- [29] Bouyer J. (1997). Méthodes statistiques Médecine, Biologie, ESTEM Editions INSERM, p.167.
- [30] Flachowsky G. Aulrich K., Böhme H. Daenicke R. (2000). GMO in animal nutrition – Results of experiments at our institute. Proceedings of the 6th international feed production conference. Piacenza. 27-28 November 2000.
- [31] Faust M. and Spangler S.M. (2000). Nutritive value of silages from MON 810 Bt and non Bt near-isogenic corn hybrids. J. Dairy Sci. 83 (suppl.1), 1184 (Abstr.).
- [32] Barrière Y., Vérité R., Brunshwig P., Surault F. and Emile J.C. (2001). Feeding value of corn silage estimated with sheep and dairy cows is not altered by genetic incorporation of BT 176 resistance to *Ostrinia nubilalis*. J. Dairy Sci. 84, 1863-1871.
- [33] Hammond B.G., Vicini J.L., Hartnell G.F. Naylor M.W., Knight C.D., Robinson E.H., Fuchs R.L. and Padgett S.R. (1996). The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. J. Nutr. 16, 717-727.

ANNEXE 3

PERSONNES AYANT CONTRIBUE A L'ELABORATION DE CET AVIS

LE COMITE D'EXPERTS SPECIALISE BIOTECHNOLOGIE

Louis Aimé AUMAITRE
Pierre BESANCON
Pascal BOIREAU
Pierre BOISTARD
Michel BRANCHARD
Gérard BRANLARD
Gérard CORTHIER
Charles DIVIES
Louis-Marie HOUDEBINE
Philippe JOUDRIER
Jean-Luc JUNG

Nicolas LINDLEY
Guy MOULIN
Alain PARIS
Gérard PASCAL
Thierry PINEAU
Patrick PRUNET
Alain RAYNAL
Maxime SCHWARTZ
Pierre THURIAUX
Valérie VASSEUR
Jean-Pierre ZALTA

PERSONNES AYANT CONTRIBUE PLUS DIRECTEMENT A LA QUESTION 1

Louis Aimé AUMAITRE
Pierre BOISTARD
Louis-Marie HOUDEBINE
Joël GUILLEMAIN
Alain PARIS

Régis POUILLOT
Maxime SCHWARTZ
Pierre THURIAUX
Jean-Pierre ZALTA
Jean-Luc VOLATIER

PERSONNES AYANT CONTRIBUE PLUS DIRECTEMENT A LA QUESTION 2

Georges BORIES (CES Alimentation animale)
Francine CASSE (Commission du Génie Biomoléculaire)
Bernard CHEVASSUS-AU-LOUIS (Commission du Génie Biomoléculaire)
Léa CLAVILIER (Commission du Génie Génétique)
Yvonne DUVAL (Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif – INRA)
Patrick FACH (Unité biotechnologie – AFSSA)
Marc FELLOUS (Commission du Génie Biomoléculaire)
Jean-François GUILLOT (CES Alimentation animale)
Roland LECLERCQ (CES Alimentation animale)
Roland ROSSET (Commission du Génie Génétique)
Pascal SANDERS (CES Alimentation animale)
Maxime SCHWARTZ (CES Biotechnologie)
Gilles Eric SERALINI (Commission du Génie Biomoléculaire)
Pascal SIMONET (Commission du Génie Génétique)
Pierre THURIAUX (CES Biotechnologie)
Jean-Pierre ZALTA (CES Biotechnologie)

PERSONNES CONSULTEES SUR LA QUESTION 2

Patrick BERCHE (U. 411 – INSERM)
Ekkehard COLLATZ (LRMA – INSERM)
Patrice COURVALIN (Institut Pasteur)
Laurent GUTMANN (Hôpital Européen Georges Pompidou)
Alain TOPPAN (Biogemma)