



ANNEE 2002

THESE : 2002 - TOU 3 - 4008

LES ANIMALERIES POUR ANIMAUX TRANSGENIQUES : LEGISLATION ET AGREMENTS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

Delphine, Geneviève, Louise DENAIS
Née, le 29 décembre 1976 à BOURGES (Cher)

Directeur de thèse : M. le Professeur Pau CABANIE

JURY

PRESIDENT :

M. Claude CARATERO

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Paul CABANIE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mlle Christelle CAMUS

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Corps professoral

A notre Président de thèse,

Monsieur le Professeur Claude CARATERO,
Professeur des Universités,
Praticien hospitalier,
Histologie - Embryologie,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Paul CABANIE,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Histologie - Anatomie pathologique,

Qui nous a aidé et guidé dans l'élaboration de ce travail.

Qu'il trouve ici la marque de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Mademoiselle le Docteur Christelle CAMUS,
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Biologie Cellulaire et Moléculaire,

Qui a aimablement accepté de participer à notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

Mademoiselle le Docteur Anne-Dominique DEGRYSE,
Responsable du Service de Zootechnie,
Centre de Recherche Pierre Fabre,

Qui nous a accueilli et guidé dans le domaine des Sciences de l'Animal de
Laboratoire.

Qu'elle trouve ici l'expression de toute notre gratitude.

A mes parents, pour m'avoir permis de toujours réaliser mes rêves et d'être heureuse,
Tout mon amour et ma reconnaissance,

A toute ma famille, même ceux qui pensent que les animaux transgéniques ne sont pas un progrès pour l'homme,
A mes grands parents, en espérant qu'ils soient fiers de moi

A Laurence, pour m'avoir toujours supportée pendant de si longues années malgré la distance,
A Stéphanie,
A mes amis parisiens et « bonnois »,

A Lilique et David,

A Pomone et ses grands dons d'entremetteuse,

A Titi, Doogie, Fred, Fabien, Patrick, Tony et Max, en souvenir de nos soirées ensemble, de la Féria de Céret, de la vie à la Cité et pleins d'autres moments passés avec eux
A Domi et Mylène,

A l'Amicale, pour tous les petits bonheurs qu'elle m'a procuré pendant trois ans,
A Colette et Lulu,

A l'ensemble du personnel du Service de Zootechnie du Centre de Recherche Pierre Fabre,
pour m'avoir accueillie,
Ainsi qu'aux amis que j'ai rencontrés à Castres,

A Stanislas, pour ce qu'il a été, ce qu'il est et ce qu'il sera toujours pour moi,
Toute ma tendresse et mon amitié.

SOMMAIRE

Introduction	15
Partie I : Les animaux transgéniques : Obtention et utilisation en recherche biomédicale et pharmaceutique	
I. Qu'est ce qu'un animal transgénique ?	21
1. L'information génétique	21
1.1. Historique	21
1.2. Qu'est ce qu'un gène ?	23
1.2.1. L'ADN, le support moléculaire de l'information génétique	23
1.2.2. De l'ADN à la protéine	24
1.2.3. La structure d'un gène	26
1.3. Les moyens d'études des gènes	27
2. La transgénèse	28
2.1. Historique	28
2.2. Définitions	30
2.2.1. Transgénétique	30
2.2.2. Organismes Génétiquement Modifiés (OGM)	30
II. Les différentes méthodes de transgénèse	32
1. Microinjection pronucléaire	34
1.1. Principe	34
1.2. Les différentes étapes	34
1.2.1. 1 ^{ère} étape : Préparation de la solution d'ADN injectée	35
1.2.2. 2 ^{ème} étape : Récolte des œufs fertilisés	35
1.2.3. 3 ^{ème} étape : Micro-injection	36
1.2.4. 4 ^{ème} étape : Réimplantation	38
1.2.5. 5 ^{ème} étape : Identification des souriceaux transgéniques	38
1.3. Résultats	39
1.4. Avantages et inconvénients	40
1.4.1. Avantages	40
1.4.2. Inconvénients	40
2. Infection rétrovirale	41
2.1. Principe	41

2.2. Les différentes étapes	41
2.2.1. Construction des vecteurs rétro-viraux	41
2.2.2. Infection des embryons	43
2.3. Résultats de l'intégration du transgène	43
2.4. Avantages et inconvénients	43
3. Manipulation de cellules ES et recombinaison homologue	44
3.1 Les deux principes fondamentaux de cette technique	44
3.1.1. Les cellules ES	44
3.1.2. Principe de la méthode par recombinaison homologue	44
3.1.2.1. Le « Knock-out »	45
3.1.2.2. Le « Knock-in »	46
3.2. Les différentes étapes	47
3.2.1. Culture des cellules ES	47
3.2.2. Manipulation du génome des cellules ES	48
3.3. Avantages et limites de cette technique	48
4. Technique cre-lox	50
5. Autres techniques	52
III. Utilisation des animaux transgéniques en expérimentation animale	53
1. Quelques exemples d'utilisation des animaux transgéniques	53
1.1. En tant que modèles de maladies ou de pathologies	53
1.1.1. Dans l'étude de l'athérosclérose	54
1.1.2. Dans l'étude de la douleur	54
1.2. Utilisation des animaux transgéniques dans les études de toxicologie	54
2. Limites de l'utilisation des animaux transgéniques	55
2.1. La standardisation microbiologique	55
2.2. La standardisation génétique	56
2.3. Les problèmes éthiques	57
2.3.1. L'expérimentation animale en elle-même	57
2.3.2. Les modifications et manipulations génétique	57
2.3.3. Les conséquences des modifications génétiques	58
3. Quelques recommandations pour l'utilisation des animaux transgéniques	59

Partie II : Législation

I. Bases de la législation applicable dans le cas de l'utilisation des animaux transgéniques	63
1. Les risques de l'utilisation des OGM	63
1.1. Notions de risque et de danger	63

1.2. Les différents risques dus à l'utilisation d'OGM	64
1.2.1. Les risques des opérations de recombinaison génétique	64
1.2.2. Les risques dus à l'utilisation des animaux transgéniques	65
2. Comment prévenir ces risques : bases de la législation	65
2.1. L'évaluation des risques	65
2.2. Les méthodes de prévention	66
2.2.1. Réduire les sources de risques	66
2.2.2. Réduire l'exposition aux sources de risques	67
II. Au niveau européen	69
1. L'Union Européenne	69
1.1. Historique	69
1.2. Les institutions européennes	70
1.2.1. Le Conseil de l'Union Européenne	71
1.2.2. La Commission Européenne	71
1.2.3. Le Parlement Européen	72
1.3. Principe de fonctionnement de la législation européenne	73
1.3.1. Les actes contraignants	74
1.3.1.1. Le Règlement	74
1.3.1.2. La Directive	74
1.3.1.3. La Décision	74
1.3.2. Les actes non contraignants	75
1.3.2.1. Les Avis et les Recommandations	75
1.3.2.2. Les Résolutions	75
1.3.2.3. Autres documents	75
2. La législation européenne : la Directive 90/219/CEE et les textes rattachés	76
2.1. Définitions de quelques termes	77
2.1.1. Micro-organisme génétiquement modifié	77
2.1.1.1. Définition	77
2.1.1.2. Techniques conduisant à des modifications génétiques au sens de la loi	77
2.1.1.3. Champ d'exclusion de la Directive	78
2.1.2. Utilisation confinée	79
2.1.3. Notification	79
2.1.4. Accident	79
2.1.5. Utilisateur	79
2.2. Classes de risque et mesures de confinement	80
2.2.1. Evaluation	80
2.2.1.1. Les critères à prendre en compte	80
2.2.1.2. La procédure d'évaluation	81

2.2.2. Les différentes classes de risque	81
2.2.3. Les mesures de confinement	82
2.3. La notification et les procédures relatives	84
2.3.1. Contenu du dossier de notification	84
2.3.2. Cas de l'utilisation de MGM de classe 1	84
2.3.3. Cas de l'utilisation de MGM de classe 2	84
2.3.4. Cas de l'utilisation de MGM de classe 3 ou 4	85
2.3.5. Modifications des informations	86
2.3.6. Confidentialité et information du public	86
2.4. Rôles de (ou des) autorité(s) compétente(s)	87
2.4.1. Désignation des autorités compétentes	87
2.4.2. Rôles	87
2.4.2.1. Examen et vérification des notifications	87
2.4.2.2. Vérification des plans d'urgence	87
2.4.2.3. Inspections	87
2.5. Mesures à suivre en cas d'accident	87
2.6. Consultations et échanges d'information	88
III. Au niveau français : application de la législation européenne	89
1. Etat actuel de la législation de l'expérimentation animale	89
1.1. Bases législatives	89
1.2. Applications de la législation pour la conduite des expérimentations animales	90
1.2.1. Les animaux	90
1.2.2. Les expériences	91
1.2.3. Les expérimentateurs	91
1.2.4. Les établissements	91
1.3. Limites de cette législation	92
2. Législation française spécifique aux OGM	93
2.1. Les OGM : définition, classement et acteurs de la législation	93
2.1.1. Définitions	93
2.1.1.1. Techniques d'obtention d'OGM au sens de la loi	94
2.1.1.2. Techniques exclues du champ d'application de la loi	95
2.1.2. Classement des OGM	96
2.1.2.1. OGM du groupe I	96
2.1.2.2. OGM de groupe II	97
2.1.3. Les acteurs	97
2.1.3.1. L'exploitant	97
2.1.3.2. Les différents ministères	98
2.1.3.3. La Commission de Génie Génétique	98

2.1.3.3.1. Missions	98
2.1.3.3.2. Composition	99
2.1.3.3.3. Avis et recommandations	99
2.2. L'utilisation d'OGM à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement : définitions et obligations	100
2.2.1. Définitions	100
2.2.1.1. Utilisation	100
2.2.1.2. Installation	100
2.2.1.3. Exploitant	101
2.2.2. Obligations de l'exploitant et de l'utilisateur	102
2.2.2.1. Obligation de déclaration : l'agrément	102
2.2.2.2. Obligation de confinement et de respect des prescriptions	104
2.2.2.2.1. Le confinement	104
2.2.2.2.2. Le suivi des utilisations	104
2.2.2.3. Obligation d'information	105
2.2.2.3.1. Procédure d'information du public	105
2.2.2.3.2. Vis-à-vis du Ministre chargé de la Recherche et d'autres autorités administratives	106
2.2.2.4. Obligation de consultation de la Commission de Génie Génétique	107
2.3. Contrôle	108
2.3.1. Les agents de contrôle	108
2.3.2. Le mode de contrôle	109
2.3.3. Les infractions et les peines	109
3. Applications et limites de cette législation	112
3.1 Quelques chiffres concernant l'utilisation d'OGM en France	112
3.2. Limites	112

Partie 3 : Mise en place d'une animalerie pour animaux transgéniques

I. Organisation d'une animalerie pour animaux transgéniques	117
1. Principes généraux d'organisation d'une animalerie	117
1.1. Les différentes pièces d'une animalerie	118
1.2. Les caractéristiques physiques des pièces d'hébergement	119
1.3. Les paramètres environnementaux	119
1.3.1. Les paramètres environnementaux « classiques »	119
1.3.2. L'enrichissement du milieu et le bien-être des animaux	120
1.4. Les soins aux animaux	121

2. L'animalerie pour animaux transgéniques	121
2.1. Règles générales	121
2.2. Le confinement	122
2.2.1. Classement des animaux transgéniques	122
2.2.2. Les différents confinements selon la classe	123
2.2.2.1. Les animaleries A1	123
2.2.2.2. Les animaleries A2	124
2.2.2.3. Les animaleries A3	124
2.2.2.4. Les animaleries A4	124
II. L'agrément des animaleries pour animaux transgéniques	126
1. Les principes de l'agrément	126
2. La première demande d'agrément	127
2.1. Les conditions de la première demande d'agrément	127
2.2. Les dossiers de demande d'agrément	128
2.2.1. Pour les OGM de groupe I	128
2.2.2. Pour les OGM de groupe II	128
2.2.3. Conseils de rédaction des dossiers	128
2.3. L'instruction des dossiers de demandes	129
2.3.1. Envoi des dossiers	129
2.3.2. Instruction des dossiers	129
2.3.3. La notification de l'agrément	130
3. Le renouvellement d'agrément	131
3.1. Les conditions du renouvellement d'agrément	131
3.2. La procédure de renouvellement d'agrément	131
4. Modifications d'un agrément	132
4.1. Passage d'un groupe à un autre	132
4.2. Modifications de l'agrément dans le cas du groupe I	132
4.3. Modifications de l'agrément dans le cas du groupe II	132
Conclusion	135
Textes législatifs	139
Bibliographie	145
Annexes	157

INTRODUCTION

Issus du développement de la biologie et de la génétique moléculaires, les animaux transgéniques se sont révélés comme des outils performants et puissants dans le monde de la recherche biomédicale, notamment pour la mise au point de modèles de maladies humaines ou animales obtenus notamment par les techniques de transgénèse. La transgénèse est ainsi en passe de devenir un maillon important en médecine ou pathologie comparées.

Dans une première partie, nous tenterons de tracer l'historique de la transgénèse et d'en donner une définition, puis les différentes méthodes d'obtention d'animaux transgéniques seront évoqués, finalement nous donnerons quelques exemples d'utilisations de ce type d'animaux en recherche biomédicale et pharmaceutique ainsi que les limites et contraintes de leur utilisation.

Suite au développement important ces dernières années des techniques de modifications génétiques, une législation spécifique concernant la production et l'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM) que ce soit à des fins de recherche ou des fins industrielles s'est révélée nécessaire. La deuxième partie, après l'étude des bases de la législation concernant les OGM, examinera le dispositif législatif et réglementaire mis en place au niveau européen pour les OGM et sa déclinaison au niveau national.

Avant de mettre en place et d'initier des protocoles impliquant l'utilisation d'animaux transgéniques, il est important de comprendre les différents enjeux et de les évaluer. Les problèmes de temps, de coût financier, d'espace, de personnel et d'équipement nécessaires doivent être évalués et adaptés à chaque cas afin de faire les choix adéquats.

Enfin, dans une troisième partie, nous évoquerons les principes généraux devant être suivis pour la conception d'une animalerie ainsi que les dispositifs spécifiques pour les animaux transgéniques, et en particulier ceux concernant les mesures de confinement. Puis, nous exposerons la démarche à suivre en vue de l'obtention des agréments préalables et nécessaires.

PARTIE I

**LES ANIMAUX TRANSGENIQUES :
OBTENTION ET UTILISATION
EN RECHERCHE BIO-MEDICALE
ET PHARMACEUTIQUE**

Les modèles animaux de maladies humaines et animales, obtenus notamment par les techniques de transgénèse, apparaissent comme primordiaux pour comprendre les mécanismes pathologiques et chercher des remèdes possibles. La transgénèse est en passe de devenir un maillon important en médecine ou pathologie comparées. La souris est le système *in vivo* le plus utilisé pour ce type de recherches car les connaissances sur sa génétique et sa physiologie sont nombreuses et bien détaillées [107]. Cela s'explique par le fait que certaines techniques de transgénèse ne peuvent se faire, à l'heure actuelle, que chez la souris, que la génétique de la souris est très bien connue et que son élevage et son entretien sont peu coûteux [58]. Ainsi plusieurs milliers de lignées de souris ont été créées à travers le monde [22].

Mais la recherche médicale n'est pas la seule bénéficiaire de ces techniques et d'autres perspectives d'utilisation de ce type d'animaux sont également apparues telles que l'application de ces techniques aux animaux de rente pour différents buts zootechniques (lutte contre les maladies, amélioration des performances) ou thérapeutiques (production de protéines à usage thérapeutique) [58] et l'utilisation potentielle de tels animaux en tant que donneurs d'organes dans le cadre des xénogreffes [33, 23]. Il ne faut pas non plus oublier que la transgénèse est applicable aux plantes permettant ainsi, par exemple, la lutte contre certaines pathologies comme la pyrale du maïs [58].

Nous tenterons de tracer l'historique de la transgénèse et d'en donner une définition, puis les différentes méthodes d'obtention d'animaux transgénétiques seront évoqués, finalement nous donnerons quelques exemples d'utilisations de ce type d'animaux en recherche biomédicale et pharmaceutique ainsi que les limites et contraintes de leur utilisation.

I. Qu'est ce qu'un animal transgénétique ?

La notion fondamentale sur laquelle repose le développement des travaux de biologie moléculaire et de génie génétique est celle de l'universalité du vivant. Le support de l'information génétique, le caractère linéaire du génome et le code génétique sont universels et identiques pour tous les êtres vivants. Ainsi cette universalité a rendu possible la transgénèse végétale ou animale.

Quelques bases de génétique et de biologie moléculaire doivent être comprises afin d'explicitier l'historique du développement des techniques de transgénèse.

1. L'information génétique

1.1 Historique [34]

Le terme de gène date de 1909 et fut utilisé la première fois par le Danois Wilhem Johannsen, mais le gène n'est à cette époque qu'un objet théorique avec une existence supposée, non démontrée. La découverte de Thomas Morgan sur le positionnement chromosomique des gènes va enclencher le processus de recherche de la structure de l'information génétique.

Il faudra attendre 1944 pour la mise en évidence de sa structure chimique : Oswald T. Avery prouve que le matériel génétique est constitué d'acide désoxyribonucléique (ADN) [5].

Puis en 1953, James Watson et Francis Crick découvrent la structure en double hélice de l'ADN (voir Figure 1).

Au début des années soixante, un autre pas important est franchi avec la découverte du code génétique : Mashall Nirnberg et J. Heinrich Mattei, en 1961, déchiffrent le premier « mot » du code génétique et mettent ainsi en évidence l'existence d'un alphabet particulier entre l'ADN et les protéines : le code génétique. La fonction de l'ADN est démontrée : un fragment d'ADN permet la synthèse d'une protéine, d'où le concept classique « un gène code pour une protéine ».

Mais, en 1969, Jacob et Monod proposent l'existence d'une « substance » intermédiaire entre le gène et la protéine, cette hypothèse faisant suite à différentes observations. Cette substance, très instable, semble porter une information qui sera traduite en protéine grâce à l'intervention des ribosomes. Ainsi les ARN (acide ribonucléique) messagers sont découverts.

Cependant, le concept « **un** gène code pour **une** protéine » va encore être ébranlé par d'autres découvertes comme l'existence de séquences régulatrices situées en dehors des gènes mais essentielles pour la régulation de leur expression, la mise en évidence de séquences non codantes (ou introns) et de séquences codantes (ou exons) permettant d'obtenir à partir d'un même gène des produits différents grâce au phénomène d'épissage alternatif.

Ainsi, il semble qu'un gène permette l'élaboration de composants élémentaires qui ensemble interagissent pour engendrer les caractéristiques d'un individu [87].

Le développement de la génétique et de la biologie moléculaire est donc jalonné de nombreuses étapes (voir Tableau 1) conduisant à la mise au point de techniques diverses et variées.

1865	Enoncées des lois de l'hérédité par G. Mendel, le père de la génétique
1869	Mise en évidence des acides nucléiques dans le noyau par F. Miescher
1907	Théorie chromosomique de l'hérédité énoncée par T. Morgan
1909	Apparition du terme de gène par W. Johannsen
1944	Identification du support matériel des gènes par O. Avery : l'ADN
1953	Découverte de la structure moléculaire de l'ADN par F. Crick, R. Franklin, J. Watson et M. Wilkins
1965	Prix Nobel pour la découverte des ARN messagers et de la régulation génétique par F. Jacob, A. Lwoff et J. Monod
1966	Elucidation du code génétique grâce aux études initialement réalisées par F. Crick et G. Gamow
1973	Première application de la transgénèse à un organisme : <i>Escherichia coli</i>
1983	Mise au point de la technique de PCR (réaction de la polymérisation en chaîne)
1989	Lancement du programme international de séquençage du génome humain
1992	Publication de la première carte physique du génome humain
2000	Présentation de la première cartographie du génome humain

Tableau 1 : Quelques dates de l'histoire de la génétique (d'après [82] et [76])

1.2. Qu'est ce qu'un gène ?

1.2.1. L'ADN, le support moléculaire de l'information génétique [34]

Découvert par Avery en 1944, l'ADN ou acide désoxyribonucléique est une macromolécule avec une structure spatiale caractéristique en double hélice. L'ADN est une molécule bicaténaire formée de 2 brins antiparallèles, orientés et reliés entre eux par des liaisons chimiques faibles, les liaisons hydrogène. Chaque brin est constitué d'un enchaînement spécifique de nucléotides.

Le nucléotide, unité primaire de l'ADN, est formé par la condensation de 3 groupements chimiques [126] :

- un sucre, le désoxyribose dans le cas de l'ADN
- un groupement phosphate
- une base azotée.

L'ensemble composé par le désoxyribose et le groupement phosphate forme le squelette phosphodiester de la molécule d'ADN (voir Figure 1). Il existe 4 types de nucléotides différents selon la base azotée présente. C'est entre ces bases azotées que s'établissent les liaisons hydrogène maintenant les deux brins de l'ADN ensemble. Les bases azotées sont de 2 types :

- puriques : Adénine (A) et Cytosine (C)
- pyrimidiques : Thymine (T) et Guanine (G)

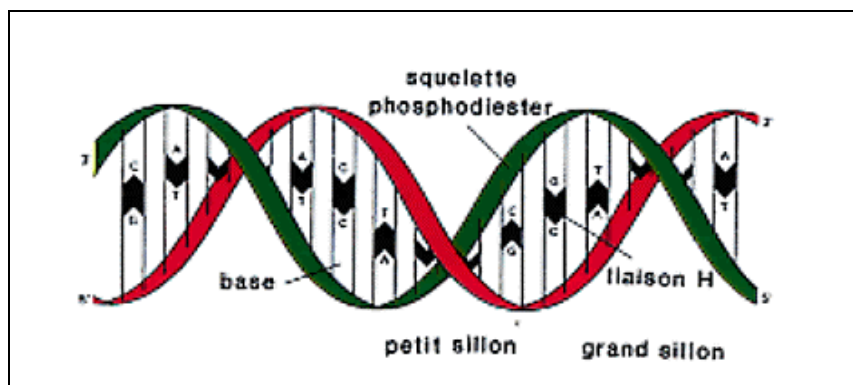


Figure 1 : Représentation schématique de l'ADN et de ses constituants
(d'après [27])

Chaque base d'un brin s'unit à une base complémentaire de l'autre brin par le biais de liaisons hydrogène. Celles-ci s'établissent toujours entre l'Adénine et la Thymine et entre la Cytosine et la Guanine. Ce phénomène est à la base du principe de complémentarité des bases. La taille d'un gène est généralement exprimée en kilobases (kb) ce qui correspond à 1000 paires de bases. Ainsi, la reconnaissance des bases azotées permet d'obtenir à partir d'une molécule d'ADN deux molécules identiques, cette réaction étant catalysée par une enzyme particulière, l'ADN polymérase. Ce phénomène est appelé répllication ou duplication de l'ADN et elle se fait selon un mode qualifié de semi-conservatif, chaque brin initial servant de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire (voir Figure 2).

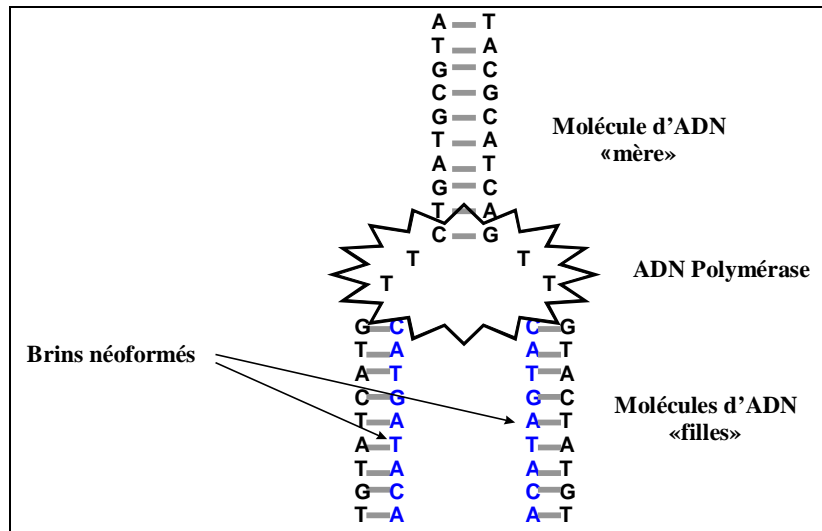


Figure 2 : Principe de la réplication de l'ADN (d'après [126])

L'enchaînement de ces différents types de base est la base de l'information génétique comme un alphabet de 4 lettres. La succession de 3 nucléotides constituent un codon. Généralement un codon est nommé par les initiales des 3 bases azotées des 3 nucléotides qui le constituent, par exemple ACT ou encore TTG. Ce codon suite au phénomène de traduction et de transcription code pour un acide aminé précis, suivant le code génétique. Ce code génétique est qualifié de dégénéré (un même acide aminé peut être codé par différents codons et certains codons ne codent pas pour un acide aminé mais pour la terminaison de la traduction, ce sont les codons non-sens), non chevauchant, sans ponctuation et universel (ce code est identique chez tous les êtres vivants).

Du fait des structures biochimiques très différentes de l'ADN et des protéines (qui sont des polypeptides, c'est-à-dire des polymères d'acides aminés), l'ADN ne sert pas directement de base à la synthèse des protéines. Des étapes intermédiaires sont nécessaires : il s'agit de la transcription et de la traduction.

1.2.2. De l'ADN à la protéine [34]

Une seconde molécule jouant un rôle primordial dans les processus permettant la synthèse protéique est l'ARN ou acide ribonucléique. Cette molécule sert à transférer les informations génétiques inscrites dans l'ADN qui se trouve au niveau du noyau de la cellule vers le cytoplasme où a lieu la synthèse des protéines.

C'est une molécule très semblable à l'ADN du point de vue biochimique : elle est également constituée d'une succession de nucléotides, plus exactement des ribonucléotides car au lieu d'un désoxyribose, c'est un ribose qui fait office de sucre. Il existe également 4 types de bases azotées : 3 sont communes avec l'ADN (Adénine, Cytosine et Guanine), la Thymine étant remplacée par l'Uracile (U). Contrairement à l'ADN, l'ARN est une molécule simple brin (sauf dans le cas de certains rétrovirus dont le matériel génétique est constitué d'une molécule d'ARN double brin).

Il existe différents types d'ARN selon leur structure et leur rôle :

- ARNm ou ARN messager constitue la forme sous laquelle le message génétique codé dans les gènes est transféré du noyau vers le cytoplasme. Cet ARN est une sorte de « copie » d'un gène, destinée à être utilisée, dans le cytoplasme, comme modèle (par les ribosomes), pour la synthèse d'une protéine (voir Figure 3). Pour être plus exact, il convient de préciser qu'il y a tout d'abord transcription de l'ADN en un pré-ARNm qui subira une étape de maturation conduisant à l'ARNm ;

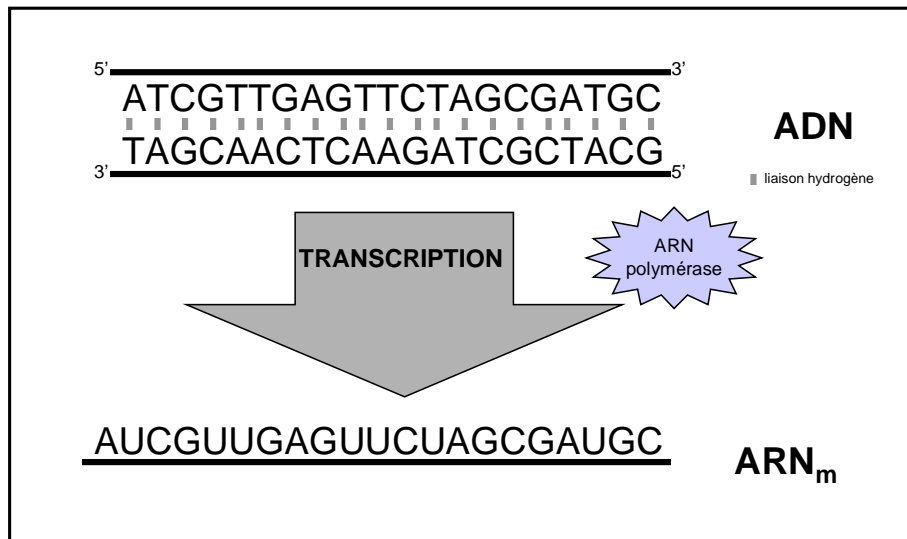


Figure 3 : Principe de la transcription de l'ADN en ARN (d'après [126])

- ARNr ou ARN ribosomal, l'un des deux constituants des ribosomes qui sont des éléments nécessaires à la traduction de l'ARNm en enchaînement d'acides aminés ;
- ARNt ou ARN de transfert, courte molécule d'ARN de structure complexe, qui joue un rôle fondamental dans la synthèse des protéines. Il apporte les acides aminés jusqu'aux ribosomes et permet de faire coïncider le codon et l'acide aminé correspondant.

La molécule d'ADN, se trouvant dans le noyau, sert de patron à la synthèse de la molécule d'ARN. Cependant, l'ADN dans son intégralité n'est pas transcrit, il existe une régulation à ce niveau que ce soit au niveau des zones transcrites (il existe des zones codantes et d'autres non codantes) ou au niveau temporel (selon les besoins de l'organisme, certaines zones sont transcrites, alors que d'autres non). Les phénomènes de régulation sont nombreux et complexes. Ils permettent ainsi une régulation des protéines nécessaires à un moment donné, dans un organe donné.

Après avoir rapidement évoqué le principe de la synthèse des protéines, il est nécessaire de comprendre l'organisation d'un gène afin d'en expliciter le fonctionnement.

1.2.3. La structure d'un gène [34]

Bien que pendant longtemps, il était admis qu'un gène codait pour une protéine, les découvertes de la biologie moléculaire ont conduit à une évolution de ce concept. Il est donc maintenant admis qu'un gène peut conduire à la formation de plusieurs protéines différentes possédant des structures et donc des propriétés différentes. Ces protéines sont produites à des temps différents, selon les besoins de l'organisme. Pour cela, l'ADN doit être transcrit en différents ARNm qui, par traduction, donneront des protéines différentes.

Un gène est composé de séquences codantes, appelées exons, et de séquences non codantes, appelées introns. En général, les introns sont des séquences plus longues que les exons. L'ensemble de ces séquences compose les gènes structuraux. Lorsque l'ADN est transcrit, il donne un pré-ARN messager (qui correspond à la transcription totale de l'ADN) qui va subir des transformations permettant des régulations. Ainsi à partir d'un pré-ARN messager, il est possible d'obtenir plusieurs ARN messagers selon les séquences épissées. L'épissage alternatif, c'est-à-dire le fait d'éliminer ou non certaines séquences de l'ADN, est un mécanisme très précis qui se fait à une base près au niveau des zones de jonction entre les introns et les exons. Cependant, il se peut que tous les introns ne soient pas épissés, de même, il est possible qu'un exon soit épissé. L'épissage alternatif est donc un phénomène très important et nécessaire à la régulation de l'expression génétique [126].

Un gène possède également un certain nombre de séquences régulatrices se trouvant soit au niveau de l'ADN (en amont ou en aval de la zone transcrite) soit en dehors de l'ADN (éléments trans-régulateurs). En amont de la zone transcrite, se trouve le promoteur où se fixe les enzymes nécessaires à la transcription et ainsi que des séquences promotrices. D'autres séquences régulatrices avec des localisations variables qui influent sur la transcription : les « enhancers » qui activent la transcription et les « silencers » (ou répresseur) qui l'inhibent. Les éléments trans-régulateurs sont des facteurs qui se fixent au niveau de l'ADN et qui vont également moduler l'expression des gènes.

L'ensemble des séquences présentes au niveau de l'ADN peut être schématisé (voir Figure 4) ce qui permet de comprendre qu'un gène n'est pas seulement une séquence codante pour une protéine particulière mais aussi toutes les séquences adjacentes qui en modulent l'expression.

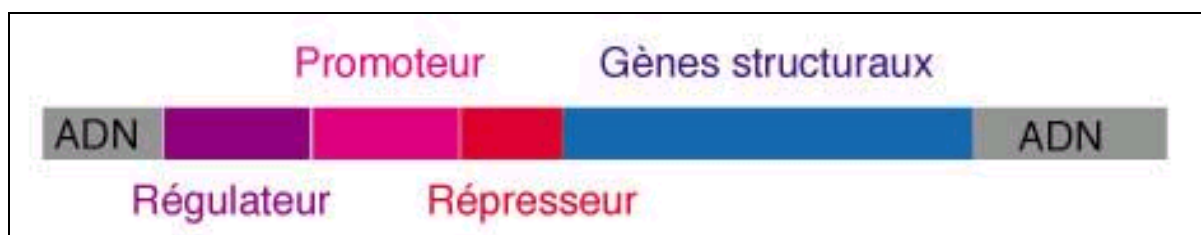


Figure 4 : Schéma d'un gène (d'après [49])

1.3. Les moyens d'études des gènes

Avant que les techniques de transgénèse ne soient disponibles, les chercheurs, notamment les généticiens, avaient compris l'intérêt que représentait l'étude des mutations pour la compréhension de la fonction des gènes. Cependant, les mutations qualifiées de naturelles avaient un intérêt limité : elles étaient repérées au hasard dans des élevages et ne concernaient, en général, que des modifications phénotypiques visibles comme la couleur du pelage, la morphologie ou encore le comportement [6].

Pour comprendre tous ces mécanismes et pour élucider le fonctionnement des gènes, des méthodes ont été mises au point. Ces techniques sont basées, en règle générale, sur des phénomènes « naturels » c'est-à-dire des événements qui se produisent effectivement dans le vivant.

Parmi ces techniques, il y a, par exemple, l'utilisation des enzymes de restriction qui permettent de « couper » l'ADN en des points très précis, la technique de Southern Blot (technique d'hybridation des molécules d'ADN entre elles), la technique utilisant la transcriptase reverse (enzyme permettant l'obtention à partir d'une molécule d'ARN, la molécule d'ADN correspondante). A cela s'ajoute l'élucidation du fonctionnement physiologique des plasmides qui a été l'étape préliminaire du clonage car ils représentent les premiers vecteurs capables d'importer des morceaux d'ADN dans des bactéries.

Toutes ces méthodes combinées ont permis de nombreuses manipulations : le transfert des gènes au niveau d'organismes unicellulaires pour en étudier le produit de synthèse et donc le rôle, l'utilisation de sondes d'ADN radioactives pour localiser un gène et/ou en connaître la taille, la création de banques d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN messager par l'utilisation de la transcriptase reverse. Toutes ces méthodes ont également conduit au fur et à mesure à la réalisation d'un grand projet : le séquençage du génome humain.

L'étude des gènes au niveau de cellules a permis de nombreuses découvertes mais les organismes vivants sont complexes et de nombreuses interactions entre les différentes cellules qui les composent existent. C'est pourquoi, il convient afin d'affiner nos connaissances de pouvoir étudier un gène au sein d'un organisme dans son intégralité.

Ainsi les techniques de transgénèse en permettant d'intégrer à un génome hôte un gène d'intérêt ont très largement contribué aux découvertes récentes et ces techniques sont devenues indispensables à toute recherche. Ces techniques ont également permis d'accéder aux souhaits de nombreux chercheurs : la modification à volonté du génome d'un animal et dans ce cas la souris se révèle être un modèle de choix, notamment en raison de sa petite taille et de son temps de reproduction court.

2. La transgénèse

Bien avant le développement des techniques de génétique moléculaire, les pathologistes cherchaient à explorer les mécanismes biologiques associés à des maladies héréditaires touchant l'homme ou l'animal. Au début, cette exploration n'a pu se faire que par le biais de l'utilisation de souches mutantes que l'on peut qualifier de naturelles [107].

Puis grâce au développement des techniques de transgénèse, le concept de créer des souches animales servant de modèle à des maladies pouvant toucher l'homme ou l'animal est devenu une réalité. Ainsi par l'utilisation de ces méthodes, l'étude *in vivo* de l'effet de gènes particuliers sur le métabolisme ou la physiologie a pu devenir une réalité.

2.1. Historique

Remarque : de nombreux termes apparaissant dans ce chapitre seront plus amplement explicités dans le chapitre II de cette même partie.

Le développement des techniques de transgénèse est lié aux nombreuses découvertes de génétique moléculaire [25, 100, 132].

Avant que les techniques de recombinaison de l'ADN ne soient disponibles, les sources de gènes en grande quantité étaient constituées par les virus. C'est pour cette raison que les premières expériences d'introduction d'ADN dans des embryons de souris consistaient en la micro-injection dans des embryons d'ADN provenant du SV40 (Simian Virus 40) [66].

Dans cette expérience, 40% des souris ainsi obtenues avaient intégré cet ADN dans leurs cellules. Mais ces souris étaient qualifiées de « mosaïques », ce qui signifie que seules certaines cellules avaient intégré cet ADN. D'autres expériences similaires ont également été réalisées avec le MoMLV (Moloney Murine Leukemia Virus : virus de la leucémie de la souris) prouvant ainsi que des provirus pouvaient être intégrés au niveau des cellules de la lignée germinale [64]. Ces deux expériences ont également permis de montrer le mécanisme d'action des virus et leur but n'était pas, à l'époque, d'obtenir des animaux transgéniques.

Un pas important dans la mise au point des techniques de transgénèse a été ensuite possible grâce à l'apparition des techniques de clonage des gènes. Le clonage consiste en la multiplication en un très grand nombre d'une séquence d'ADN donnée.

Des expériences ont été, par la suite, effectuées de façon à introduire cet ADN dans des cellules de souris par micro-injection. La première expérience de transgénèse « véritable » couronnée de succès est celle de Gordon [52]. Dans cette expérience, une séquence d'un gène étranger a pu être introduite dans le génome d'une souris et ce gène était ensuite transmis à la descendance. Pour se faire, une solution d'ADN (contenant un grand nombre de copies d'une séquence d'ADN correspondant à un gène) est micro-injectée au niveau d'un des pronucléi d'un œuf fertilisé. Cependant ce transgène, bien qu'intégré dans le génome des souris, n'était pas fonctionnel.

Heureusement, en 1982, Palmiter et son équipe obtiennent des souris transgéniques pour lesquelles le transgène est fonctionnel [96]. En micro-injectant le gène de l'hormone de croissance du rat combiné à un promoteur spécifique de la souris, ils obtiennent des souris qualifiées de « géantes ».

En 1985, cette technique est appliquée avec succès à d'autres espèces comme le lapin, le mouton ou le porc. [55]. Puis, des rats transgéniques seront obtenus par cette même méthode en 1996 et finalement des chèvres et des vaches. Cependant cette méthode chez les animaux de rente se révèle peu intéressante en raison de son coût trop élevé [58].

Parallèlement, d'autres méthodes de transgénèse sont mises au point en utilisant d'autres techniques telles que l'infection rétrovirale ou l'utilisation de cellules ES (ES pour Embryonic Stem cells ou cellules embryonnaires souches).

En ce qui concerne l'infection rétrovirale, les prémisses datent du milieu des années 70 avec les expériences de Jaenish notamment [64, 66]. L'ADN viral était transféré et intégré au génome animal avec succès, mais il n'était pas possible de choisir l'ADN intégré.

Les résultats de ces expériences ont conduit les chercheurs à développer et concevoir des techniques utilisant les virus, notamment les rétrovirus, en tant que vecteur pour des séquences d'ADN étranger choisies [118].

Dans le cas de l'utilisation des cellules ES, dès les années 70, des expériences ont été réalisées en utilisant des cellules embryonnaires de carcinomes et des cellules de tératocarcinomes [18, 83]. Les animaux ainsi obtenus étaient chimériques (ou mosaïques, c'est-à-dire que certaines cellules avaient intégré le transgène et d'autres non) [16].

Puis en 1981, l'établissement de lignées de cellules souches aux propriétés intéressantes [41] a permis une amélioration de cette technique fort prometteuse, et ainsi la technique des cellules ES a fait son apparition. Cette technique combinée au mécanisme de recombinaison homologue a permis d'obtenir des animaux transgéniques pour lesquels le ciblage était plus précis que ce soit au niveau même du transgène qu'au niveau des tissus cibles [6].

Le ciblage a pu ensuite être affiné en utilisant le système Cre-lox qui se base sur l'utilisation d'une enzyme particulière reconnaissant des sites spécifiques au niveau de l'ADN et permettant une recombinaison de l'ADN précise [110].

D'autres techniques sont également apparues, mais elles ne sont encore que très peu utilisées : le transfert de fragments entiers de chromosomes permettant d'obtenir des souris qualifiées de « transomiques » par opposition aux souris transgéniques [104], l'utilisation de vecteurs de type YAC (YAC pour Yeast Artificial Chromosome ou chromosome artificiel de levure) [98], ou encore la transfection de gamètes suivie d'une fécondation *in vitro* [74].

Par conséquent, la mise au point des différentes techniques de transgénèse est le fruit de nombreuses expériences menées en parallèle (voir Tableau 2).

1976	Obtention de souris transgéniques par infection rétrovirale d'embryons en cours de clivage
1980-1981	Obtention de souris transgéniques par micro-injection pronucléaire
1981	Etablissement de lignées de cellules ES
1986	Obtention de souris transgéniques par le biais de cellules ES génétiquement modifiées
1987	Début de la mutagenèse ciblée (cellules ES porteuse d'une mutation nulle dans le gène HPRT)
1989	Obtention de souris transgéniques via l'utilisation de cellules ES modifiées par la technique de recombinaison homologue
1994	Remaniements chromosomiques Création de mutations conditionnelles

Tableau 2 : Quelques étapes clefs du développement de la transgénèse animale

Bien que les techniques de transgénèse aient été en grande partie développées et appliquées à la souris, d'autres animaux transgéniques ont pu être obtenus : lapins, porcs, moutons [55], poissons [26] ou encore, tout récemment, singe [80].

2.2. Définitions

2.2.1. Transgénique

Le terme de « **transgénique** » est devenu, ces dernières années, de plus en plus présent que ce soit dans la littérature scientifique ou dans l'actualité. Il est apparu pour la première fois dans une publication scientifique en 1981 où il était utilisé pour qualifier des souris obtenues suite à une micro-injection de gènes dans un des pronuclei [51].

Le terme de « **transgénique** » s'applique à des organismes vivants, qu'ils appartiennent au règne végétal ou animal, dans lesquels ont été transférés des gènes étrangers d'origine animale ou végétale à leur patrimoine héréditaire propre. Le gène étranger, appelé « **transgène** », se transmet à la descendance selon un mode mendélien [70].

Dans un récent rapport de l'ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods ou centre européen pour la validation des méthodes alternatives) sur l'utilisation des animaux transgéniques dans l'Union Européenne, une définition des techniques de transgénèse est également donnée : « *la technique de transgénèse implique l'introduction de matériel génétique fonctionnel (ADN) au niveau de cellules germinales d'un organisme* » [10]. Le fait qu'il soit dit que l'ADN est introduit au niveau des cellules germinales sous-entend la notion de transmission héréditaire de cette nouvelle information génétique.

Mais la définition la plus récente des animaux ou végétaux transgéniques est suggérée par Beardmore : ce sont des « *organismes contenant des séquences intégrées d'ADN cloné (transgène), transférées en utilisant des techniques de génie génétique* » [9]. Cette définition est la plus générale et elle fait directement référence à la science à la base de cette révolution : le génie génétique.

2.2.2. Organismes Génétiquement Modifiés (OGM)

Bien que le terme de « **transgénique** » soit présent dans le langage courant, ce terme est absent de la législation applicable dans le cas de l'utilisation de tels organismes. Dans la législation, que ce soit au niveau européen ou au niveau français, il est fait mention d'« **organismes génétiquement modifiés** ». Mais il est vrai que cette définition est plus générale car d'une part elle englobe des techniques autres que celles utilisées en transgénèse (c'est-à-dire toutes les techniques de manipulation de l'ADN) et d'autre part elle concerne la globalité du règne vivant (animal ou végétal).

Par « **organisme génétiquement modifié** », il est entendu « *organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par multiplication ou recombinaison naturelles* ». Par le terme d'organisme, on entend « *toute entité biologique non cellulaire, cellulaire, ou multicellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique. Cette définition englobe les micro-organismes, y compris les virus* ». Cette définition provient de la loi française de référence dans le cas de l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés, la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17].

Cependant cette définition peut sembler opaque pour le grand public, un OGM peut être défini comme un organisme vivant - animal ou végétal - ayant subi une modification, non naturelle de ses caractéristiques génétiques initiales par ajout, suppression ou remplacement d'au moins un de ses gènes [82].

Initialement les animaux transgéniques étaient des animaux auxquelles un fragment d'ADN étranger avait été ajouté à leur génome. Avec la diversification des techniques, ce terme regroupe également, selon les auteurs, des animaux dont le génome a été modifié par le ciblage de gènes (animaux « knock-in ») ou les techniques de délétion des gènes (animaux « knock-out »). Ainsi par la suite, le terme de « **transgénique** » sera utilisé de façon plus générale, pour désigner les animaux ayant été modifiés génétiquement, c'est-à-dire ceux dans le génome desquels un gène aura été ajouté, mais aussi les cas de délétion.

Par le biais des différentes méthodes utilisées en transgène, plusieurs manipulations de gènes sont possibles : l'ajout d'un gène est possible par toutes les méthodes de transgène, mais, selon la méthode choisie, l'intégration se fera au hasard ou elle pourra être ciblée. Par contre la délétion d'un gène ne peut se faire que par le biais de la manipulation de cellules ES [10].

Afin de comprendre le « résultat » des différentes techniques, il est donc nécessaire d'en comprendre les mécanismes et les différentes étapes nécessaires à l'obtention d'animaux transgéniques.

II. Les différentes méthodes de transgénèse

L'obtention d'animaux transgéniques repose, quelque soit la technique utilisée, sur les quatre mêmes principales étapes (voir Figure 5).

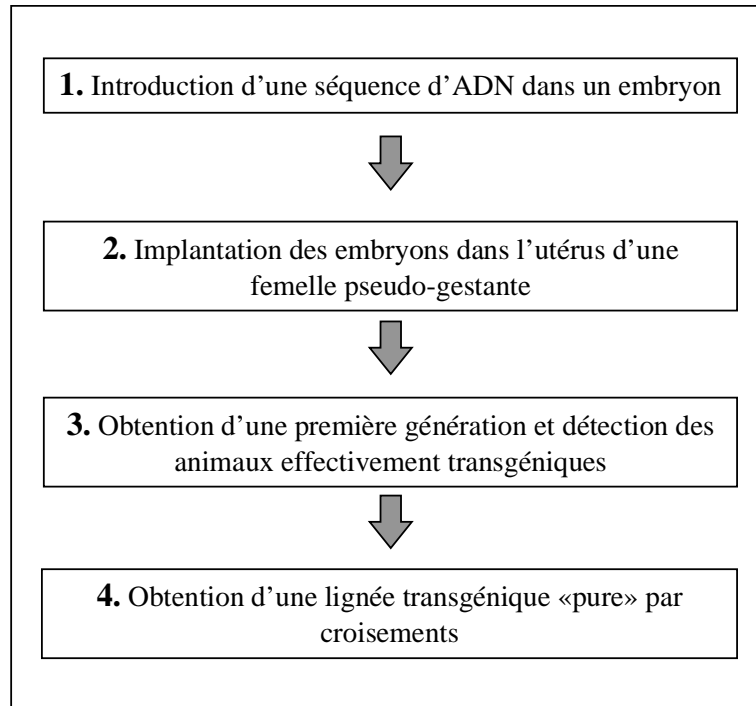


Figure 5 : Les principales étapes de l'obtention d'animaux transgéniques

Ces quatre étapes sont bien sûr précédées d'une étape de biologie moléculaire qui consiste en une étape d'isolement du gène d'intérêt (identification, séquençage éventuel).

Chez la souris, trois techniques de transgénèse (ou plus exactement trois techniques d'introduction d'une séquence d'ADN dans un embryon) sont le plus communément utilisées (voir Figure 6) [67] :

- la micro-injection pro-nucléaire d'ADN cloné dans des oeufs fertilisés
- utilisation de vecteurs rétroviraux
- transfert ciblé de gènes dans les cellules embryonnaires via la recombinaison homologue.

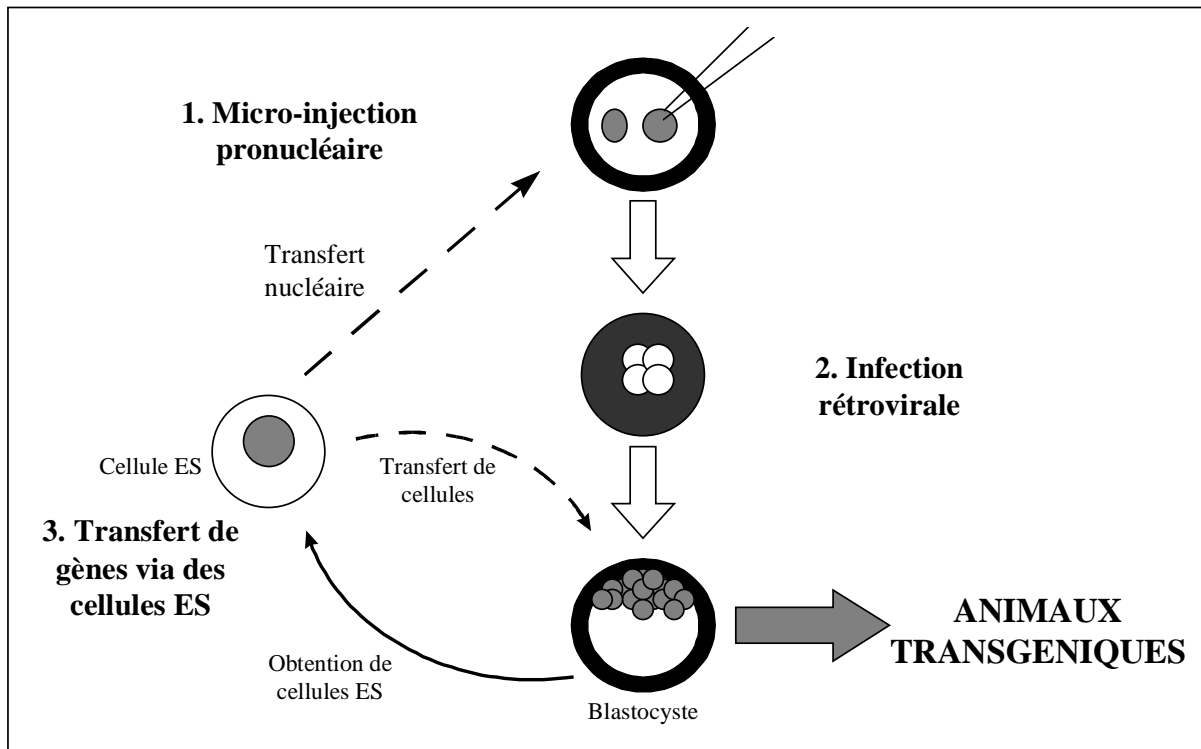


Figure 6 : Les 3 principales méthodes de transgénèse (d'après [68])

D'autres méthodes sont également possibles mais elles sont encore peu utilisées (introduction de gènes dans les spermatozoïdes, injection de régions chromosomiques micro-disséquées ou technique de ciblage par le système Cre-lox). Parmi les nouvelles méthodes, celle utilisant le système Cre-lox est la plus prometteuse car elle permet un ciblage tissulaire.

Nous étudierons en détail les 3 méthodes principales, ainsi que la technique mettant en jeu le système Cre-lox.

1. Microinjection pronucléaire

1.1. Principe

Cette méthode correspond à la méthode princeps, c'est-à-dire celle utilisée par l'équipe de Gordon lors de leur première expérience de transgénèse [52]. C'est également la première méthode qui s'est révélée efficace chez les mammifères.

Elle consiste à injecter des fragments d'ADN purifié (sous forme d'une solution) dans un des pronucléi (en général le pronucléus mâle car il est à la fois le plus grand et le plus proche de la surface) d'un oeuf fertilisé au stade unicellulaire. Ensuite, ce zygote est réimplanté dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante où il poursuit son développement.

1.2. Les différentes étapes [67]

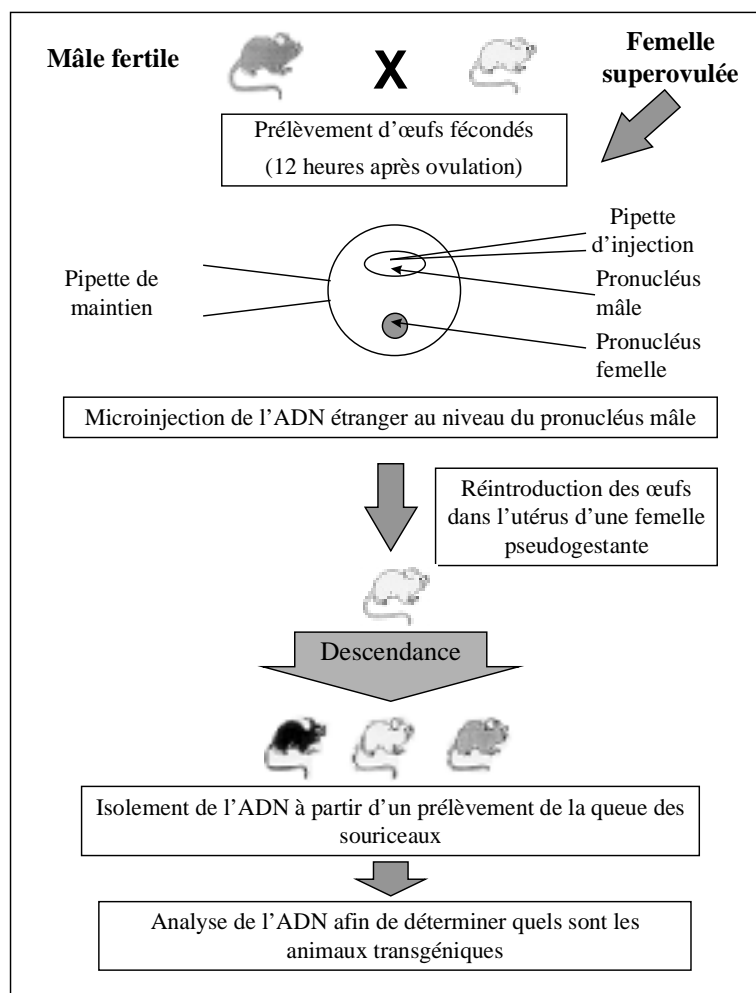


Figure 7 : Les principales étapes principales de l'obtention de souris transgéniques par micro-injection pronucléaire (d'après [67])

1.2.1. 1^{ère} étape : Préparation de la solution d'ADN injectée

Une séquence d'ADN déterminée est clonée (c'est-à-dire reproduite à l'identique un grand nombre de fois) ce qui permet l'obtention d'une solution d'ADN. Cette solution sera ensuite microinjectée au niveau d'un des pronucléi. L'efficacité de la micro-injection dépend des propriétés et de la qualité (e.g. pureté) de la solution injectée [51].

Il a été montré que plus le nombre de copies d'ADN est grand, plus le taux d'intégration de l'ADN est important. Cependant, une préparation trop concentrée donc trop visqueuse peut augmenter le risque de mort de l'embryon au moment de l'injection. De plus, l'ADN linéaire s'intègre plus efficacement que l'ADN circulaire [20].

De plus, l'effet inhibiteur de séquences procaryotiques (provenant des vecteurs de clonage) a été démontré : ils n'ont pas d'effet sur l'intégration du transgène dans le génome hôte mais ils peuvent cependant inhiber l'expression de certains transgènes [24, 121].

Il est donc recommandé d'éliminer toute séquence inutile, notamment les séquences provenant du vecteur de clonage au moyen d'enzymes de restriction.

Mais certaines séquences, au contraire, se sont révélées importantes dans la régulation de l'expression du transgène : c'est le cas des introns (qui sont de larges séquences non codantes) qui ont une influence importante sur le fonctionnement des gènes introduits par micro-injection [19]. Les observations de Brinster suggèrent que les introns facilitent la transcription des gènes micro-injectés, notamment en aidant à maintenir une activité de transcription pendant le développement.

Il est donc recommandé d'injecter l'ADN sous sa forme génomique plutôt que sous sa forme d'ADNc (ADN complémentaire qui est obtenu par transcription reverse à partir de l'ARN messager et qui ne comprend pas les introns).

1.2.2. 2^{ème} étape : Récolte des œufs fertilisés

Le choix de la souris donneuse est important : il est nécessaire de choisir une lignée avec un bon rendement en œufs, mais il est également essentiel que ces œufs survivent bien à la micro-injection.

Des femelles prépubères sont stimulées hormonalement par deux injections intrapéritonéales successives d'hormones à 46-48 heures d'intervalle (il est impératif de respecter ce délai) :

- une première injection de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin : gonadotropine sérique). Cette hormone en se substituant à l'hormone gonadotrope hypophysaire à effet FSH (Follicle-Stimulating Hormone ou hormone folliculotrope) stimule le développement des follicules mûrs.
- une seconde injection de hCG (human Chorionic Gonadotropin : gonadotropine chorionique humaine). Cette hormone, en mimant l'effet de la LH (Luteinizing Hormone ou hormone lutéinisante) parachève la maturation folliculaire et favorise l'ovulation.

Suite à ce traitement, un accouplement entre ces femelles et des mâles fertiles est réalisé. L'apparition, après quelques heures, d'un bouchon vaginal, chez 80 à 90% des femelles, est le signe que l'accouplement a effectivement eu lieu.

Il a été montré que le rendement est plus élevé dans le cas d'œufs hybrides (c'est-à-dire issus d'un croisement de 2 souches pures) plutôt que dans le cas d'œufs de souche pure. Brinster et son équipe ont montré que ce rendement était huit fois plus élevé avec des souris hybrides (C57BL/6xSJL) qu'avec des souris C57BL/6) [20].

Douze heures après l'accouplement, les femelles sont sacrifiées et les oviductes contenant habituellement chacun entre 10 à 15 œufs sont prélevés. Ainsi, entre 20 et 30 œufs peuvent être récoltés par souris.

Ces œufs fécondés peuvent être conservés pendant 3 à 36 heures dans un milieu de culture. Ils sont incubés à 37°C dans une atmosphère à 5,4% de CO₂ sur un milieu avec un pH équilibré. Les œufs subissent ensuite un traitement avec une hyaluronidase qui les libère de leur gaine de cellules folliculaires. Puis finalement ils sont « lavés » par passages successifs dans le milieu de culture afin d'éliminer toute trace résiduelle d'enzyme pouvant avoir un effet néfaste pour eux.

1.2.3. 3^{ème} étape : Micro-injection

Cette étape nécessite à la fois une technique particulière et un appareil spécial. Le coût de l'équipement d'un laboratoire de micro-injection (avec un poste de micro-injection) est de environ 80 000 \$ soit un peu plus de 87 000 euros [73]. Cette technique nécessite de la dextérité et de l'entraînement pour la personne qui la réalise et se fait sous microscope inversé (voir Figure 8).

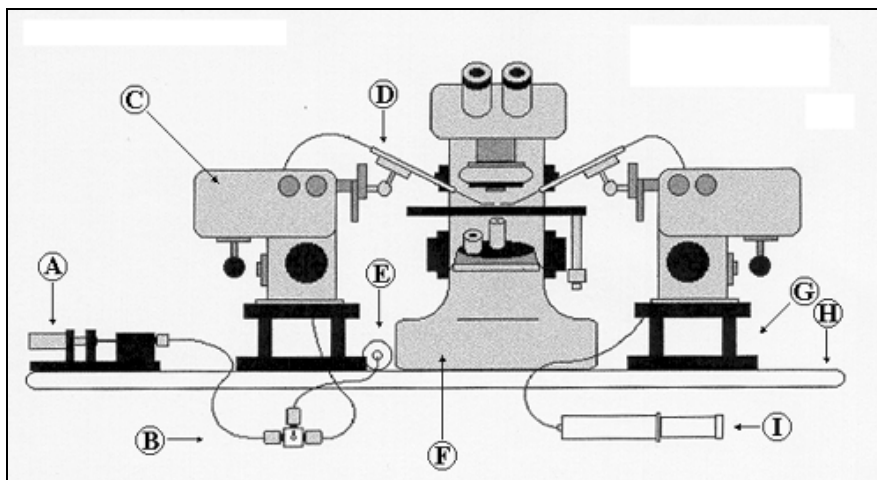


Figure 8 : Schéma d'un appareil pour micro-injection (d'après [120])

Légende

- A. Micromètre avec vis hydraulique (*Micrometer / Hydraulic Drive Unit*)
- B. Robinet 3 voies (*3-way stopcock valve*)
- C. Micromanipulateur (*Micromanipulator*)
- D. Porte-aiguilles avec micro-injecteur et micropipette de contention (*Needle holder / Instrument collar*)
- E. Seringue de 60 ml avec embout (*60 ml luer end syringe*)
- F. Microscope inversé (*Inverted light stereomicroscope*)
- G. Support du micro-manipulateur (*Micromanipulator stands*)
- H. Plateau de base ("*Bread-board*" instrument base)
- I. Seringue en verre de 60 ml (*Glass 60 ml syringe*)

La micro-injection se fait généralement une fois que le pronucléus mâle est visible et observable. L'intégration du transgène se fait vraisemblablement lors de la réplication de l'ADN. Cependant en raison de la dégradation de l'ADN, il est préférable de ne pas réaliser la micro-injection trop tôt avant la réplication. En outre, il paraît judicieux de ne pas micro-injecter après la première réplication (c'est-à-dire au stade 2 cellules soit 11 à 20 heures après la fécondation) [58, 86]. Mais dans la pratique, aucun moment ne paraît nettement à privilégier pour le faire [47]. Ainsi, il semblerait préférable d'injecter avant la première réplication, c'est en tout cas le moment choisi par la plupart des expérimentateurs [58].

Quelques œufs sont déposés dans une boîte de Piètri contenant une goutte de milieu recouverte d'huile de paraffine, par exemple, afin d'éviter toute évaporation.

Une micro-pipette de contention (ou holding pipette) permet le maintien et le positionnement correct des œufs par aspiration. Une autre micro-pipette permet l'injection de l'ADN préalablement préparé. La manipulation de ces deux micro-pipettes se fait grâce à des micro-manipulateurs.

A ce stade de développement de l'œuf, les deux pronuclei sont bien visibles. Le pronucléus mâle étant le plus gros et le plus près de la surface, la micro-injection se fait à ce niveau (voir Figure 9). Un picolitre de liquide, contenant entre 100 et 1000 copies du transgène, est alors injecté : le nucleus se dilate avec doublement du volume.

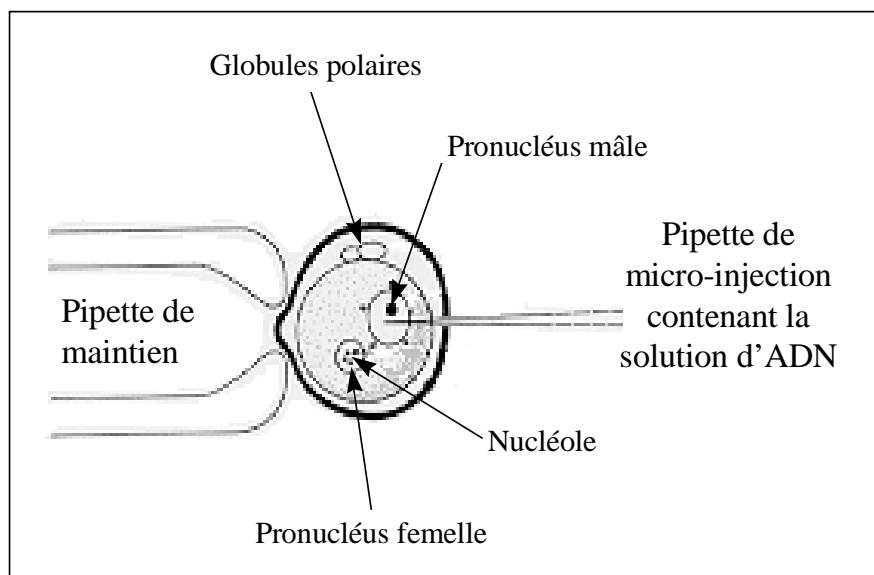


Figure 9 : Micro-injection pronucléaire

Tous les 20 œufs, les micro-pipettes doivent être changées et il est déconseillé de garder plus de 30 minutes les œufs au niveau de la chambre d'injection.

Les œufs injectés sont ensuite placés dans une étuve à 37°C à 5,4% de CO₂ jusqu'au moment de leur réimplantation. La réimplantation peut se faire directement après la micro-injection ou le lendemain en maintenant les œufs en culture.

1.2.4. 4^{ème} étape : Réimplantation

Les œufs sont réimplantés dans une mère porteuse mais pour que le développement embryonnaire se déroule correctement, le terrain hormonal de ces femelles doit être adéquat.

Pour cela, la veille de la micro-injection, des femelles en oestrus sont accouplées avec des mâles infertiles. Ces mâles ont été préalablement stérilisés par vasectomie (section chirurgicale du canal déférent). Il est également possible d'utiliser des mâles génétiquement stériles. Les femelles présentant le lendemain un bouchon vaginal feront partie du pool de mères porteuses.

La réimplantation est une opération chirurgicale, sous anesthésie générale, réalisée sous un microscope. Les œufs sont introduits au niveau de l'ampoule de l'oviducte (20 œufs si l'implantation se déroule le jour de la micro-injection, environ 15 œufs si ils ont été conservés *in vitro*).

Le temps de gestation est de 20 jours à partir de la date de l'implantation. Mais le nombre d'œufs se développant à terme est faible et les mères porteuse n'ayant pas mis bas au 20^{ème} jour seront sacrifiées.

Ensuite les souriceaux (environ 5 à 6 par portées) sont adoptés par des femelles nourrices (choisies en fonction de leurs bonnes caractéristiques maternelles).

1.2.5. 5^{ème} étape : Identification des souriceaux transgéniques

Une fois que la première génération de souris est obtenue, il est nécessaire de savoir quelles sont les souris ayant intégré le transgène. Pour cela, une petite quantité d'ADN des animaux est nécessaire : en général, des fragments de queue sont prélevés sur les animaux encore jeunes. Ensuite les transgènes sont identifiés par la technique de transfert de Southern (ou Southern-Blot) ou par PCR (Polymerase Chain Reaction : réaction de polymérisation en chaîne [58]) sur ces fragments.

Pour la technique de Southern, l'ADN est déposé sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon et une hybridation avec une sonde marquée et spécifique du transgène est réalisée. Mais le taux de faux-positifs pour cette méthode est important car il est nécessaire que l'ADN utilisé soit d'une pureté suffisante. De plus, la détection des animaux mosaïques peut être difficile en raison du faible nombre de copies du transgène [58].

Dans le cas de la PCR, la quantité d'ADN peut être plus faible : la salive [61] ou des fragments obtenus suite au marquage des animaux peuvent être suffisants [103]. De plus, cette méthode peut ne pas être pratiquée à partir d'ADN purifié car une étape d'amplification de l'ADN est incluse dans la technique [109]. Elle est également plus sensible et permet donc de détecter des animaux mosaïques. Ainsi la PCR apparaît comme la méthode la plus simple et la plus rapide.

1.3. Résultats

Le but poursuivi dans toutes les techniques de transgénèse est que le transgène se transmette à la descendance de manière stable et qu'il s'exprime. Comme nous l'avons vu précédemment, dans certains cas, le transgène n'était pas exprimé alors qu'il était bien présent ; c'est le cas dans l'expérience princeps de cette méthode [52]. Il est donc nécessaire de comprendre le système d'intégration de l'ADN.

Suite à la micro-injection, l'ADN linéaire injecté se circularise et puis se relinéarise de façon aléatoire et finalement se recombine par recombinaison homologue : il y a formation de concatémères en tandem (voir Figure 10).

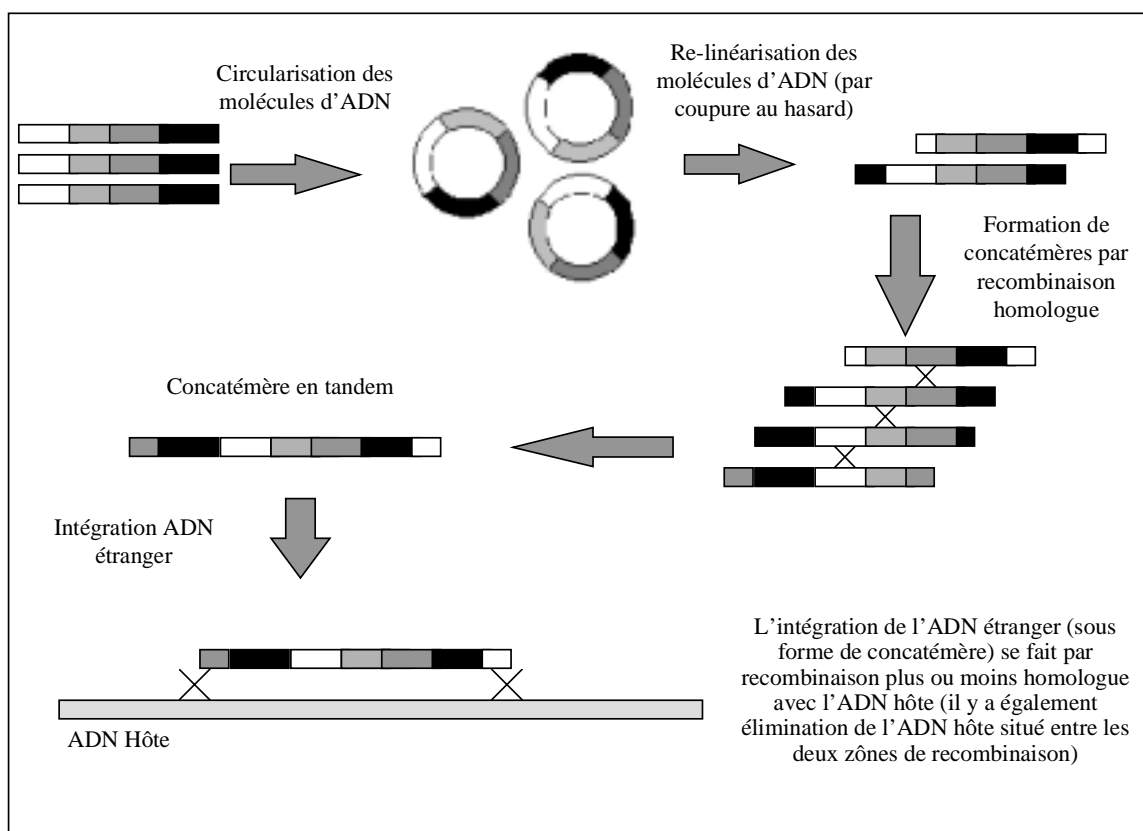


Figure 10 : Le mécanisme de formation de concatémères en tandem (d'après [58])

Ces concatémères sont ensuite soit dégradés, soit intégrés au génome en faisant intervenir un mécanisme d'intégration hétérologue. Ce phénomène se fait grâce à une reconnaissance partielle de l'ADN génomique par l'ADN étranger. Pour obtenir des lignées pures, il serait souhaitable que l'intégration de l'ADN se réalise au stade d'une cellule. Cependant, ce n'est pas toujours le cas, et si l'intégration se fait à un stade plus tardif, le taux de souris mosaïques sera relativement élevé [58].

Il est possible que l'ADN micro-injecté s'insère aux niveaux de certains sites conduisant alors à différentes mutations pouvant être létales, notamment dans le cas où l'insertion provoque une interruption au sein d'un gène ayant une fonction vitale ou participant au développement [13, 71].

En règle générale, sur 100 embryons manipulés, une à trois (cinq au grand maximum) souris transgéniques peuvent être obtenues. Ce faible rendement s'explique notamment par le fait que peu d'embryons survivent à la micro-injection et au transfert dans l'utérus de femelles pseudo-gestantes (environ 20 à 30%) [57]. Mais l'efficacité varie également selon la construction d'ADN utilisée [50].

Chez les autres espèces, le rendement est moindre, ce qui peut expliquer pourquoi la transgénèse animale est réalisée à l'heure actuelle en grande majorité sur des souris [58].

1.4. Avantages et inconvénients

1.4.1. Avantages

L'avantage principal de la micro-injection est son efficacité à produire des lignées transgéniques qui expriment la plupart du temps les gènes de manière prévisible [65].

Le travail de biologie moléculaire est assez simple (comparé aux autres techniques) : le gène que l'on souhaite insérer dans le génome doit être identifié puis cloné afin d'avoir un nombre suffisant de copies à injecter [50].

En raison du faible temps de gestation de la souris et du peu de technicité de la phase de préparation de l'ADN, le temps de développement est réduit : entre 3 et 9 mois [65].

1.4.2. Inconvénients

Cependant cette technique ne permet que l'addition d'un gène (ni la délétion, ni la substitution ne sont possibles). L'intégration se faisant au hasard, il est difficile de prévoir les effets secondaires. Il est donc nécessaire de prendre en compte les effets du locus d'insertion sur le patron d'expression. A cet effet s'ajoute également le fait que le nombre de copies d'ADN insérées est variable (en raison de la formation de concatémères) [65].

Même si les gènes micro-injectés s'expriment de façon efficace, il se peut que le niveau d'expression soit sous la dépendance de différents facteurs comme des facteurs procaryotiques provenant des vecteurs utilisés qui peuvent inhiber l'expression du transgène [50].

La dernière contrainte est la précision nécessaire à la technique de micro-injection, qui requiert de la dextérité de la part du technicien et donc un entraînement.

Malgré ces quelques défauts, la technique de micro-injection pronucléaire est la plus efficace des techniques et également la plus utilisée pour obtenir des animaux transgéniques. Des fragments d'une longueur d'environ 50 kilobases peuvent être ainsi introduits dans le génome d'un œuf et ainsi ils seront exprimés à la fois dans les cellules somatiques et les cellules de la lignée germinale.

2. Infection rétrovirale

Cette technique, courante en thérapie génique, est utilisée pour obtenir des lignées d'animaux transgéniques, notamment chez les oiseaux dont les embryons sont difficilement manipulables [58].

2.1. Principe

Cette technique repose sur une propriété particulière des rétrovirus : leur capacité à s'intégrer dans le génome des cellules qu'ils infectent. La découverte de Jaenish en 1976 a été l'étape déclenchant la possibilité de l'utilisation de cette technique pour obtenir des animaux transgéniques : il a été démontré que les rétrovirus pouvaient infecter des embryons à un stade précoce et que, suite à cette infection, il y avait insertion d'ADN sous forme de provirus dans le génome de ces embryons et que ce provirus était ensuite transmis à la descendance des souris l'ayant intégré [64].

Des vecteurs viraux dans lesquels le transgène a été introduit par des techniques de recombinaison génétique, sont mis en présence de jeunes embryons de souris. Ceux-ci sont ensuite réimplantés dans l'utérus de souris femelles pseudo-gestantes.

2.2. Les différentes étapes [67]

2.2.1. Construction des vecteurs rétro-viraux

Afin de comprendre le principe de cette technique, il est nécessaire de comprendre l'organisation fonctionnelle d'un rétrovirus.

Les virus possèdent comme molécule de support de l'information génétique soit une molécule d'ADN, soit une molécule d'ARN. Dans le cas de rétrovirus, l'information génétique est constituée par une molécule d'ARN double brin contenant différentes séquences. Ces séquences sont nécessaires à une étape fondamentale du cycle viral : la transcription reverse de l'ARN viral en ADN qui pourra ensuite s'intégrer au génome de l'hôte sous forme de provirus. Les séquences virales sont les suivantes (voir Figure 11) [105] :

- les séquences codant pour les différentes protéines virales : les séquences GAG, POL et ENV codent respectivement les protéines structurales de la capsid, l'ADN-polymérase ARN-dépendante (également appelée transcriptase reverse qui permet l'obtention d'une molécule d'ADN à partir de la molécule d'ARN) et les glycoprotéines de l'enveloppe ;
- les séquences régulatrices (ou éléments régulateurs) : les séquences LTR 5' (LTR : Long Terminal Repeat) et LTR 3', ainsi que le signal d'encapsidation Ψ . Ces séquences LTR contiennent les séquences nécessaires à la transcription reverse (initiation et transcription) à l'intégration ainsi qu'à l'intégration. La séquence Ψ correspond au signal d'encapsidation de l'ARN dans les particules virales.

Les gènes codant pour les protéines de structure (les gènes GAG, POL et ENV) ne sont indispensables que pour la réplication du virus, ils peuvent être remplacés par de l'ADN exogène, c'est-à-dire par un transgène (voir Figure 11). En remplaçant ces gènes viraux par le transgène, la possibilité qu'un vecteur viral portant un gène étranger se propage de manière

incontrôlée est éliminée. L'ADN intégré peut ou non contenir son propre promoteur. S'il ne possède pas de promoteur propre, son expression est alors dépendante du promoteur du vecteur (séquences LTR) [58].

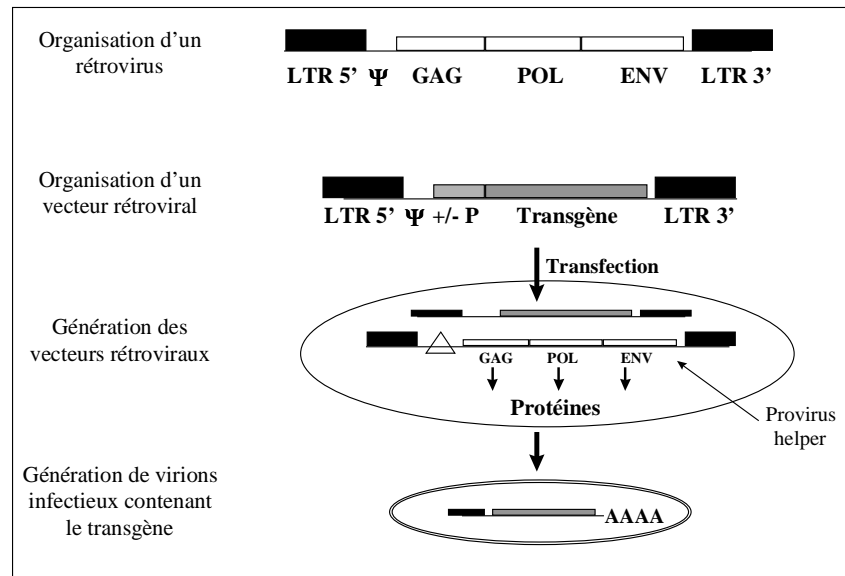


Figure 11 : Construction d'un vecteur rétroviral (d'après [67])

Dans le cas où il serait souhaitable que l'expression ne dépende pas du vecteur, il est possible de construire le vecteur rétroviral en ayant pris soin d'y intégrer également un promoteur [58]. Ainsi, le vecteur rétroviral construit sera déficient pour la réplication. Mais la production de particules infectieuses contenant le vecteur ne peut se faire que si les génomes viraux recombinés reçoivent d'une autre cellule les protéines qu'ils ne peuvent plus synthétiser par eux-mêmes. De telles cellules sont qualifiées de « transcomplémentantes ». Ainsi, des cellules, transfectées avec le génome viral déficient contenant le gène étranger, permettront la production de rétrovirus recombinés qui seront ensuite utilisés pour infecter les embryons.

Ces cellules doivent répondre à plusieurs exigences. Elles doivent :

- être faciles à cultiver ;
- être facilement transfectables ;
- pouvoir produire une grande quantité de particules virales après transfection ;
- être « sûres » c'est-à-dire qu'elles ne relargueront aucun virus répliatif.

Leur utilisation requiert de la part de l'expérimentateur beaucoup de soin car elles doivent être maintenues à l'abri de toute infection virale non contrôlée.

Différentes lignées cellulaires sont disponibles pour obtenir des particules rétrovirales non contaminées par des virus sauvages. Selon les lignées, il est possible d'obtenir des particules rétrovirales dont l'infection peut être restreinte à une espèce (ectotrope) ou au contraire avoir un spectre plus large (amphotrope) [58].

Ainsi en cultivant ce type de cellules transfectées, il est possible d'obtenir un stock de rétrovirus recombinés par récolte du milieu de culture, et il peut être conservé à -70°C après centrifugation.

2.2.2. Infection des embryons

La méthode de récolte des embryons est la même que celle utilisée dans le cas de la micro-injection, bien qu'elle se fasse à un stade plus tardif (stade 4 ou 8 cellules, soit plus de 50 heures après la fécondation [86]). Un traitement enzymatique est également nécessaire pour débarrasser les embryons de leur membrane pellucide.

Les embryons sont ensuite exposés aux virus recombinés soit en les mettant en contact à des stocks de virus concentrés, soit en les cocultivant sur une monocouche de fibroblastes produisant le virus recombinant.

Suite à l'infection, les embryons sont réimplantés dans l'utérus d'une femelle porteuse en suivant la même procédure que dans le cas de la micro-injection.

2.3. Résultats de l'intégration du transgène

L'intégration du rétrovirus au niveau des cellules infectées se fait sous forme d'une copie unique. Aucun réarrangement du génome n'a lieu, hormis la duplication d'une courte séquence de l'hôte au site de l'intégration [58].

Cependant bien qu'une seule copie ne s'intègre en un site précis, plusieurs intégrations peuvent avoir lieu dans une même cellule ou dans plusieurs cellules. Ceci peut conduire à l'obtention d'un animal transgénique fondateur qualifié de mosaïque pour un grand nombre d'insertions, ce qui rendra difficile l'obtention de lignées pures.

L'obtention de lignées pures ne pourra alors se faire que par le biais de croisements génétiques accompagnés de méthodes de détection du transgène pour étudier la descendance. Ces méthodes (croisement des lignées et détection du transgène dans la descendance) sont communes à toutes les méthodes de transgénèse.

Cette technique peut être optimisée en éliminant de la séquence intégrée des séquences pouvant interférer avec la transcription et la maturation. Pour cette raison, il est préférable d'utiliser des inserts d'ADNc (ADN complémentaire) où les introns (séquences non codantes) ne sont pas présents.

2.4. Avantages et inconvénients

Ce système est une technique simple, ne demandant pas de matériel perfectionné. De plus, l'intégration du transgène se fait sous forme d'une copie unique. Mais cette intégration peut avoir lieu en différents endroits du génome [65].

Cependant cette technique est peu utilisée car souvent le transgène, dont la taille est limitée à 9 kilobases, ne s'exprime pas de façon efficace et les cellules somatiques sont infectées à une fréquence plus élevée que les cellules germinales ce qui peut rendre difficile la transmission à la descendance [50].

En outre, cette technique implique la manipulation de virus et donc de nombreuses précautions doivent être prises, notamment au niveau du confinement des animaux car ils peuvent relarguer des particules virales [50]. Mais cette technique s'est révélée très efficace pour l'obtention d'oiseaux transgéniques [58].

3. Manipulation de cellules ES et recombinaison homologue

3.1 Les deux principes fondamentaux de cette technique

Cette technique repose sur deux principes : l'utilisation de cellules particulières et la recombinaison homologue.

3.1.1. Les cellules ES

Les cellules ES (ou « embryonic stem cells » ou cellules embryonnaires souches) ont pu être mises en culture et cultivées pour la première fois en 1981 par Evans et Kaufman [41]. Ces cellules sont isolées à partir de cultures de jeunes embryons de souris, elles correspondent à des lignées cellulaires ayant les propriétés de cellules embryonnaires totipotentes et sont dérivées des cellules de la masse interne du blastocyste (ces cellules sont à l'origine des feuillettes embryonnaires dont l'interaction, l'association et le développement conduisent à la différenciation des tissus et des organes de l'embryon et de ses annexes [86]).

Les propriétés de ce type de cellules qui les rendent très intéressantes dans le cadre de la transgénèse sont [6]:

- leur croissance quasi-illimitée *in vitro*, tout en conservant leur totipotence, c'est-à-dire leur possibilité de se différencier en tout type de cellules, ce caractère étant présent que ce soit *in vivo* ou *in vitro* ;
- leur possibilité de colonisation des tissus d'un embryon hôte, y compris au niveau des cellules de la lignée germinale (c'est-à-dire des cellules à l'origine des gamètes).

Ainsi, même après une longue période de culture *in vitro*, les cellules ES peuvent être introduites dans la cavité d'un blastocyste de souris et participer ainsi au développement normal en se multipliant et se différenciant en tous les types cellulaires, même en cellules de la lignée germinale [79]. Ces propriétés permettent deux applications essentielles :

- sélection de modifications génétiques nouvelles ;
- transfert à l'animal de modifications génétiques dans des cellules ES, produisant ainsi des animaux chimères (ou mosaïques).

L'utilisation des cellules ES est donc un système complexe mais efficace pour intégrer un gène dans des cellules de la lignée germinale après manipulation de leur génome par des techniques de recombinaison homologue.

3.1.2. Principe de la méthode par recombinaison homologue [21]

Des études de Capecchi et Smithies ont montré que dans les cellules de mammifères, la recombinaison homologue entre une séquence d'ADN exogène et une séquence d'ADN endogène présentant des homologies est possible. Ce phénomène est rendu possible grâce à l'appareillage enzymatique de ces cellules ; il est cependant rare comparé à l'intégration au hasard de ce même segment d'ADN [117].

La recombinaison homologue permet deux possibilités de réarrangement de séquences génomiques [6] :

- invalidation d'un gène endogène ou « knock-out » ;
- insertion d'un gène exogène ou « knock-in ».

Ce type de mutations étant également qualifié de « mutations nulles » car il y a dans les deux cas invalidation d'un gène endogène.

3.1.2.1. Le « Knock-out » (voir Figure 12)

Le vecteur de ciblage comporte une cassette de sélection insérée dans un exon (les rectangles noir et blanc représentent respectivement un exon et un intron). Cette cassette de sélection est également entourée par des régions présentant des homologies avec le gène cible. La recombinaison avec ce dernier s'effectue au niveau de ces séquences homologues, ce qui conduit à la création d'un allèle nul et donc à l'invalidation du gène suite à l'insertion de la cassette de sélection. La cassette de sélection permettra ensuite de reconnaître les cellules où la recombinaison a eu lieu.

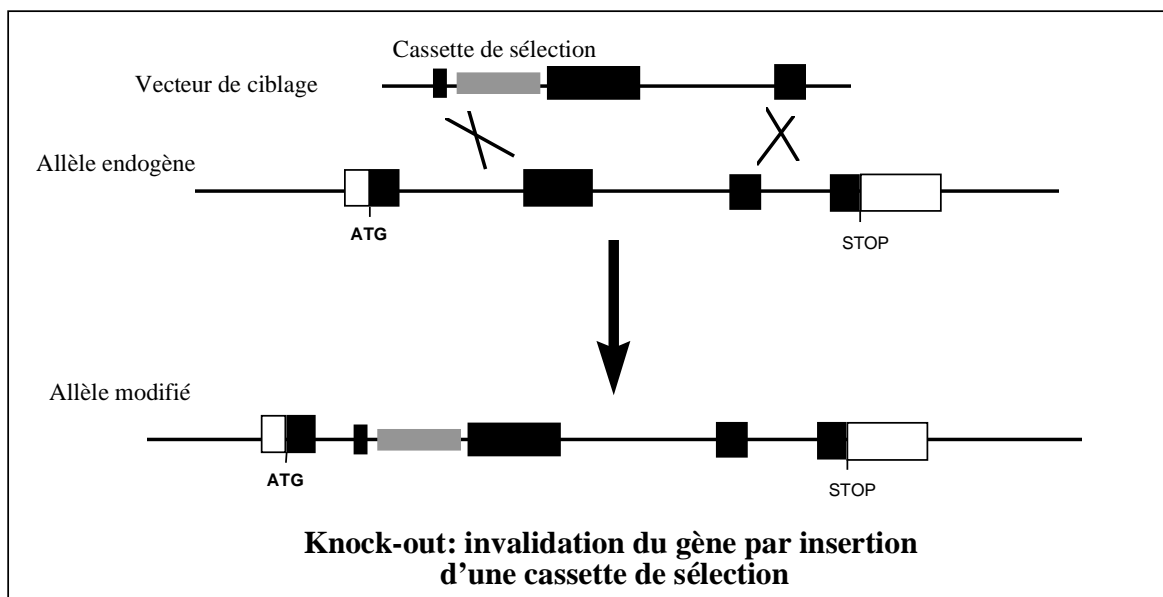


Figure 12 : Principe du Knock-out (d'après [6])

3.1.2.2. Le « Knock-in »

Dans ce cas, en plus de l'inactivation du gène cible, il y a introduction d'un gène d'intérêt (par exemple un gène codant pour une protéine particulière). Suite à la recombinaison homologue, ce gène, placé sous le contrôle du promoteur et des autres séquences régulatrices du gène cible, s'exprimera à la place de ce dernier. De façon simpliste, on peut dire qu'il y a eu remplacement d'un gène par un autre (voir Figure 13).

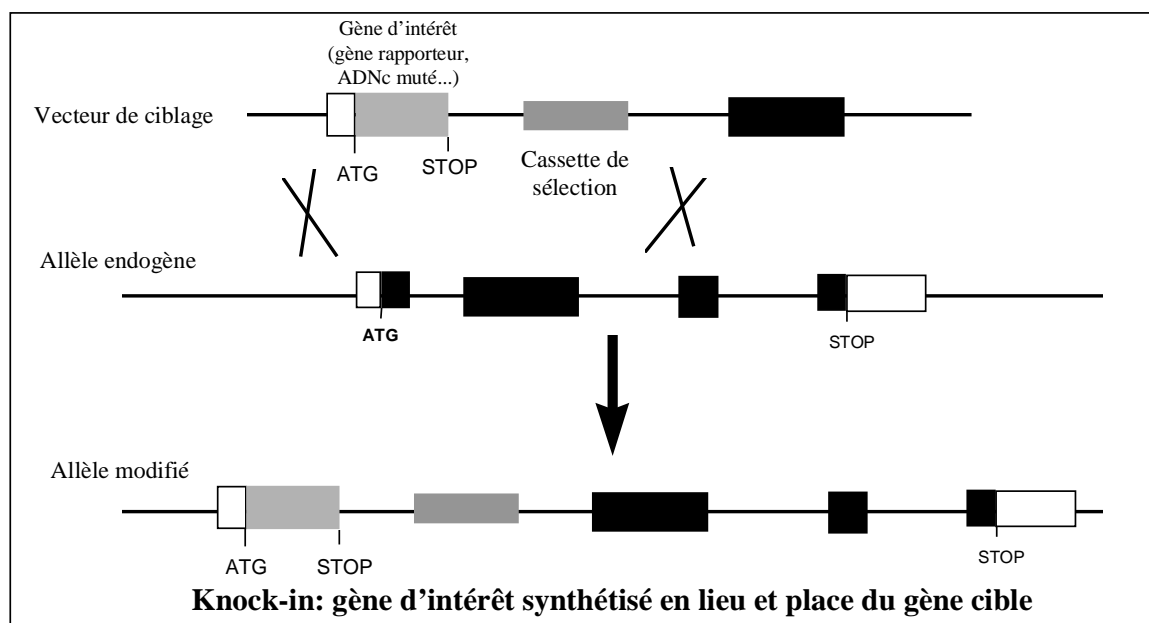


Figure 13 : Principe du Knock-in (d'après [6])

3.2. Les différentes étapes [67]

Les cellules ES sont cultivées et manipulées (modification de leur génome, insertion ou délétion de gènes, mutations ponctuelles) puis injectées dans la cavité d'un blastocyste receveur où elles participeront au développement normal de l'embryon, en contribuant au développement des tissus somatiques et parfois de la lignée germinale (voir Figure 14).

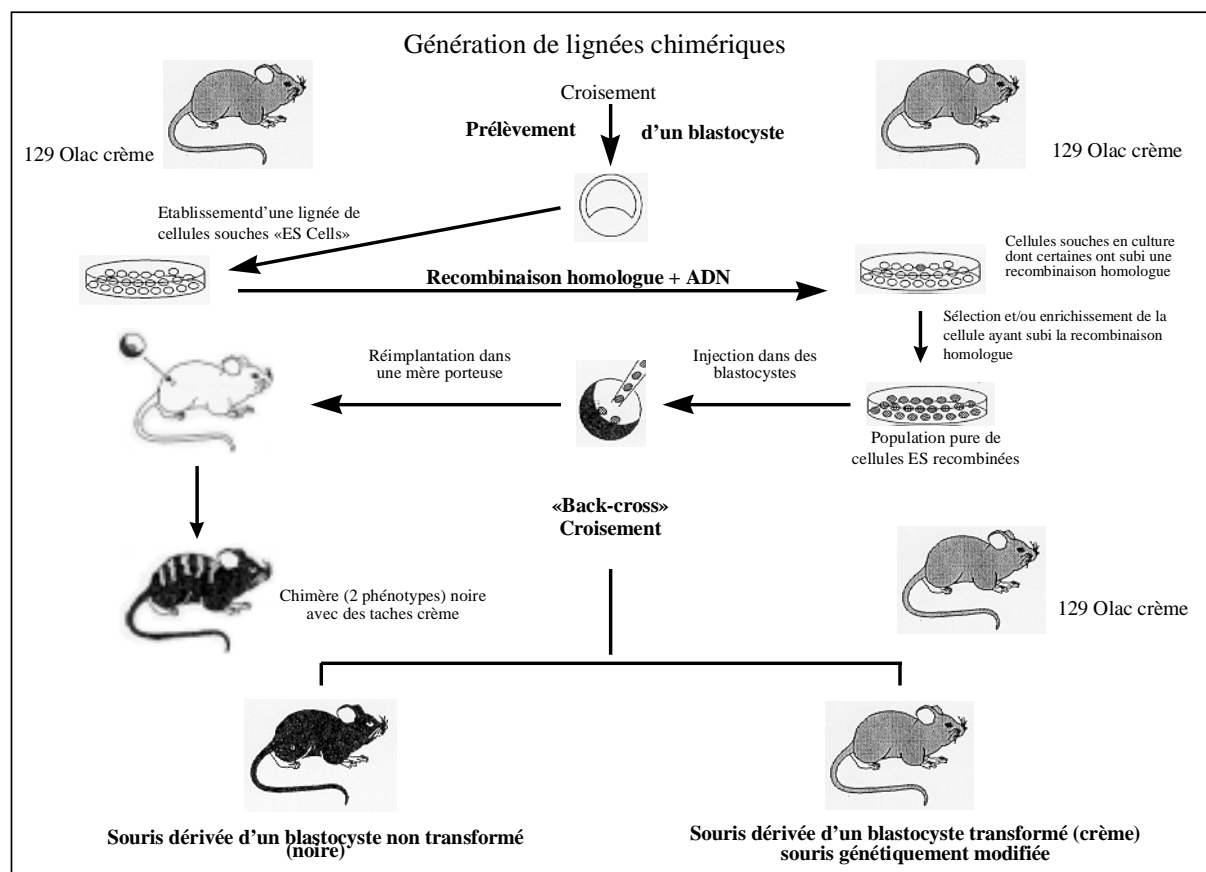


Figure 14 : Les différentes étapes de la technique par recombinaison homologue et cellules ES (d'après [67])

3.2.1. Culture des cellules ES

Les cellules ES sont obtenues par mise en culture de cellules de blastocyste. Afin de conserver leur caractère pluripotent, des conditions de culture particulières doivent être observées. Leur multiplication doit être possible tout en empêchant leur différenciation [XX]. Différents milieux de culture sont possibles [45] :

- un milieu conditionné BRL (Buffalo rat liver cells) avec une activité DIA (Differentiation inhibiting activity : activité d'inhibition de la différenciation) [114] ;
- un milieu auquel est ajouté le facteur LIF (Leukemia inhibitor factor : facteur d'inhibition de la leucémie) purifié [135].

3.2.2. Manipulation du génome des cellules ES

Un vecteur, contenant la mutation souhaitée (ajout d'un gène, délétion...), est introduit dans des cellules ES par électroporation ou micro-injection. Dans la plupart des cellules, le transgène s'intègre au hasard dans le génome des cellules ES. Cependant, dans quelques cellules ES, il y a appariement du transgène au génome de la cellule hôte grâce à des séquences homologues et donc la mutation est transférée au génome de la cellule hôte par recombinaison homologue.

Puis par des méthodes de criblage et/ou d'enrichissement, les cellules ES dans lesquelles le transgène est présent sont identifiées. Ensuite un clone de ces cellules, qui se doit d'être très pur, est produit (multiplication en très grand nombre et à l'identique de ces cellules). Ces cellules ES sont, par la suite, injectées dans la cavité d'un blastocyste (ou blastocoele) obtenu d'une souris donneuse. Ce blastocyste sera ensuite transféré dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante, où le développement de l'embryon se poursuivra normalement.

A priori, l'animal ainsi obtenu est dit « chimérique » ou « mosaïque », c'est-à-dire qu'il est constitué de cellules ayant des origines différentes : certaines ont pour origine les cellules du blastocyste hôte et d'autres proviennent des cellules ES injectées. Cependant, en 1987, des chercheurs ont réussi à montrer que des cellules ES modifiées génétiquement pouvaient donner naissance à des souris dérivant entièrement de ces cellules et donc n'étant pas chimériques [131].

Afin de pouvoir facilement identifier les animaux chimériques, on utilise généralement des souris ayant des pelages de couleurs différentes : par exemple, si le blastocyste provient de souris de pelage clair (lignée E14 isolée de la souche 129/Olac homozygote pour l'allèle récessif chinchilla) et que les cellules ES proviennent de souris avec un pelage foncé (Souche C57BL/6 homozygote pour l'allèle sauvage C/C), les souris chimériques auront un pelage bigarré. Comme la plupart des lignées de cellules ES proviennent d'embryons mâles, l'injection de cellules ES provenant de souris à pelage clair dans les blastocystes mâles conduit à l'obtention de souris mosaïques de sexe mâles, et ces mâles produiront des spermatozoïdes des deux origines. A l'inverse, l'injection dans des blastocystes femelles permet l'obtention de souris mosaïques dont le sexe sera fonction du taux de colonisation du tissu germinale par les cellules ES : plus le taux est important, plus le développement de ces tissus se fera vers les organes mâles. Dans ce cas, ces animaux produiront des gamètes provenant des cellules ES injectées. Si, par contre, le taux de colonisation du tissu germinale est faible, les souris obtenues seront des souris femelles (produisant des ovules qui, eux, ne proviendront pas des cellules ES injectées) ou de sexe indéterminé, généralement stériles. Il est important de noter que chez ces souris chimères présentant des taches crème sur un pelage foncées, l'étendue des taches est proportionnelle au taux de colonisation de l'embryon par les cellules ES [67].

Malheureusement, les souris chimériques sont peu exploitables (car ce ne sont pas des lignées pures) en tant que telles, il conviendra donc les croiser avec des souris à pelage clair ou albinos et d'en étudier la descendance. Si, par croisement, des souris à pelage foncé sont obtenues, cela signifie que le transgène s'est intégré dans des cellules de la lignée germinale et que l'animal ainsi obtenu contient dans toutes ses cellules le transgène [67].

3.3. Avantages et limites de cette technique

Cette technique de manipulation de cellules ES combinée au principe de la recombinaison homologue présente l'avantage de permettre plusieurs types de modifications du génome : mutations ponctuelles, délétion (souris « knock-out ») ou insertion de gènes (souris « knock-in »). Elle permet surtout de créer des souris pour lesquelles des gènes spécifiques manquent [50].

En outre, les cellules ES peuvent être manipulées de différentes manières et pas seulement en utilisant le principe de la recombinaison homologue, il est possible de les micro-injecter ou d'utiliser des vecteurs rétro-viraux [65].

L'inconvénient de cette technique, à l'heure actuelle, est qu'elle soit seulement applicable avec succès aux souris. Cela peut s'expliquer par le fait qu'elle est difficilement réalisable avec des animaux ayant des portées de petite taille et des temps de gestation longs (ce qui entraîne un coût important) [50].

A cela s'ajoute le fait que cette technique n'est pas encore totalement maîtrisée et que les animaux obtenus (animaux fondateurs) sont mosaïques ce qui rend très difficile la production de lignées stables [67].

Bien que ce type de mutations soit intéressant, les mutations dites « subtiles » ont été développées, comme c'est le cas, par exemple, avec la technique mettant en jeu le système Cre-lox [6].

4. Technique Cre-lox

Le ciblage par recombinaison homologue dans des cellules ES combiné aux propriétés du système Cre-loxP a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives aux techniques de transgénèse [110], car elle permet un affinement de la méthode par ciblage plus précis du site d'insertion du transgène. Cette technique a été validée en 1995, une équipe ayant réussi à obtenir des souris porteuses de délétion de 3 à 4 centimorgans (c'est-à-dire d'une taille importante comparée aux autres techniques) [102].

Le phage bactérien P1 possède un système de recombinaison très spécifique et très efficace. Des séquences orientées, appelées lox P (lox pour « locus of crossing over » ou locus de crossing-over), spécifiques de 54 paires de bases (2 séquences palindromiques de 13 paires des bases séparées par une séquence de 8 paires de bases - voir figure 15) peuvent se recombiner (voir figure 16). Mais cette recombinaison ne peut se faire qu'en présence d'un enzyme particulière, la recombinase Cre (Cre pour « Causes REcombinaison » ou « permettant la recombinaison »). Cette enzyme reconnaît spécifiquement cette séquence, la coupe en des points précis (flèches grises sur la figure 15) et induit la recombinaison entre les deux sites loxP (voir Figure 16) [6].

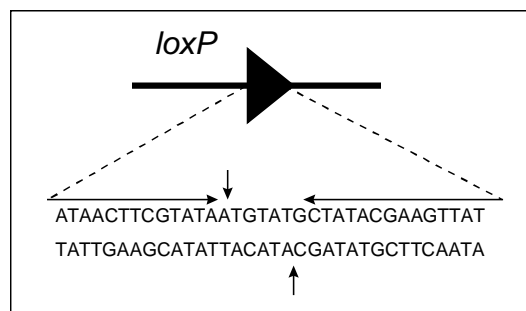


Figure 15 : Schéma du site loxP (d'après [6])

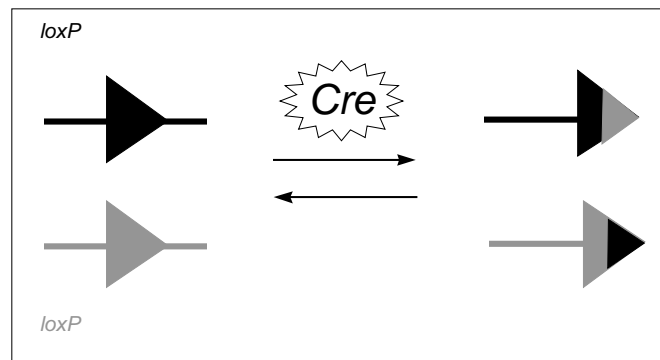


Figure 16 : Schéma du principe de la recombinaison (d'après [6])

Selon l'orientation et le positionnement des sites loxP, plusieurs types de recombinaisons sont possibles :

- Si les deux sites loxP sont sur la même molécule d'ADN : la recombinaison est qualifiée de recombinaison en cis. De plus, suivant l'orientation des sites lox, la délétion ou l'inversion du gène compris entre les deux sites loxP sont possibles (voir figure 17).

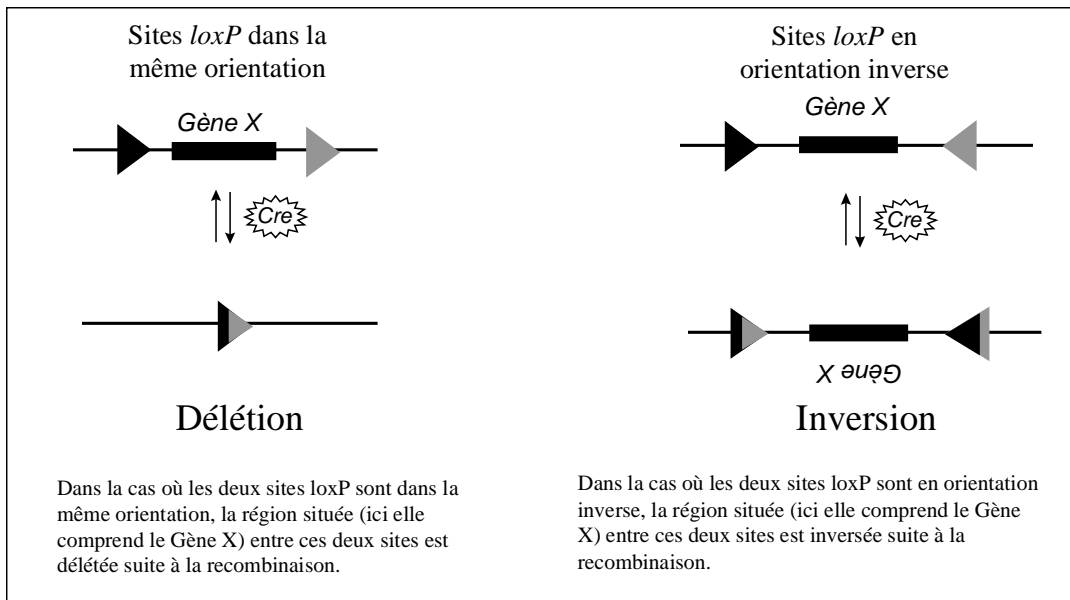


Figure 17 : La recombinaison en cis (d'après [6])

- Si les deux sites loxP sont sur deux molécules d'ADN différentes ; la recombinaison est qualifiée de recombinaison en trans. De même, suivant l'orientation des sites loxP, plusieurs modifications sont possibles : insertion, délétion/duplication ou encore translocation (voir figure 18).

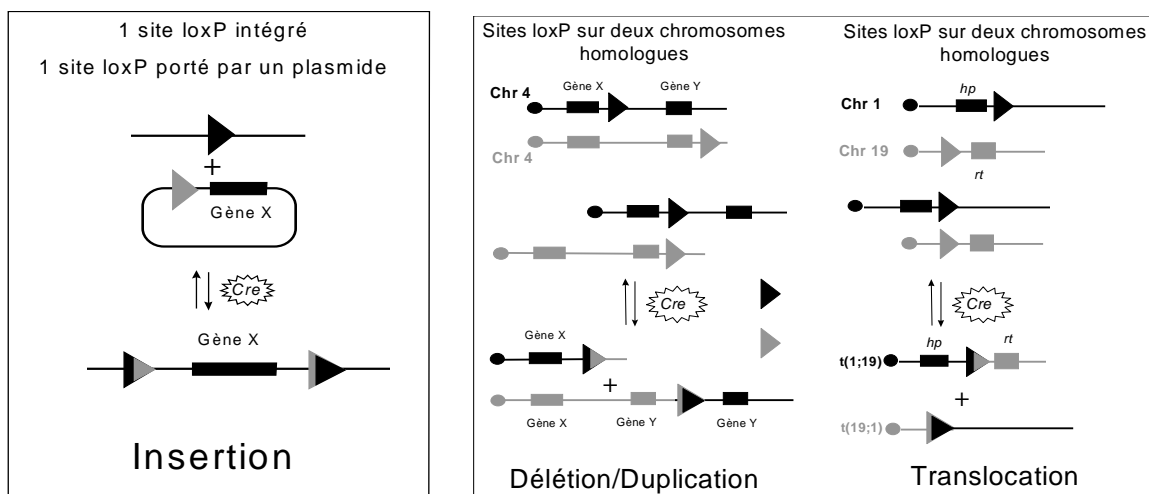


Figure 18 : La recombinaison en trans (d'après [6])

5. Autres techniques

D'autres techniques de transgénèse existent également mais elles sont encore que très peu utilisées : le transfert de fragments entiers de chromosomes permettant d'obtenir des souris qualifiées de « transomiques » par opposition aux souris transgéniques [104], ou encore la transfection de gamètes suivie d'une fécondation *in vitro* [74].

Les YAC (Yeast Artificial Chromosome : chromosome artificiel de levure) permettent d'introduire chez la souris des fragments d'ADN plus importants : la taille maximum d'un insert avec des techniques dites classiques est 40 à 50 kb, alors que l'utilisation des YAC rend possible l'introduction d'inserts d'une taille pouvant aller jusqu'à 2 Mb (Mb : mégabase) soit une taille 40 fois plus importante [98]. Cette propriété des YAC permet donc l'étude de gènes complets par exemple.

L'ensemble de ces méthodes a permis ces dernières années d'obtenir de nouveaux modèles, murins le plus souvent, de pathologies humaines ou animales. Mais l'utilisation de ces animaux en recherche biomédicale nécessite également le respect de certaines règles.

III. Utilisation des animaux transgéniques en expérimentation animale

La transgénèse en permettant de bénéficier de l'expression d'un gène particulier au sein d'un organisme complexe est devenue un outil remarquable pour toute recherche qu'elle soit fondamentale ou appliquée.

Les applications des techniques de transgénèse, dans le domaine de la recherche médicale, sont nombreuses et variées. En recherche fondamentale, elle permet l'étude de l'expression et du rôle des gènes au sein d'un organisme complexe. Dans le cadre des études biomédicales, elle rend possible la création de nouveaux modèles de maladies. Plus récemment, des animaux transgéniques sont développés pour la production de protéines thérapeutiques [58, 130] ou d'organes pour des xéno-transplantations [23, 33].

Tout ceci est sans oublier les nombreuses applications agronomiques de la transgénèse : la lutte contre les maladies, l'amélioration des performances des animaux de rente, la modification de la composition du lait, etc.. [58].

L'utilisation des animaux transgéniques est de plus en plus importante, elle a augmenté, au Royaume-Uni, pendant la période 1990-1996 de 525% [10]. Cette augmentation est d'autant plus impressionnante que l'on assiste parallèlement à une diminution du nombre d'animaux utilisés en recherche, de manière générale, notamment en France [48].

Dans le cadre de notre étude, nous nous limiterons à leur utilisation dans le cadre de la recherche biomédicale et pharmaceutique et ainsi qu'à ses limites.

1. Quelques exemples d'utilisation des animaux transgéniques

1.1. En tant que modèles de maladies ou de pathologies

Depuis longtemps, afin d'étudier certaines maladies et pathologies, des modèles spontanés ont été utilisés. Mais ils présentent quelques inconvénients. Leur obtention est difficile car souvent le fruit du hasard, ce qui complique l'identification et la caractérisation du défaut génétique à l'origine du caractère intéressant [107]. A cela s'ajoute le maintien de la lignée pouvant s'avérer coûteux.

La transgénèse animale en permettant l'addition, l'inactivation ou encore le remplacement de gènes spécifiques a permis d'obtenir des modèles plus pertinents que ceux obtenus suite à des mutations spontanées.

Ainsi, ces dernières années, de nombreux modèles animaux ont été créés et des bases de données sont désormais disponibles pour tous les chercheurs : TBASE (Transgenic/Targeted Mutation Database) ou IMR (Induced Mutant Resource) [4, 62, 63]. De plus, une nomenclature des animaux transgéniques a été mise en place facilitant ainsi le recensement des différentes lignées (voir Annexe 1) [30].

1.1.1. Dans l'étude de l'athérosclérose

Avant l'avènement des souris transgéniques, la souche C57BL/6 était la plus utilisée dans les études sur les lipides et l'athérosclérose, mais les lésions artérielles obtenues suite à des régimes particuliers ne correspondaient pas exactement aux phénomènes observés chez l'homme. Depuis les techniques de transgénèse ont permis d'obtenir des modèles plus proches de l'homme et les lésions observées chez de tels animaux concordent plus avec les lésions humaines, sans pour autant avoir besoin de mettre en place des régimes particuliers. Le modèle le plus utilisé dans le cadre de ces études est le modèle déficient pour l'apoE (apolipoprotéine E, protéine servant de ligand dans la clairance des macromolécules lipidiques). Dans ce modèle, une hyperlipidémie massive est accompagnée du développement de plaques d'athérosclérose. Des souris transgéniques exprimant des formes mutantes de apoE ont également été développées [42, 81].

Même si aucun modèle animal ne pourra probablement mimer exactement le phénomène d'athérosclérose chez l'homme, les nouveaux modèles transgéniques sont devenus des outils indispensables de la recherche de ce domaine.

1.1.2. Dans l'étude de la douleur

La transgénèse permet actuellement l'étude de la douleur au niveau des gènes : il est possible de créer des lignées présentant différents niveaux d'expression (pas d'expression ou sur-expression, par exemple) de protéines impliquées dans le phénomène de douleur et jusqu'à 25 modèles de souris ont été étudiés [84].

Notamment les études de transgénèse ont permis d'explorer le rôle de la substance P dans le phénomène de douleur en construisant notamment des souris transgéniques pour lesquelles le gène codant pour le récepteur NK-1 (Neuro-kinine 1 qui est le récepteur de la substance P au niveau du système nerveux) est rendu non fonctionnel [35].

1.2. Utilisation des animaux transgéniques dans les études de toxicologie

Les animaux transgéniques sont aussi très utilisés pour les tests de génotoxicité et de carcinogénèse que ce soit pour des substances pharmaceutiques ou des produits chimiques [113]. Pour ce type d'études, il existe même deux modèles disponibles commercialement : Mutamouse® et Big Blue® [10, 90].

Dans le cadre des études de carcinogénèse, l'utilisation des souris transgéniques permet de réduire à la fois la durée des études mais aussi le nombre d'animaux utilisés car le taux de tumeurs spontanées chez ces animaux est plus faible. A ces avantages, s'ajoute le fait que leur utilisation améliore l'extrapolation des données entre espèces et permet ainsi d'accroître la sûreté de ces tests [32].

2. Limites de l'utilisation des animaux transgéniques

Bien que tous ces modèles semblent très prometteurs, il convient de citer quelques uns de leurs inconvénients tant au niveau pratique qu'à un niveau proprement éthique. Il ne faut pas non plus oublier que les animaux transgéniques génèrent des coûts importants même en choisissant d'utiliser des modèles déjà créés [73].

En recherche, les expériences menées doivent conduire à l'obtention de résultats « valables », ou du moins reproductibles et étant le reflet de la réalité. Cette validité nécessite non seulement un grand nombre d'animaux, mais aussi des variations inter-individuelles réduites au maximum. Ces variations étant principalement dues au fond génétique et au statut sanitaire des animaux, la standardisation microbiologique et génétique doit être prise en compte pour l'obtention de résultats valides. Dans le cas de animaux transgéniques, cette standardisation est d'autant plus importante car il y a eu modification génétique et que ces modifications peuvent rendre, par exemple, les animaux plus sensibles vis à vis de certains pathogènes [22]. La dernière limite à prendre en compte concerne plus particulièrement les problèmes d'ordre éthique.

2.1. La standardisation microbiologique

La standardisation microbiologique est importante car il est souhaitable d'éviter les maladies ou les infections opportunistes ayant un effet sur la validité des résultats [91]. Ces types d'effets sont très documentés dans la littérature [8, 54]. Certains pathogènes peuvent, par exemple, avoir un effet sur la réponse immunitaire et donc entraîner une modification des résultats attendus. De plus, certains pathogènes peuvent être létaux pour les animaux (ce qui pose le problème de la conservation des lignées transgéniques).

Pour s'assurer du statut sanitaire correct des animaux, il est nécessaire de mettre en place un programme de suivi sanitaire [91]. Des listes de pathogènes devant être recherchés sont publiées régulièrement, notamment par la FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations ou fédération européenne des associations de sciences de l'animal de laboratoire) [43, 44, 53]. Ce sont des listes d'exclusion d'agents infectieux pathogènes spécifiques et/ou interférents sur l'expérimentation qui servent de modèles aux suivis sanitaires effectués chez les fournisseurs d'animaux. Des listes additionnelles existent également : elles regroupent des micro-organismes qualifiés d'opportunistes qu'il est souhaitable de rechercher dans le cas d'animaux immuno-déprimés [127]. Ces suivis sanitaires ont permis des progrès importants ces dernières années dans le contrôle sanitaire des animaux de laboratoire [97]. Cependant, il peut devenir nécessaire de rechercher également des micro-organismes récemment répertoriés, inapparents mais dont la présence latente peut induire des interférences au niveau des résultats notamment avec des animaux immunodéprimés [127].

Dans le cas des animaux transgéniques, les lignées ne proviennent pas seulement des fournisseurs classiques chez lesquels un suivi sanitaire a été mis en place ; bien au contraire, beaucoup de lignées ont été créées au sein de laboratoires de recherche. Les laboratoires de recherche qui, le plus souvent, créent des modèles transgéniques n'ont souvent ni les moyens, ni la stricte nécessité d'avoir des animaux indemnes de maladies. Mais les laboratoires industriels qui utilisent ces animaux pour leurs recherches ne peuvent pas se satisfaire d'animaux dont l'état sanitaire n'est correctement contrôlé [58]. Il y a donc échange de lignées entre des laboratoires, mais aussi, par la même occasion possibilité d'échange de micro-

organismes (notamment les agents pathogènes endémiques de l'unité d'origine) [88] ce qui peut se révéler catastrophique d'un point de vue sanitaire.

Il est donc fortement recommandé que les lignées transgéniques soient « décontaminées ». Des méthodes de décontamination des lignées ont été mises au point et évaluées. La redérivation d'une lignée par transfert d'embryons est la méthode à utiliser de préférence [22] (il est possible également de réaliser des césariennes aseptiques [88], mais cette méthode s'avère inefficace en présence de certains pathogènes tels que le MHV (Mouse Hepatitis Virus ou Coronavirus de l'Hépatite de la Souris) qui peuvent se transmettre via le placenta [56]). Il faut également s'assurer de la stérilité microbiologique des locaux dans lesquels les animaux seront hébergés. Pour cela, la formolisation est la méthode la plus souvent utilisée [111]. Des méthodes regroupant plusieurs techniques ont été élaborées et testées : il est possible par exemple de décontaminer la lignée par transfert d'embryons et ensuite de la placer dans une animalerie qui aura été préalablement décontaminée [88]. En ce qui concerne la décontamination des pièces, la formolisation n'est pas la seule méthode possible [88].

2.2. La standardisation génétique

En raison du nombre de gènes très important qui composent tout organisme vivant supérieur (au moins 50 000 gènes pour un primate), toute modification du génome par des techniques de transgénèse a des effets multiples ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats obtenus : par exemple, beaucoup de transgènes sont silencieux, ou parfois ils s'expriment dans des tissus dans lesquels le promoteur n'est pas censé fonctionner [58].

Il est donc nécessaire de construire un nombre important de souris transgéniques en utilisant diverses constructions génétiques pour obtenir une souris qui soit intéressante par rapport au protocole expérimental en question [22].

Il est important de se rappeler que le phénotype observé n'est pas toujours le résultat direct de la modification génétique. Le fond génétique et l'environnement, ainsi que, comme nous l'avons vu précédemment, le statut sanitaire, sont des paramètres pouvant avoir une influence non négligeable sur le phénotype observé. Le fond génétique peut être défini comme l'ensemble de tous les gènes présents au niveau d'un organisme qui influencent un ou plusieurs caractères. Ainsi il est primordial que les paramètres environnementaux soient les plus constants possible au cours d'une expérimentation, de même qu'il est impératif d'utiliser des lignées avec un fond génétique uniforme ce qui facilitera grandement l'interprétation des résultats expérimentaux. Cependant, d'autres facteurs ayant une influence interviennent également, comme par exemple la possibilité de voies métaboliques compensatoires ou encore des effets spécifiquement dus à la transgénèse (nombre de copies du transgène, mutations insertionnelles) [75].

Le choix du fond génétique, c'est-à-dire la souche de souris utilisée pour les manipulations, s'avère tout aussi important que le choix de la mutation. Il convient également de maintenir la lignée pure d'un point de vue génétique. Le contrôle de la qualité génétique peut se faire par le biais de croisements [22].

Mais comme le maintien d'une lignée génère un coût important [73], une autre alternative existe : le maintien de la lignée par cryo-préservation des ovaires [119] ou du sperme.

2.3. Les problèmes éthiques

Ces dernières années, le bien-être des animaux en expérimentation animale fait de plus en plus partie des préoccupations de tous, le grand public comme les chercheurs.

Malgré certains avantages que les animaux transgéniques apportent au niveau de la recherche, ils soulèvent des problèmes éthiques, surtout en ce qui concerne directement leur bien-être [124].

Il y a d'un côté des objections morales fondamentales, que ce soit par rapport à l'utilisation des animaux en général pour des expérimentations ou par rapport au principe des modifications génétiques, et de l'autre les conséquences que ces modifications génétiques peuvent causer pour le bien-être animal.

2.3.1. L'expérimentation animale en elle-même

En ce qui concerne les expérimentations sur l'animal, le débat existe depuis longtemps et est toujours source de polémiques et cela malgré la mise en place d'une réglementation au niveau européen ou français, à un tel point qu'il pourrait sembler aujourd'hui risqué de pratiquer l'expérimentation animale, surtout suite aux nombreuses actions des activistes, notamment en Angleterre.

2.3.2. Les modifications et manipulations génétiques

Dans le cas plus particulier des animaux transgéniques, une autre objection concerne la nature même des modifications génétiques. Ces modifications n'étant pas « naturelles », certaines personnes considèrent que les chercheurs se livrant à de telles expériences se prennent « pour Dieu ». Ces opposants estiment que de telles manipulations ne respectent pas l'intégrité génétique des animaux car elles impliquent le mélange de matériel génétique provenant d'espèces différentes, et même de règnes différents (transfert de gènes animaux au niveau du génome d'une plante par exemple). De plus, ils considèrent également que ce type de manipulations avilit les animaux en les transformant en « produits » répondant aux souhaits du chercheur [15]. Cependant la recherche de modifications génétiques ne datent pas de l'apparition du génie génétique : l'homme depuis longtemps cherche à améliorer les performances des animaux et pour cela a recours à la sélection génétique tout comme celle-ci se fait naturellement [101], comme l'a montré Darwin dans son ouvrage, paru en 1859, « *De l'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle* ».

Les manipulations génétiques ont de nombreuses conséquences que ce soit au niveau des animaux ou au niveau de l'environnement et ce point est donc source de nombreuses questions de la part du grand public [12].

2.3.3. Les conséquences des modifications génétiques

La dernière question d'éthique concerne les conséquences possibles des modifications génétiques, mais là il y a plusieurs paramètres à prendre en compte : le bien-être de l'animal génétiquement modifié ainsi que les souffrances subies par les animaux lors de la production, sans oublier les risques que ces animaux génétiquement modifiés pourront causer à la santé humaine et animale en général et à l'environnement (ces risques seront évoqués plus amplement dans la Partie II).

Au moins deux aspects sont à prendre en considération : la production des animaux génétiquement modifiés et le bien-être de ces animaux lors de leur utilisation.

- Lors de la production des animaux transgéniques :

Les techniques de manipulation génétique, comme nous l'avons vu, comprennent différentes étapes. Elles impliquent différentes manipulations touchant le bien-être animal : administration de substances aux femelles donneuses afin de provoquer une super-ovulation, recueil des œufs fertilisés (soit en sacrifiant l'animal donneur, soit en procédant à une laparotomie dans le cas des animaux de rente), réimplantation par laparotomie des embryons modifiés génétiquement, vasectomie des mâles, etc... De plus, parfois, les femelles donneuses impliquées dans les accouplements sont très jeunes ce qui peut être une source de stress pour ces animaux [60].

Bien que ces techniques soient bien maîtrisées par ceux qui les effectuent et que tous les moyens devraient être mis en place pour limiter la douleur chez l'animal (anesthésie, analgésie, soins post-opératoires), les interventions chirurgicales peuvent être source de douleurs post-opératoires, tout comme la super-ovulation peut causer une certaine détresse, voire de la douleur, chez l'animal.

De plus, les pourcentages de réussite de ces techniques sont très variables d'une expérience à une autre [15] : les embryons peuvent mourir *in utero* et la survie post-natale n'est pas assurée. Une étude [134] a montré que dans des expériences de micro-injection pronucléaire réalisées avec sept constructions de transgène différentes, 1360 embryons sur un total de 1585 ont survécu à la micro-injection et ont été implantés chez des femelles pseudogestantes. Le taux moyen d'animaux sevrés obtenus à partir de ces embryons était de 29 % (avec des taux compris entre 21 et 42%). Mais seulement un quart de ces animaux était transgénique, soit environ 7% des embryons implantés. Evidemment de telles proportions varient selon les protocoles et les techniques utilisées [134].

- Pendant les procédures :

Le bien-être des animaux transgéniques peut être compromis de deux façons : à des fins de recherche, le génome de l'animal est volontairement modifié, introduisant ainsi un certain « handicap », mais cette modification du génome peut également conduire à des effets secondaires non attendus pouvant sérieusement compromettre le bien-être de l'animal [101].

Ce problème peut être illustré en utilisant comme exemple l'obtention de souris qualifiées de « géantes » [96]. Dans cette expérience, Palmitter et son équipe ont obtenu par micro-injection pro-nucléaire d'un gène humain stimulant la production de l'hormone de croissance certaines souris dites « géantes » (ces souris ayant intégré ce gène étaient plus grandes que leurs autres congénères n'ayant pas intégré ce gène). Mais d'autres expériences sur

ces souris ont permis la mise en évidence d'effets secondaires importants, notamment des atteintes chroniques des reins et du foie, ainsi que des tumeurs [11, 17, 101].

Bien que les bases de données et les articles scientifiques sur les animaux transgéniques soient nombreux, il est souvent à déplorer qu'il est rarement fait mention des problèmes de bien-être et de santé de ces animaux.

Il semble évident et indispensable que les spécialistes en science de l'animal de laboratoire (notamment les vétérinaires) prêtent plus attention à ce sujet et mettent en place des bases de données et des procédures concernant ce type de problème.

3. Quelques recommandations pour l'utilisation des animaux transgéniques

Pour des raisons diverses (éthiques, scientifiques mais aussi économiques), il est nécessaire de suivre quelques règles lors de l'utilisation d'animaux transgéniques. Ces règles vont également de paire avec les mesures plus techniques de confinement évoquées dans la Partie III concernant l'agrément des animaleries. Ces règles sont édictées par des associations européennes [106] ou américaines [1] spécialisées en science de l'animal de laboratoire. Il est également nécessaire de respecter les règles générales inhérentes à l'utilisation d'animaux de laboratoire [37].

Ces règles concernent les trois problèmes précédemment évoqués : le statut sanitaire et son maintien, le fond génétique et le bien-être.

Pour la qualité du statut sanitaire des animaux hébergés, certaines règles doivent être respectées tels que la quarantaine et l'éventuelle redétermination des lignées acquises, la désinfection des pièces d'hébergement et le suivi sanitaire des colonies en utilisant par exemple des animaux « sentinelles » [39, 95].

Du point de vue de la génétique, le maintien des lignées peut nécessiter des croisements entre différentes souches, mais ceux-ci doivent être réfléchis et correctement réalisés [85, 106].

En ce qui concerne le bien-être de ces animaux, l'observation de ces animaux doit être réalisée régulièrement par des personnes compétentes [106, 124], certains prônent même l'utilisation de fiches de suivi avec des scores permettant d'évaluer le bien-être de ces animaux [125].

Les animaux transgéniques sont en passe de devenir indispensables à toute recherche scientifique dans le domaine de la biologie, mais leur utilisation requiert le respect de certaines règles pour obtenir des résultats valables. En outre, en tant qu'organisme génétiquement modifié, leur utilisation est subordonnée au respect d'une législation relativement récente au niveau européen et français.

PARTIE II :
LEGISLATION

Suite au développement important ces dernières années des techniques de modifications génétiques, une législation spécifique concernant la production et l'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM) que ce soit à des fins de recherche ou à des fins industrielles s'est révélée nécessaire. L'Europe a donc mis en place une législation spécifique pour les OGM que la France, en tant que pays membre de l'Union Européenne, se devait de faire appliquer et de traduire en droit national. Dans le cas de l'utilisation des animaux transgéniques, cette législation récente est à appliquer en complément de la législation régissant depuis longtemps l'expérimentation animale.

Nous étudierons donc d'abord les bases de la législation concernant les OGM, puis de quelle manière l'Europe a mis en place un cadre législatif autour de l'utilisation des OGM pour finalement donner les lignes directrices de cette législation en France.

I. Bases de la législation applicable dans le cas de l'utilisation des animaux transgéniques

Différents paramètres sont à prendre en compte dans le cadre de l'utilisation des animaux transgéniques et la législation doit concrétiser le nécessaire souci de protection à différents niveaux : la protection de l'homme, la protection de l'environnement (risques de dissémination de produits génétiques modifiés) et bien sûr la protection des animaux au cours des protocoles expérimentaux.

1. Les risques de l'utilisation des OGM

Cette réglementation a deux buts, non seulement permettre aux expérimentateurs de travailler dans des conditions sûres, mais également protéger l'environnement [72].

Ces dernières années, les OGM sont devenus un sujet de polémiques. Les recombinaisons génétiques sont des opérations pouvant présenter des risques, des dangers et ceux-ci, en raison de la jeunesse de ces techniques, sont plus ou moins connus notamment en ce qui concerne les risques à long terme. Des mesures de prévention se sont donc avérées nécessaires afin d'assurer une meilleure protection de l'homme et de l'environnement. La législation, en codifiant, par divers textes, l'utilisation des OGM, doit permettre d'apporter les garanties satisfaisantes à l'opinion publique.

1.1. Notions de risque et de danger

Une distinction entre les termes de risque et de danger est nécessaire [28].

Le **risque**, dans le cas de l'utilisation d'OGM, peut être défini comme la probabilité qu'un effet spécifique se réalise dans les conditions expérimentales données. Il correspond à un **danger** éventuel plus ou moins prévisible.

Le **danger** peut revêtir deux aspects :

1. le danger potentiel est un danger qui est estimé possible, sans que pour autant que son occurrence ait été démontrée. C'est le cas le plus fréquent dans le cadre de l'utilisation d'OGM : la jeunesse des techniques ne permet pas un recul assez suffisant pour juger de l'éventualité de dommages possibles.
2. le danger objectif ou avéré est un danger réel dont l'occurrence a été démontrée. C'est par exemple le cas lors de l'utilisation d'un virus ou d'une bactérie pathogène ou encore de l'utilisation de gènes déterminant une pathogénicité. Dans ce cas, la mise en place de mesures appropriées peut contribuer à sa maîtrise.

1.2. Les différents risques dus à l'utilisation d'OGM

Il est nécessaire de distinguer deux types de risques : les risques issus des opérations de recombinaison génétique et les risques dus à l'utilisation des OGM.

1.2.1. Les risques des opérations de recombinaison génétique

Ces risques sont fonction des méthodes utilisées pour le transfert des gènes et des organismes entrant en jeu dans la conception d'un OGM.

Il est nécessaire de prendre en compte les différents acteurs entrant en jeu dans la création d'un OGM (organismes donneur et receveur, vecteur, fragment d'ADN). Deux types de risques sanitaires sont à distinguer :

1. le risque sanitaire classique, d'ordre infectieux [93], découlant directement du pouvoir pathogène propre à chacun des organismes utilisés dans les manipulations. Ce domaine est bien codifié car il se rattache directement à celui de la pratique de la microbiologie et il a conduit à la classification des organismes pathogènes, se retrouvant notamment dans différents textes législatifs ou normes. Cette classification a également amené à des définitions précises des moyens de protection et de prévention. Ces risques sont présents plus spécifiquement lors de la manipulation de rétrovirus, par exemple, en tant que vecteur de transgénèse.
2. le risque découlant directement de la modification génétique [116]. Ce risque est plus complexe à définir et à prédire. Il peut avoir pour origine les caractéristiques de l'ADN que l'on souhaite insérer (par exemple dans le cas d'un oncogène ou d'un gène de la protéine de prion). Dans le cas de la manipulation de génomes viraux, des recombinaisons non voulues peuvent avoir lieu, conduisant alors à la réactivation d'un virus par échange de matériel génétique (par exemple entre le génome du virus vecteur et le génome d'un virus endogène à l'animal transgénique).

1.2.2. Les risques dus à l'utilisation des animaux transgéniques [59]

Tout d'abord les risques spécifiquement dus à l'espèce animale : en raison des propriétés inconnues que peuvent présenter les animaux, il est nécessaire d'évaluer les possibilités que l'animal puisse s'échapper, vivre et se multiplier dans l'environnement. Ce risque est d'autant plus important quand l'ADN inséré confère à l'animal des avantages sélectifs (meilleur taux de reproduction, résistance à des maladies) [89]. Ce risque doit être également pris en compte lors du transport de l'animal car, à ce moment, il y a également possibilité de fuite de l'animal et de dissémination dans l'environnement.

Il y a également le risque pour le personnel manipulant les animaux (risque de morsure ou griffure, transmission de zoonoses ou encore allergies).

Les manipulations transgéniques présentent également un risque important pour les animaux génétiquement modifiés, mais dans ce cas il s'agit surtout de problèmes de bien-être, problème évoqué précédemment (voir Partie I).

L'utilisation des animaux transgéniques présente donc des risques à la fois pour le manipulateur, l'animal et l'environnement. Le plus grand problème posé par les OGM est le fait que ces risques sont difficiles à définir et cerner avec précision et donc leur évaluation est difficile. Mais la législation a été conçue de façon à aider l'utilisateur dans cette évaluation, notamment par le biais d'organes de conseils.

2. Comment prévenir ces risques : bases de la législation

Il existe deux façons de se prémunir des risques évoqués précédemment par des actions soit au niveau de la source du risque même, soit au niveau de l'exposition à ceux-ci. Tout en étant différentes, ces deux approches sont irrémédiablement complémentaires. Mais avant de mettre en place ce type d'actions, il est nécessaire de procéder à l'évaluation des risques.

2.1. L'évaluation des risques

Pour une efficacité maximale des mesures de prévention, il faut que celles-ci soient en adéquation avec le risque présent, mais également avec le protocole suivi. Préalablement à toute évaluation, le protocole expérimental doit être analysé permettant ainsi d'identifier les risques potentiels et avérés dans le but de connaître les étapes les plus risquées et donc ceux où la prévention se doit d'être maximale (voir Figure 19).

Les facteurs de risque devant être vérifiés et analysés sont les suivants :

- les propriétés de l'organisme donneur, notamment son caractère éventuellement pathogène ;
- les propriétés de l'organisme receveur ;
- les techniques utilisées (si la technique par infection rétrovirale est utilisée, l'utilisation d'un vecteur viral peut engendrer un risque infectieux) ;
- les caractéristiques de l'insert ;

- les propriétés de l'OGM en lui-même, notamment si la transgénèse lui a apporté des avantages sélectifs (par exemple, un meilleur taux de reproduction ou une résistance accrue vis-à-vis de certains pathogènes).

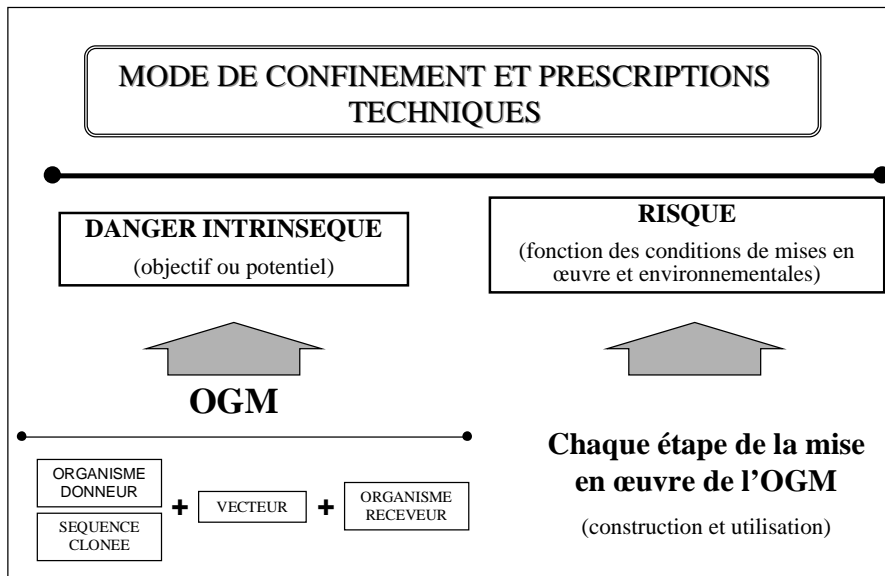


Figure 19 : Principe de l'évaluation des risques (d'après [136])

2.2. Les méthodes de prévention

Il y a deux niveaux d'action pour la prévention : action au niveau des sources de risque et action au niveau de l'exposition à ces mêmes risques.

2.2.1. Réduire les sources de risques

Avant toute chose, il est nécessaire de suivre les règles élémentaires en hygiène et sécurité au sein de tout laboratoire. Elles sont gages à la fois de la protection de l'expérimentateur mais aussi de la réussite des expériences, ce qui est important dans le cas de la transgénèse en raison de leur coût. La rigueur des manipulations est requise pour assurer protection et réussite [129].

Un risque important est constitué par la dissémination de l'ADN recombiné. Un moyen de protection essentiel est la mise en place de barrières qualifiées de « biologiques », on parle alors de confinement biologique, notion à ne pas confondre avec le confinement physique.

L'utilisation de souches rendues déficientes permet de minimiser l'exposition au risque infectieux. Par exemple, dans le cas d'un vecteur viral, on utilise des virus incapables de se répliquer. Cela permet de s'assurer que leur survie en dehors du laboratoire soit quasiment impossible. Cependant, ce système a ses failles car il paraît plausible que des recombinaisons génétiques aient lieu pouvant conduire à la réactivation des virus inactivés.

A la mise en place de ce confinement s'ajoute le respect de ce qui est communément appelé les bonnes pratiques de laboratoire [72]. Les manipulations génétiques nécessitent de la rigueur de la part de ceux qui les effectuent. Cette rigueur est d'autant plus importante lors de l'utilisation de vecteurs viraux. Le manipulateur doit également utiliser tous les moyens mis à sa disposition pour se protéger lors des manipulations : port de gants, de lunettes...

2.2.2. Réduire l'exposition aux sources de risques

Le maillon essentiel de cette étape est le confinement physique.

Le confinement physique réside dans le fait d'établir des barrières protégeant l'environnement et limitant les risques de dissémination accidentelle. Le but du confinement physique est d'empêcher toute contamination et/ou dissémination accidentelle que ce soit pour le manipulateur ou pour l'environnement. Pour cela, il est nécessaire de prendre en compte tous les modes de contamination possibles (par voie aérienne ou par voie sanguine, par exemple).

Les modes de confinement physique sont multiples : conception des locaux et utilisation de moyens auxiliaires (matériels, équipements, prescriptions particulières). Les locaux où les manipulations ont lieu doivent se trouver soit dans des pièces séparées des autres pièces et dont l'accès doit être contrôlé, soit dans des bâtiments séparés. Ce choix doit être fait en fonction des risques en jeu (voir Figure 20).

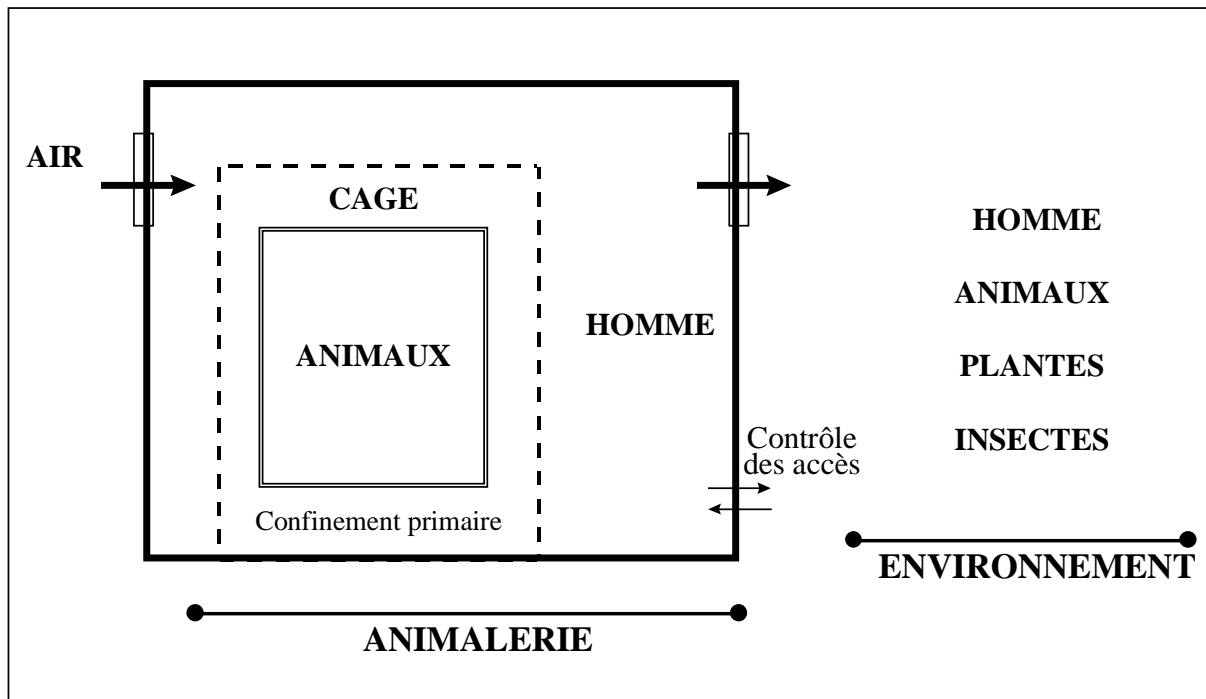


Figure 20 : Le principe du confinement dans le cas de l'utilisation de petits animaux transgéniques (d'après [136])

Au contrôle de l'accès, s'ajoute la mise en place éventuelle d'une ventilation spécifique avec filtration absolue (utilisation de filtres « HEPA » : High Efficiency Particulate Air) de l'air entrant et/ou sortant. Dans certains cas, une circulation de l'air en pression négative peut être également mise en pratique.

Des équipements spécifiques peuvent aussi être utilisés en fonction du classement de risque : postes de sécurité microbiologique (PSM), autoclaves ou encore enceintes de confinement des animaux.

Les PSM, de trois types possibles en fonction de leur degré de confinement, permettent une protection par rapport aux aérosols infectieux et protègent le manipulateur et l'environnement vis-à-vis des micro-organismes pathogènes.

Les autoclaves peuvent être nécessaires pour la stérilisation des déchets et du matériel utilisé.

Il existe trois types d'enceintes de confinement avec filtration de l'air :

- les armoires ventilées dans lesquelles des portoirs avec des cages classiques sont installés ;
- les cages à couvercle filtrant ;
- les portoirs à cages ventilées individuellement (ou « IVC racks »).

Chacun de ces systèmes possède ses avantages et ses inconvénients. L'utilisation des armoires ventilées peut être une alternative intéressante pour des institutions possédant des animaleries classiques mais qui ne souhaitent pas construire de nouveaux locaux pour l'hébergement des animaux transgéniques. Les cages à couvercle filtrant, malgré leur faible coût et leur utilisation facile, présentent un inconvénient majeur : le taux de renouvellement de l'air à l'intérieur de ce type de cage est faible (1 renouvellement d'air par heure même si la pièce où elles se trouvent à un taux de renouvellement de 20).

Un troisième point important de la prévention concerne les risques lors de la manipulation des animaux (par exemple morsure) par le personnel. Il peut être nécessaire de mettre en place et de respecter :

- des règles d'hygiène et de sécurité ;
- des mesures médicales préventives comme le suivi des vaccinations du personnel ou encore des examens médicaux et des analyses (sang, selles) réguliers.

En raison des nombreux risques en jeu et de leur caractère parfois imprévisible, des mesures de prévention doivent être mises en place. La législation intervient à ce niveau en codifiant l'utilisation des OGM.

II. Au niveau européen

Avant d'expliciter les grands principes de la législation européenne en matière d'utilisation des animaux transgéniques dans le cadre de la recherche, nous évoquerons l'histoire de la construction de l'Union Européenne, ainsi que les bases de la législation communautaire.

1. L'Union Européenne

1.1. Historique [7, 122]

La naissance de la communauté européenne date de 1957 avec la signature des traités de Rome (25 mars 1957) qui ne seront appliqués qu'à partir du 1^{er} janvier 1958. A la fin de la seconde guerre mondiale, est apparue l'idée de créer en Europe une fédération de 6 pays (Allemagne, Belgique, France, Italie, Luxembourg et Pays-Bas). Le but de cette union à la fois économique et politique était de faire face aux deux blocs de la guerre froide : les Etats-Unis et l'U.R.S.S..

Mais cette idée a évolué en une communauté permettant à chaque état de conserver une souveraineté nationale. Les traités de Rome permettent la mise en place de la CEE (Communauté Européenne et Economique) ainsi que diverses institutions (Commission Européenne, Assemblée, Conseil des Ministres, Cour de Justice). Le but est de « *établir une union sans cesse plus étroite entre les peuples européens* » notamment par la mise en place d'un « *marché commun* », d'une « *union douanière* » avec une libre circulation des biens, des personnes, des services et des capitaux. Ces différents traités entrent en vigueur le 1^{er} janvier 1958.

A La Haye, a lieu en décembre 1969 une conférence montrant un progrès vers l'achèvement de la Politique Agricole Commune (PAC) et vers l'union économique et monétaire.

En 1973, cette communauté de 6 pays s'agrandit avec l'arrivée du Danemark, de l'Irlande et du Royaume-Uni. Puis, en 1981 la Grèce et en 1986 l'Espagne et le Portugal rejoignent la Communauté Européenne.

En juin 1985, a lieu la signature du livre blanc de la Commission, ce traité ayant pour but la création d'un véritable marché intérieur en supprimant les obstacles aux échanges entre les différents pays membres.

En février 1986, l'Acte Unique Européen est signé : c'est le début de l'Europe sans frontières avec libre circulation des personnes, des marchandises, des services et des capitaux.

A Maastricht, en février 1992, a lieu la signature du Traité de l'Union Européenne qui modifie les traités de Rome, ce traité entre en vigueur le 1^{er} novembre 1993.

L'Union Economique et Monétaire, quant à elle, est entrée en vigueur le 1^{er} janvier 1994.

D'autres pays, l'Autriche, la Finlande et la Suède, rejoignent l'Union Européenne en 1995. L'Union Européenne est alors constituée de 15 pays ce qui implique une réforme de ses institutions. C'est chose faite en juin 1997 avec le Conseil Européen d'Amsterdam.

Lors du Conseil Européen de Madrid en décembre 1995, le nom « *euro* » est adopté pour la dénomination de la monnaie unique et celle-ci devant être mise en place, dans les pays le souhaitant, au plus tard le 1^{er} janvier 2002.

Actuellement l'Europe est composée de 15 pays (en 1995, la population était de 370 millions d'habitants pour une surface de 3 235 000 km² - voir Figure 21), et des négociations sont en cours pour l'adhésion de nouveaux pays (Estonie, Pologne, République Tchèque, Hongrie, Slovénie et Chypre).



Figure 21 : Carte des 15 États Membres de l'Union Européenne (d'après [2])

1.2. Les institutions européennes [7, 99]

L'Union Européenne possède trois pouvoirs importants :

- émission de lois européennes s'appliquant aux États Membres ;
- gestion du budget destiné à financer les différentes politiques (par exemple la PAC) ;
- signature d'Accords internationaux (de coopération ou de commerce par exemple).

Toutes ces décisions sont prises par des institutions qui siègent à Bruxelles, Strasbourg et Luxembourg. Ces institutions régissent également les rapports entre les 15 États Membres et ainsi que leurs rapports vis-à-vis des États tiers.

Trois de ces institutions participent directement au pouvoir législatif : le Conseil de l'Union Européenne, la Commission Européenne et le Parlement Européen. Ces institutions sont chapeautées par le Conseil Européen qui fixe les objectifs politiques (orientation politique générale communautaire).

Il y a également deux organes consultatifs (le Comité Economique et Social et le Comité des Régions) ainsi que d'autres institutions plus particulières comme la Cour de Justice Européenne et la Cour des Comptes Européenne. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux trois premières institutions qui participent activement à l'élaboration du droit communautaire.

1.2.1. Le Conseil de l'Union Européenne

Appelé auparavant Conseil des Ministres, il a pris le nom de Conseil de l'Union Européenne suite au Traité de Maastricht et il siège à Bruxelles le plus souvent. C'est le principal organe de décision de l'Union Européenne et il représente également l'autorité législative ultime. Il ne faut pas le confondre avec le Conseil Européen qui rassemble les chefs d'état ou de gouvernement des Etats Membres, ni avec le Conseil de l'Europe qui est une organisation internationale.

Le Conseil a de nombreuses compétences. C'est un organe législatif ; il exerce ce pouvoir conjointement avec le Parlement Européen par le biais de la procédure de co-décision. Il assure également la coordination des politiques économiques générales des Etats Membres. Il peut également conclure, au nom des Communautés Européennes, des accords internationaux. Avec le Parlement, il constitue l'autorité budgétaire de l'Union.

Organe politique, il définit les orientations politiques générales sous forme de « Déclarations » devant être prises à l'unanimité. Il est l'instance suprême de la coopération politique communautaire. Par là-même, il échappe au pouvoir d'initiative de la Commission et au contrôle politique du Parlement. Cependant, il n'élabore aucun texte législatif.

Outre les textes classiques de la législation européenne (règlements, directives, décisions, recommandations et avis), le Conseil peut également adopter des conclusions de nature politique ou d'autres types d'actes, tels que des déclarations ou des résolutions. De plus, il fixe aussi les conditions régissant l'exercice des pouvoirs exécutifs conférés à la Commission ou réservés au Conseil lui-même.

1.2.2. La Commission Européenne

La Commission Européenne, siégeant à Bruxelles, est un organe politique aux compétences multiples qui se réunit de façon hebdomadaire pendant au moins un jour. Elle est composée de 21 commissaires indépendants et nommés par le gouvernement des Etats Membres pour un mandat de 4 ans renouvelable (il y a deux commissaires pour les pays les plus grands et 1 seul pour les autres). Chaque commissaire est responsable d'un secteur précis. Bien qu'ils soient désignés d'un commun accord par leurs gouvernements respectifs avec l'approbation du Parlement, ils se doivent d'exercer leur mandat en toute indépendance, dans l'intérêt de la Communauté.

Elle joue un rôle très important dans le processus d'élaboration des politiques de l'Union Européenne, sa tâche principale étant de veiller au respect de la législation communautaire. Cependant, elle ne prend aucune décision sur les politiques et les priorités de l'Union Européenne.

Elle exerce trois fonctions distinctes : initiative législative, gardienne des traités et organe de gestion et d'exécution des politiques européennes.

Elle détient le monopole de l'initiative des décisions communautaires et élabore les propositions soumises aux deux instances décisionnelles (Parlement et Conseil). Pour cela, elle se doit de tenir compte des orientations des autorités nationales. De par sa position centrale, la Commission entretient des liens particuliers avec chacune des différentes institutions, notamment des collaborations avec le Conseil et le Parlement pour l'élaboration des actes législatifs communautaires (participation aux réunions du Conseil et du Parlement).

En tant que gardienne des traités, la Commission peut engager des procédures d'infraction (principalement des procédures dites de « retour en carence ») vis-à-vis des Etats Membres ne respectant pas les obligations incombant en vertu du traité. Elle peut également imposer des sanctions à des particuliers, des entreprises ou des organismes pour violation du droit des traités.

En tant qu'organe exécutif, la Commission gère le budget et prend les textes d'application des actes pris par le Conseil.

1.2.3. Le Parlement Européen

Le Parlement Européen représente les 370 millions d'habitants de l'Union Européenne et est composé de 626 députés européens élus au suffrage universel direct tous les 5 ans (leur mandat étant renouvelable) et regroupe tous les courants politiques importants de l'Union Européenne. Il se réunit à Strasbourg. Il a également à disposition 20 commissions spécialisées.

En ce qui concerne le pouvoir législatif, le Parlement examine les propositions de la Commission et est associé, avec le Conseil, au processus législatif selon différentes modalités ayant évolué depuis l'origine de l'Union Européenne. Le Parlement est habilité à amender, voire adopter les textes législatifs, partageant ainsi, dans de nombreux domaines, le pouvoir de décision avec le Conseil. Il existe différentes procédures :

- la procédure de codécision qui le place sur un pied d'égalité avec le Conseil pour l'adoption de la législation communautaire. En cas de désaccord entre les deux, un comité de conciliation peut se réunir. Cette procédure s'applique dans un grand nombre de matières, notamment dans le domaine de la protection des consommateurs et de la santé (sujets en rapport avec les organismes génétiquement modifiés) ;
- la procédure de consultation permet au Parlement d'émettre un avis avant que le Conseil n'adopte une proposition législative émanant de la Commission. Cette procédure s'applique dans des domaines particuliers, tels que l'agriculture ou la fiscalité ;
- la procédure de coopération permet d'améliorer les propositions législatives par le biais d'amendements ;
- la procédure d'avis conforme ne s'applique que pour des domaines législatifs sur lesquels le Conseil se prononce à l'unanimité et qui ne concernent que l'organisation et les objectifs des Fonds structurels et des Fonds de cohésion.

Depuis le Traité de Maastricht, le Parlement possède un droit d'initiative législative limité, lui permettant de demander à la Commission de présenter une proposition. Il a également un rôle dans le contrôle du budget et le contrôle de l'exécutif.

Ainsi, le pouvoir législatif, au sein de l'Union Européenne résulte de l'interaction de différentes institutions (voir Figure 22) ayant chacune un rôle plus ou important dans l'élaboration des textes législatifs.

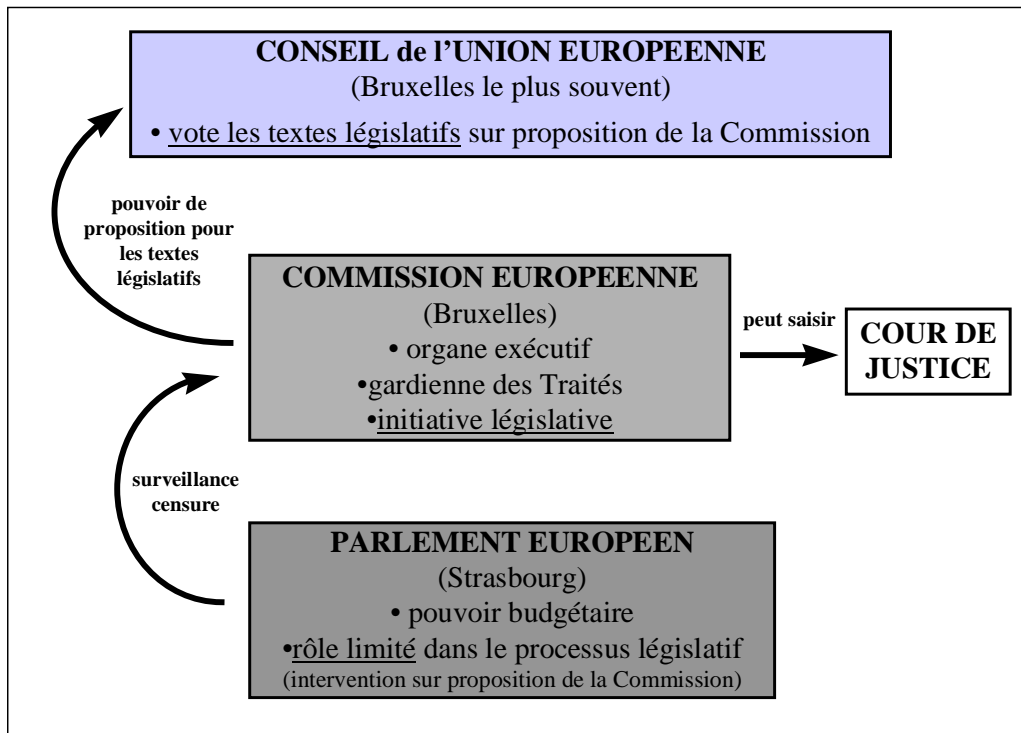


Figure 22 : Rôles des différentes institutions dans le cadre de la législation

1.3. Principe de fonctionnement de la législation européenne [99]

La force de la communauté européenne réside dans le droit communautaire. Celui-ci repose sur deux sources :

- les sources fondamentales constituées par les traités et les protocoles ;
- les sources secondaires qui comprennent les actes administratifs, c'est-à-dire les textes émanant du Conseil Européen et de la Commission Européenne et les actes juridictionnels qui sont les actes produits par la Cour de Justice Européenne. Ces textes permettent de régir les rapports entre les institutions européennes et les gouvernements des Etats Membres en définissant des procédures institutionnelles.

La législation communautaire et les positions communes du Conseil envoyées au Parlement Européen sont publiées au Journal Officiel des Communautés Européennes (JOCE) et ceci dans toutes les langues officielles de l'Union Européenne.

Le droit communautaire prime sur les droits nationaux et a un effet direct sur les législations des Etats Membres. On parle de primauté car les Etats Membres ne peuvent pas refuser d'appliquer le Droit Européen et ils ne peuvent pas le réformer. C'est par ce biais que peut se faire l'harmonisation des législations au sein de l'Union Européenne. L'obligation d'application de ce droit contraint les législateurs à modifier les législations nationales

préexistantes si celles-ci sont différentes. Les textes législatifs européens obéissent à une hiérarchie dont va dépendre leur incidence sur les textes nationaux.

Les différents Traités européens et les actes assimilés constituent le droit primaire. Les actes assimilés sont divisés en deux groupes :

- le droit dérivé c'est-à-dire tous les actes adoptés par les institutions en application des traités ;
- les accords externes (conclus entre l'Union Européenne et les pays tiers), les accords entre Etats Membres et ceux entre un des Etats Membres et un pays tiers devant être conformes. Ils lient l'Union Européenne et les Etats Membres, ils sont conclus en application des traités constitutifs et prévalent sur les actes de droit dérivé, les accords entre les Etats membres et les accords conclus par ces derniers avec les pays tiers.

La partie qui nous intéresse est constituée par le droit communautaire dérivé.

Il comprend les actes juridiques pris par le conseil de l'Union Européenne et le Parlement Européen, en application des traités. Deux catégories d'actes le composent : les actes contraignants et les actes non contraignants.

1.3.1. Les actes contraignants

Ce sont des actes administratifs obligatoires qui créent une obligation juridique pour tous les destinataires.

1.3.1.1. Le Règlement

Il permet dès publication l'application d'une règle uniforme applicable directement dans tous les Etats Membres, il s'adresse donc à tous les Etats Membres et est obligatoire pour tous. L'application est directe, sans modification possible, sans traduction dans le droit national et cela dès publication dans le Journal Officiel de la Communauté Européenne. Un objectif et des moyens pour l'atteindre sont ainsi fixés. C'est l'acte le plus contraignant qui soit.

1.3.1.2. La Directive

Elle fixe des objectifs à atteindre par les Etats Membres en leur laissant le choix des moyens, l'obligation résidant dans le résultat. Elle peut avoir une portée générale si elle s'adresse à tous les Etats Membres, ou une portée individuelle (pour quelques Etats seulement). Il y a dans ce cas une obligation de transcription obligatoire dans le droit national et la Directive prévoit une date limite pour y procéder. Le but premier de la Directive est l'harmonisation des législations nationales.

1.3.1.3. La Décision

Elle permet de réglementer des situations particulières, elle n'a qu'une portée individuelle et ne forme une obligation que pour les destinataires désignés, par exemple certains Etats Membres.

1.3.2. Les actes non contraignants

Ce sont des actes administratifs non obligatoires qui, eux, ne créent pas d'obligation juridique. Ces différents textes, que sont les résolutions, les déclarations, les accords, les recommandations, les délibérations, les conclusions, les codes de conduite, les actions ou les positions communes, n'ont qu'une valeur politique. Ils sont l'expression de la position des différentes institutions européennes vis-à-vis d'un problème donné. Ce sont des textes servant avant tout d'orientation.

1.3.2.1. Les Avis et les Recommandations

Ils correspondent à des « directives non obligatoires », ils ne permettent que l'orientation des législations et des comportements.

1.3.2.2. Les Résolutions

Ce sont des textes sans portée juridique mais qui constituent des engagements politiques et qui donnent lieu par la suite à des règlements, des directives ou des décisions.

1.3.2.3. Autres documents

La communauté européenne produit de nombreux documents contribuant à l'élaboration des normes européennes. Ils sont appelés « actes préparatoires ».

Ainsi la législation européenne peut sembler complexe pour le néophyte mais cette complexité peut s'expliquer du fait du nombre important de pays devant la suivre et l'appliquer.

2. La législation européenne : la Directive 90/219/CEE et les textes rattachés

Les textes européens concernant les micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) ont pour but de donner des principes minimaux afin d'orienter les législations des pays européens dans le domaine des modifications génétiques. Cependant comme l'indique le titre de la directive qui nous intéresse, « *Directive relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés* », le droit européen s'intéresse uniquement aux micro-organismes.

Il revient alors à chaque pays de décider d'étendre ou non le champ d'application de cette directive lors de sa transposition en droit national. Comme nous le verrons plus tard, la France a fait le choix d'étendre le champ d'application à tous les organismes génétiquement modifiés. De ce fait, il est intéressant de mettre en évidence les orientations de cette Directive pour comprendre la législation française dans ce domaine.

La Directive 90/219/CEE [3] relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés a été adoptée le 23 avril 1990 et est entrée en vigueur le 23 octobre 1991. Cette Directive a été également modifiée par la Directive 98/81/CE [9] adoptée le 26 octobre 1998. Les Etats membres se devaient de transposer cette nouvelle Directive (ou plus exactement les modifications qu'elle a entraînées) en droit national avant le 5 juin 2000 [29].

Une deuxième Directive européenne a aussi pour objet les MGM mais elle concerne exclusivement la dissémination volontaire : la Directive 90/220/CEE [4] modifiées par les Directives 94/15/CE [6] et 97/35/CE [7]. Elle s'applique par exemple dans le cas des champs expérimentaux de plantes transgéniques où il y a risque de dissémination de MGM. Dans le cas qui nous intéresse, la dissémination des MGM ne peut être qu'involontaire, l'utilisation des MGM devant être réalisée de manière confinée.

Bien que ces deux Directives concernant exclusivement les MGM datent de 1990, une Recommandation datant de 1982 peut être considérée comme le point de départ : la Recommandation 82/472/CEE [1] du Conseil du 30 juin 1982 concernant l'enregistrement des travaux relatifs à l'ADN recombinant. Il est fait mention dans cette Recommandation de la notification préalable avant début de toute utilisation d'ADN recombinant, principe que l'on retrouvera plus tard dans la Directive 90/219/CEE [3].

Remarque : il convient de noter que les références (numéros) des articles cités correspondent à celles retrouvées au niveau de la Directive 90/219/CEE. Dans la suite du texte quand la Directive 90/219/CEE est citée, il est sous-entendu qu'il faut également prendre en compte ses modifications suite à la Directive 98/81/CE.

2.1. Définitions de quelques termes

Avant toute chose, il est nécessaire de comprendre les termes employés par le législateur, non seulement les termes de « *micro-organismes génétiquement modifiés* » et d'« *utilisation confinée* », mais aussi d'« *accident* », d'« *utilisateur* » et de « *notification* ».

2.1.1. Micro-organisme génétiquement modifié (articles 2 et 3 et annexes I et II [3, 9])

2.1.1.1. Définition

Par « *micro-organisme* », il est entendu :

« toute entité microbiologique, cellulaire ou non cellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique ».

La Directive 98/81/CE [9] précise et élargit le champ d'application en ajoutant les micro-organismes suivants : « *les virus, les viroïdes et les cultures de cellules végétales et animales* ».

Par « *micro-organisme génétiquement modifié* » (avec pour abréviation MGM), il est entendu :

« un micro-organisme dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne se produit pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle ».

Suite à cette définition, il est nécessaire de définir plus précisément les techniques conduisant ou non à des modifications génétiques au sens de la loi.

2.1.1.2. Techniques conduisant à des modifications génétiques au sens de la loi

Afin que cette définition soit mieux comprise par tous, une liste des techniques conduisant à une modification génétique, au sens de la législation, est donnée : « *la modification génétique résulte au moins de l'utilisation des techniques énumérées à l'annexe I, partie A* ». Ces techniques comprennent notamment :

- « *les techniques de recombinaison de l'acide nucléique impliquant la formation de nouvelles combinaisons de matériel génétique grâce à l'insertion de molécules d'acide nucléique produites par quelque moyen que ce soit en dehors d'un organisme, dans un virus, dans un plasmide bactérien ou dans tout autre système vecteur, ainsi qu'à leur incorporation dans un organisme hôte dans lequel elles ne sont pas présentes à l'état naturel mais dans lequel elles sont capables de continuer à se reproduire* »
- « *les techniques impliquant l'incorporation directe dans un micro-organisme de matériel héréditaire préparé à l'extérieur du micro-organisme, y compris la micro-injection, la macro-injection et le micro-encapsulage* »

- « les techniques de fusion cellulaire ou d'hybridation dans lesquelles des cellules vivantes présentant de nouvelles combinaisons de matériel génétique héréditaire sont constituées par la fusion de deux ou plusieurs cellules au moyen de méthodes ne survenant pas de façon naturelle ».

2.1.1.3. Champ d'exclusion de la Directive

Il est à noter que certaines techniques, énumérées à l'annexe I, partie B, ne sont pas considérées comme des techniques conduisant à des MGM au sens de la loi. Ce sont les suivantes : « la fécondation, *in vitro* », « des processus naturels comme la conjugaison, la transduction, la transformation » et « l'induction polyploïde ».

En outre, dans l'article 2, le champ d'exclusion de la Directive est précisé ; la Directive ne s'applique pas :

- « aux modifications génétiques résultant de l'utilisation des techniques/méthodes énumérées à l'annexe II, partie A » c'est-à-dire « la mutagenèse », « la fusion cellulaire (y compris la fusion de protoplastes) d'espèces procaryotes qui échangent du matériel génétique par le biais de processus physiologiques connus », « la fusion cellulaire (y compris la fusion de protoplastes) de cellules de n'importe quelle espèce eucaryote, y compris la production d'hybridomes et les fusions de cellules végétales » et « l'autoclonage ». Toutes ces techniques sont à exclure du champ d'application de la Directive, à condition « qu'elles n'utilisent pas de molécules d'acides nucléique recombinant ou de MGM autres que ceux issus d'une ou plusieurs des techniques/méthodes ». Cependant en ce qui concerne l'autoclonage, il est possible d'utiliser des vecteurs recombinants sous certaines conditions: « l'autoclonage peut comporter l'utilisation de vecteurs recombinants dont une longue expérience a montré que leur utilisation dans les micro-organismes concernés était sans danger ».
- « aux utilisations confinées » (ce terme sera explicité dans le paragraphe suivant) « impliquant uniquement des types de MGM répondant aux critères énumérés à l'annexe II, partie B ». Dans cette annexe sont énumérées des critères établissant l'innocuité de certains MGM pour la santé humaine et l'environnement. Ces critères n'étant pas présents initialement dans la directive, ils ont été complétés suite à l'expérience acquise par les Etats Membres (cf. article 21) et ce complément d'information provient de la Décision 2001/204/CE [11]. Une liste de ce type de MGM doit être donnée (conformément à l'article 21 de la Directive) dans la législation (annexe II, partie C), mais cela n'a pas encore été fait. Afin qu'un MGM figure dans la partie C de l'annexe II, il faut apporter la preuve qu'il réponde à certains critères. Il y a d'un côté des critères généraux tels que la « vérification/authentification de la souche », la présentation d'un « dossier documentaire attestant la sécurité » et la « stabilité génétique » et de l'autre des critères « spécifiques » tels que la preuve du caractère « non pathogène » (c'est-à-dire « non génotoxique » et « non allergénique »), la preuve de « l'absence d'agents pathogènes incidents » (le MGM ne doit pas contenir d'autres micro-organismes actifs ou latents que ce soit à proximité ou à l'intérieur même) ou de « transfert de matériel génétique » (le matériel génétique transféré dans le MGM ne doit pas entraîner de dommage en cas de transfert, ce qui signifie pas d'auto-transmissibilité ou de transfert de celui-ci à des fréquences supérieures aux gènes du micro-organisme récepteur ou parental), « sécurité pour

l'environnement en cas de dissémination importante et involontaire » (les MGM ne doivent pas avoir d'effets nuisibles immédiats ou à plus ou moins long terme suite à une dissémination importante et involontaire).

2.1.2. Utilisation confinée (article 2 [3, 9])

Le second terme important à définir est celui de « *utilisation confinée* » car il définit le sens même de l'utilisation des MGM dans cette Directive.

Par « *utilisation confinée* », il est entendu « *toute opération dans laquelle des micro-organismes sont génétiquement modifiés ou dans laquelle des MGM sont cultivés, stockés, transportés, détruits, éliminés ou utilisés de toute autre manière et pour laquelle des mesures de confinement spécifiques sont prises pour limiter le contact de ces micro-organismes avec l'ensemble de la population et l'environnement ainsi que pour assurer à ces derniers un niveau élevé de sécurité* ».

Dans cette définition, une notion fondamentale dans le cas des MGM et des OGM apparaît : la notion de confinement (« *mesures de confinement spécifiques* »).

2.1.3. Notification (article 2 [3, 9])

Par « *notification* », le législateur entend la « *présentation des informations requises aux autorités compétentes* » (article 2). Les autorités compétentes sont les autorités en charge de l'examen des dossiers de notification et sont désignées par les Etats Membres (article 11). Elles peuvent être constituées par des administrations déjà existantes ou par des administrations spécialement mises en place dans ce but.

2.1.4. Accident (article 2 [3, 9])

Pour le législateur, un « *accident* » correspond à « *tout incident qui entraîne, pendant l'utilisation confinée, une dissémination importante et involontaire de MGM pouvant présenter un danger immédiat ou différé pour la santé humaine ou l'environnement* ». Cette définition montre bien une des finalités de la législation : la protection de l'homme et de l'environnement en cas d'accident.

2.1.5. Utilisateur (article 2 [3, 9])

Un « *utilisateur* » dans le cadre de cette législation désigne « *toute personne physique ou morale responsable de l'utilisation confinée de MGM* ».

2.2. Classes de risque et mesures de confinement

Le terme de « *confinement* », terme fondamental de cette législation, apparaît dans la définition de l'utilisation confinée (article 2).

Selon l'alinéa 1 de l'article 5, les Etats Membres se doivent de veiller à « *ce que toutes les mesures appropriées soient prises afin d'éviter que l'utilisation confinée de MGM n'entraîne des effets négatifs pour la santé humaine et l'environnement* ». Cette phrase résume l'essentiel de cette loi : la protection de la santé humaine et de l'environnement. Pour cela différentes mesures doivent être prises.

Il faut tout d'abord évaluer les risques : « *l'utilisateur procède à une évaluation des utilisations confinées du point de vue des risques qu'elles peuvent présenter pour la santé humaine et l'environnement* ».

2.2.1. Evaluation

Le but de l'évaluation est de classer les opérations mettant en jeu des MGM afin de mettre en place les mesures de confinement nécessaires et ainsi permettre une utilisation avec le moins de risques possibles pour la santé humaine ou l'environnement. Pour réaliser cette évaluation, l'utilisateur a à disposition différents « *éléments d'évaluation et la procédure définis dans l'annexe III, parties A et B* » (Article 5, alinéa 2 [3, 9]).

2.2.1.1. Les critères à prendre en compte

Tout d'abord, certains éléments doivent être « *considérés comme des effets potentiellement nocifs* » : « *maladies pouvant affecter l'homme* » (en prenant également en compte les effets allergisants et toxiques), « *maladies pouvant affecter les animaux ou les végétaux* », « *effets délétères dus à l'impossibilité de soigner une maladie ou de disposer d'une prophylaxie efficace* », « *effets délétères dus à l'établissement ou à la dissémination dans l'environnement* », « *effets délétères dus au transfert naturel dans d'autres organismes de matériel génétique inséré* ». Il est donc nécessaire d'évaluer le caractère pathogène avéré ou potentiel.

L'évaluation en elle-même se fonde sur différents éléments :

- l'identification de tout effet potentiellement nocif. Cette identification concerne tous les éléments entrant dans le processus de fabrication d'un MGM : micro-organismes récepteur et donneur, matériel génétique inséré, vecteur et le MGM en lui-même ;
- les caractéristiques de l'opération ;
- la gravité des effets potentiellement nocifs ;
- la possibilité de voir les effets potentiellement nocifs se réaliser.

2.2.1.2. La procédure d'évaluation

Une procédure spécifique est également définie, en différentes étapes. La première étape consiste en l'identification des propriétés nocives des différents composants du MGM et des composants ayant participé à son élaboration.

Puis, il convient de classer les MGM en 4 classes de risques selon certains critères. Pour ce classement, l'utilisateur a à sa disposition différents textes législatifs européens, notamment la Directive 90/679/CEE du Conseil [5] modifiée en dernier lieu par la Directive 97/59/CE [8]. Comme il est indiqué dans l'annexe III de la Directive : « *les classifications internationales, ou nationales et les révisions ... peuvent aussi être prises en considération* ». De plus, « *ces classes de risque peuvent servir de guide pour répartir les opérations impliquant une utilisation confinée dans les quatre classes de risque* ». L'utilisateur a donc à disposition différents documents pouvant le guider pour identifier et classer les risques.

Puis « *le choix des mesures de confinement et autres mesures de protection doit (...) être opéré sur la base du niveau de risque associé aux MGM* ». Mais d'autres points sont à prendre en compte : les caractéristiques de l'environnement susceptible d'être exposé, de l'opération et toute opération non standardisée. Une opération non standardisée consiste par exemple en l'inoculation de MGM à des animaux, susceptibles alors de générer des aérosols. La prise en compte de ces 3 points peut conduire à une modification du niveau de risque.

Toutes ces opérations d'évaluation étant alors effectuées, l'opération mettant en jeu des MGM peut alors être classée dans une des 4 classes de risques.

Mais « *la classification définitive doit être confirmée par un réexamen de l'ensemble de la procédure d'évaluation* ».

Une question ne doit pas être négligée lors de l'évaluation, celle de l'évacuation des déchets et des effluents et des mesures doivent être prises pour assurer la protection de la santé humaine et de l'environnement (Article 5, alinéa 5 [3, 9]).

De plus, « *l'utilisateur tient un dossier de l'évaluation* » et « *le fournit sous une forme appropriée à l'autorité compétente dans le cadre de la notification* » (Article 5, alinéa 6 [3, 9]).

2.2.2. Les différentes classes de risque

Il existe 4 classes de risque (Article 5, [3, 9]), cette classification est calquée sur celles des micro-organismes pathogènes. D'après l'article 5 de la Directive, les 4 classes et les niveaux de confinement associés sont les suivants, cette classification se fait selon le niveau de risque que présentent les opérations (voir Tableau 3)

Classe	Niveau de risque	Niveau de confinement indiqué
1	Risque nul ou négligeable	1
2	Risque faible	2
3	Risque modéré	3
4	Risque élevé	4

Tableau 3 : La correspondance de la classe de risque et du niveau de confinement
(d'après [3])

En ce qui concerne la classe 1, qui est la plus faible, la partie B de l'annexe III indique plus précisément quels sont les MGM qui peuvent y être classés : dans cette classe sont inclus seulement les MGM suivants : ces critères touchent surtout le caractère pathogène que ce soit pour l'homme, les animaux ou les végétaux :

- le micro-organisme récepteur ou parental n'est pas susceptible de provoquer une maladie (critère de non-pathogénicité) ;
- la nature du vecteur et de l'insert est telle qu'ils ne confèrent pas au MGM un phénotype susceptible de provoquer une maladie ou d'entraîner des effets délétères pour l'environnement ;
- le MGM n'est pas susceptible de provoquer une maladie ou d'entraîner des effets délétères pour l'environnement.

Pour classer les MGM selon les différentes classes, l'utilisateur a à sa disposition différents documents, tels que la Directive 90/679/CEE [5] du Conseil (modifiée en dernier lieu par la Directive 97/59/CE [8] de la Commission) ou encore les classifications nationales et internationales concernant les micro-organismes naturels (annexe III de la Directive). Mais ces classifications ne peuvent donner qu'une indication provisoire de la classe de risque.

2.2.3. Les mesures de confinement

En ce qui concerne « *le choix des mesures de confinement et autres mesures de protection* », « *il doit être opéré sur la base du niveau de risque associé aux MGM* », tout en prenant en compte les éléments suivants : « *caractéristiques de l'environnement susceptible d'être exposé, les caractéristiques de l'opération et toute opération non standardisée* » (Annexe III).

Selon l'alinéa 1 de l'article 6, « *l'utilisateur applique les principes généraux et les mesures de confinement et autres mesures de protection ... qui correspondent à la classe d'utilisation confinée* ». Le but de ces mesures est « *maintenir au niveau le plus faible qui soit raisonnablement possible l'exposition du lieu de travail et de l'environnement aux MGM* » afin « *de garantir un haut niveau de sécurité* ».

Ces mesures sont exposées dans l'Annexe IV de la Directive : les principes généraux y sont énoncés ainsi que des tableaux récapitulatifs. Ces mesures se retrouveront dans la législation française.

En outre, une révision de l'évaluation et de mesures de confinement et de protection est prévue et ne doit pas tarder à être appliquée dans deux cas (Article 6, alinéa 2, [3, 9]) :

- quand « *les mesures de confinement appliquées ne sont plus appropriées* » ou quand « *la classe attribuée aux utilisations confinées n'est plus correcte* » ;
- quand « *il y a lieu de supposer que l'évaluation n'est plus appropriée compte tenu des nouvelles connaissances scientifiques et techniques* ».

Le dernier cas reflète bien un des problèmes de l'utilisation, même confinée, de ce type de micro-organismes ; le fait que les progrès se font sans cesse et que les connaissances scientifiques à ce sujet s'étoffent. Cela prouve également l'intérêt que porte le législateur à ces connaissances, alors que pour le grand public, il pourrait sembler que les mesures législatives ne correspondent pas aux risques.

De plus, en cas d'hésitation pour le classement, il convient d'appliquer « *les mesures de protection les plus strictes* », « *à moins que des preuves suffisantes soient apportées, en accord avec l'autorité compétente, pour justifier l'application de mesures moins strictes* » (Article 5 , alinéa 2, [3, 9]).

2.3. La notification et les procédures relatives

Selon l'article 7 ([3, 9]), quand pour la première fois, une utilisation confinée de MGM doit être entreprise dans une installation, « *l'utilisateur est tenu d'adresser aux autorités compétentes, avant le début de ces utilisations, une notification* ». Cette notification est donc préalable à toute utilisation confinée de MGM.

2.3.1. Contenu du dossier de notification

Elle doit également contenir diverses informations listées dans la partie A de l'annexe V de la directive.

La notification doit comprendre, au moins, les informations suivantes :

- nom(s) du (ou des) utilisateur(s), y compris les responsables du contrôle et de la sécurité ;
- informations sur la formation et la qualification des personnes responsables du contrôle et de la sécurité ;
- détails sur les comités ou sous-comités de sécurité biologique (par exemple comité hygiène et sécurité du laboratoire) ;
- adresse et description générale du site ;
- description de la nature du travail mettant en jeu des MGM qui sera entrepris (projet) ;
- classe des utilisations confinées ;
- résumé de l'évaluation des risques réalisée.

La notification pourra être complétée par d'autres notifications comprenant d'autres éléments selon la classe de risque du MGM en question.

2.3.2. Cas de l'utilisation de MGM de classe 1 (Article 8, [3, 9])

Quand la notification dont il est fait mention précédemment (Article 7, [3, 9]) a été faite, « *une utilisation de classe 1 peut être entreprise sans autre notification* ». Les utilisateurs doivent « *constituer un dossier de chaque évaluation* ». De plus, ce dossier doit pouvoir être présenté à l'autorité compétente sur sa demande.

2.3.3. Cas de l'utilisation de MGM de classe 2 (Article 9, [3, 9])

Dans ce cas, en plus de la notification visée à l'article 7, une notification comprenant, au minimum les informations suivantes, doit être également présentée (listées dans la partie B de l'annexe V) :

- date de présentation de la notification visée à l'article 7 ;
- noms des personnes responsables du contrôle et de la sécurité, ainsi que des informations concernant leur formation et leur qualification ;

- le ou les micro-organismes récepteurs, donneurs et/ ou parentaux utilisés, éventuellement le ou les systèmes hôtes-vecteurs utilisés ;
- source(s) et fonction(s) voulue(s) des matériaux génétiques intervenant au cours des manipulations ;
- identification et caractéristiques du ou des MGM en cause ;
- objectif de l'utilisation, ainsi que les résultats escomptés ;
- approximation des volumes de culture à utiliser ;
- description des mesures de confinement et autres mesures de protection, sans oublier des informations concernant les déchets (gestion, traitement, destination finale) ;
- résumé de l'évaluation des risques ;
- informations nécessaires pour permettre à l'autorité compétente d'évaluer les plans d'urgence (ces plans sont requis par l'article 14).

Dans le cas où une précédente notification a déjà été faite pour la classe 2 ou une classe supérieure et que « *les exigences dont est assorti le consentement ont été remplies* », l'utilisation peut être entreprise immédiatement après la nouvelle notification. Mais le demandeur a la possibilité de demander à l'autorité compétente une autorisation formelle, la décision de cette autorisation devant être prise dans un délai maximum de 45 jours.

Dans le cas où il n'y a pas de précédente notification pour cette classe de risque, l'utilisation peut débuter 45 jours après la présentation de la notification sauf si l'autorité compétente donne un avis contraire. Il est également possible que l'autorité compétente donne un avis favorable avant le délai de 45 jours et ainsi l'utilisateur n'a pas à attendre 45 jours avant de débuter l'utilisation.

2.3.4. Cas de l'utilisation de MGM de classe 3 ou 4 (Article 10, [3, 9])

Dans le cas d'une première utilisation confinée de MGM de classe 3 ou 4 et pour les utilisations suivantes, en plus de la notification visée à l'article 7, une notification comprenant, au minimum, les informations suivantes doit être également présentée (informations listées dans la partie C de l'annexe V) : ces informations reprennent les informations nécessaires pour les MGM de classe 2 (partie B de l'annexe V), mais des informations supplémentaires ou des modifications s'y rajoutent :

- en ce qui concerne les volumes de culture : dans le cas des MGM de classe 2, les volumes « *approximatifs* » étaient demandés ; dans le cas des classes 3 et 4, il est demandé les « *volumes de culture à utiliser* » ;
- au lieu d'un résumé de l'évaluation des risques, une copie de cette évaluation doit être donnée ;
- en ce qui concerne la prévention des accidents et les plans d'urgences, en plus des informations nécessaires à l'évaluation par l'autorité compétente des plans d'urgence (Article 14 [3, 9]), des informations plus précises sont également demandées : risques spécifiques inhérents au site, liste des mesures préventives, des équipements de sécurité, des systèmes d'alarme et des méthodes de confinement, procédures et plans (pour permettre la vérification de l'efficacité permanente des mesures de confinement), description des informations fournies aux travailleurs.

L'utilisation confinée de MGM de ces classes ne peut se faire « *sans le consentement préalable et écrit de l'autorité compétente* ».

Les délais impartis pour que l'autorité compétente se prononce sont différents selon le cas dans lequel on se place :

- si les installations ont déjà fait l'objet d'une précédente notification pour des utilisations de MGM de classe 3 ou 4 et à condition que les exigences demandées pour une telle utilisation sont remplies, le délai imparti (pour que l'autorité compétente donne son consentement écrit) est d'au maximum 45 jours ;
- dans tous les autres cas, le délai est d'au maximum 90 jours.

Il apparaît donc que plus la classe de risque est élevée, plus les dossiers de notification à fournir à l'autorité compétente sont importants et précis.

2.3.5. Modifications des informations (Article 12, [3, 9])

L'utilisateur se doit d'informer, dans les plus brefs délais, les autorités compétentes si de nouveaux éléments d'information doivent être pris en compte. Si il décide de modifier l'utilisation des MGM, il doit également modifier la notification.

Par la suite, l'autorité compétente peut exiger la modification des conditions d'utilisation et, si elle le juge nécessaire, la suspension, voire l'arrêt de l'utilisation.

2.3.6. Confidentialité et information du public (Articles 13 et 19, [3, 9])

Il est important de noter que, les informations demandées étant précises et pouvant concerner des données confidentielles, différentes mesures (Article 19 [3, 9]) préservent la confidentialité. La sélection des informations confidentielles se fait par un accord entre l'autorité compétente et l'utilisateur. Cependant quelques informations ne peuvent en aucun cas demeurer confidentielles :

- les caractéristiques générales des MGM ;
- le nom et l'adresse du notifiant et le lieu de l'utilisation confinée ;
- la classe de l'utilisation et les mesures de confinement ;
- l'évaluation des effets prévisibles.

La législation laisse le choix aux Etats Membres de permettre ou non la consultation du public sur « *des aspects de l'utilisation confinée* ». Mais cette information du public doit se faire sans préjudice pour la confidentialité des informations.

2.4. Rôles de (ou des) autorité(s) compétente(s)

Les autorités compétentes sont désignées par les Etats Membres et jouent un rôle important dans la notification et l'agrément.

2.4.1. Désignation des autorités compétentes

Selon l'article 11, ce sont les Etats membres qui « *désignent la ou les autorités compétentes* ».

2.4.2. Rôles

Selon l'article 11, les autorités compétentes sont en charge de la mise en œuvre des mesures adoptées en application de la Directive 90/219/CEE [3] et de ses modifications et de la réception des notifications.

2.4.2.1. Examen et vérification des notifications

Les autorités compétentes se doivent d'examiner les notifications et de vérifier certains points :

- la concordance de la notification vis à vis des exigences législatives ;
- l'exactitude des informations fournies par l'utilisateur ;
- la réalisation correcte de l'évaluation des risques ;
- la détermination de la classe de risque ;
- la conformité des mesures de confinement et des autres mesures de protection, ainsi que de la gestion des déchets et des mesures d'intervention en cas d'urgence ou d'accident.

Afin d'effectuer correctement toutes ces vérifications, les autorités compétentes peuvent :

- demander à l'utilisateur de leur fournir des compléments d'information ou de modifier les conditions de l'utilisation ou la classe de risque ;
- limiter la période d'autorisation de l'utilisation ou subordonner l'utilisation au respect de certaines mesures.

Toutes ces périodes ne doivent pas être prises en compte dans le calcul des délais impartis aux autorités administratives pour donner leur accord.

Les autorités compétentes, après l'examen des notifications, sont en charge de donner l'accord ou non aux utilisations confinées de MGM.

2.4.2.2. Vérification des plans d'urgence (Article 14, [3, 9])

Avant le début de toute utilisation confinée, les autorités compétentes doivent s'assurer qu'un plan d'urgence a été établi et que les informations à ce sujet sont fournies aux organismes et autorités compétentes. Ces informations doivent de plus être périodiquement mises à jour et rendues publiques. Les Etats Membres doivent également tenir à disposition des autres Etats Membres ces mêmes informations.

2.4.2.3. Inspections (Article 17, [3, 9])

Les Etats Membres doivent s'assurer que l'autorité compétente qu'ils ont désignée mette en place et organise des inspections et des contrôles réguliers des utilisations confinées.

2.5. Mesures à suivre en cas d'accident (Article 15, [3, 9])

L'utilisateur doit informer immédiatement l'autorité compétente si un accident survient et lui fournir les informations suivantes : circonstances, identité et quantité de MGM libérés, toute information nécessaire à l'évaluation des effets, mesures prises suite à l'accident. Toutes ces informations doivent être communiquées le plus rapidement possible à la Commission.

Les Etats Membres ont également un rôle à jouer à ce niveau en se devant de s'assurer que toutes les mesures ont été prises et que les Etats Membres pouvant être affectés soient également tenus informés.

2.6. Consultations et échanges d'informations (Articles 18 et 21, [3, 9])

En fin d'année, les Etats Membres envoient à la Commission un « *rapport de synthèse sur les utilisations confinées des classes 3 et 4* ». Tous les trois ans, ils envoient également un « *rapport de synthèse sur l'expérience acquise* » en ce qui concerne toutes les utilisations visées par la Directive. Suite à ces rapports, la Commission publie une synthèse de ces rapports [29].

La Commission est assistée dans ces missions par un « *comité composé des représentants des Etats Membres et présidé par le représentant de la Commission* ».

En résumé, la Directive 90/219/CEE [3] et ses modifications mettent en avant différents principes fondamentaux. L'objectif premier de cette Directive est de limiter les effets négatifs pour la santé et l'environnement et de prévenir les accidents. Pour atteindre ce but, elle met en place différentes actions :

- l'évaluation des risques permettant le classement des MGM et ainsi la définition de certaines mesures à appliquer (confinement, prescriptions techniques) ;
- l'obligation de notification avant toute utilisation de MGM.

Ces principes se retrouveront dans la législation française, mais le champ d'application sera élargi à tous les organismes génétiquement modifiés.

III. Au niveau français : application de la législation européenne

L'utilisation des animaux transgéniques en recherche biomédicale et pharmaceutique n'est pas régie par une législation spécifique mais elle répond à deux législations : celle concernant les OGM et celle concernant l'expérimentation animale. Avant de s'intéresser à la législation spécifique aux OGM, nous nous intéresserons brièvement à l'état actuel de la législation française en matière d'expérimentation animale.

1. Etat actuel de la législation de l'expérimentation animale

Par souci d'harmonisation européenne, la législation française se doit de transposer la législation européenne et cela a été notamment le cas dans le domaine de l'expérimentation animale. Elle doit également concilier deux objectifs contradictoires : la réalisation d'expériences sur des animaux et la protection des animaux [40].

1.1. Bases législatives

La Directive européenne 86/609/CEE [2], basée sur un document émanant du Conseil de l'Europe (organisation internationale, à ne pas confondre avec l'Union Européenne), la Convention Européenne EST 123 [31], est le texte de base de la législation européenne en matière d'expérimentation animale.

L'expérimentation animale est définie, selon l'article de la Directive 86/609/CEE, comme « *toute utilisation d'un animal vertébré vivant à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques susceptibles de causer à cet animal des douleurs, des souffrances, de l'angoisse ou des dommages durables, y compris toute intervention visant à aboutir à la naissance d'un animal dans ces conditions ou susceptibles d'aboutir à une telle naissance, mais à l'exception des méthodes les moins douloureuses, acceptées par la pratique moderne pour le sacrifice ou le marquage des animaux* » [2].

Cette Directive a été transposée en droit français par le décret 87-848 du 19 octobre 1987 [12], modifié par le décret 2001-464 du 29 mai 2001 [29]. Suite au décret 87-848, 3 arrêtés ont été également publiés (arrêtés du 19 avril 1988 [13, 14, 15]). Ils concernent respectivement les conditions de fourniture en animaux, les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter et les conditions d'agrément des établissements (voir Figure 23).

A ces textes se rajoutent également des articles du Code Rural et du Code Pénal concernant respectivement le contrôle de l'expérimentation animale [31] et les sanctions en cas de non-respect des prescriptions [32].

STE 123 du Conseil de l'Europe

Directive 86/609/CEE du 24 Novembre 1986

Protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins

↓ *Transposition en droit national*

Décret 87-848 du 19 Octobre 1987

modifié par le Décret 2001-464 du 29 Mai 2001



- **Code Rural (Articles 283-1 et 283-2) :**
 - ⇒ Contrôle de l'expérimentation animale
- **Les 3 Arrêtés du 19 Avril 1988:**
 - ⇒ Conditions de fourniture en animaux
 - ⇒ Conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimentation
 - ⇒ Conditions d'agrément des établissements
- **Code Pénal (Articles 511-1 et 511-2):**
 - ⇒ Sanctions en cas de non-respect des prescriptions

Figure 23 : Schéma récapitulatif de la législation de l'expérimentation animale en France (d'après [46])

1.2. Applications de la législation pour la conduite des expérimentations animales

La pratique de l'expérimentation animale est donc très encadrée et nécessite le respect d'un certain nombre de prescriptions concernant les animaux, les expériences, les expérimentateurs et les établissements [40].

1.2.1. Les animaux

Les animaux utilisés doivent être identifiés et provenir de fournisseurs agréés selon les prescriptions précisées dans l'arrêté du 19 avril 1988 [13]. Il est important de noter que la réglementation ne concerne que les animaux vivants vertébrés.

Le but de la réglementation dans ce domaine est de rassurer l'opinion publique et de faire taire les rumeurs selon lesquelles les animaux d'expérimentation sont des animaux volés et pour cela promouvoir l'élevage des animaux d'expérimentation dans des établissements spécialisés et agréés.

La réglementation concerne également l'utilisation même des animaux en cours d'expérimentation, ceci est d'autant plus important lorsque les protocoles peuvent causer souffrance ou détresse.

1.2.2. Les expériences

Bien qu'il n'existe pas encore au niveau français une obligation légale en ce qui concerne les comités d'éthique et l'approbation des protocoles expérimentaux, un certain nombre de conditions doivent être remplies pour que ces expériences soient licites [12, 29] :

- l'expérience doit être pratiquée dans un domaine reconnu ;
- elle doit être nécessaire et adaptée au but poursuivi ;
- son remplacement par des méthodes alternatives (c'est-à-dire *in vitro*) ne doit pas être possible ;
- elle doit être menée par une personne autorisée (possédant l'autorisation d'expérimenter) ou sous sa responsabilité et cela dans un établissement agréé.

1.2.3. Les expérimentateurs [14]

Les chercheurs responsables (d'un point de vue pénal) des expérimentations doivent posséder une autorisation d'expérimenter nominative (articles 10, 11 et 12 du décret 87-848 [12] modifié par le décret 2001-464 [29]). Pour obtenir cette autorisation, un dossier de demande d'autorisation doit être adressé au préfet du département du lieu d'exercice du demandeur.

Ce dossier comprend différentes informations (justifications des choix de l'espèce et des protocoles, justification de non-condamnation pour infraction aux dispositions législatives et réglementaires concernant la protection des animaux). Cet agrément accordé tacitement au bout d'un délai de 2 mois (à moins d'une autorisation expresse ou d'un refus motivé avant la fin du délai) est valable pour 5 ans et est renouvelable sur demande écrite du titulaire. Cet agrément doit pouvoir être présenté aux agents de contrôle lors des visites.

1.2.4. Les établissements [15]

Les établissements où ont lieu des expériences sur les animaux doivent être agréés (articles 14 et 15 du décret 87-848 [12] modifié par le décret 2001-464 [29]). Cet agrément doit être demandé par le responsable de l'établissement au préfet du département d'implantation de l'établissement. Cet agrément est accordé par arrêté préfectoral pour une durée de 5 ans, son renouvellement se fait sur demande écrite.

L'agrément est subordonné au respect de deux conditions : conformité des locaux (aménagement et fonctionnement) à la réglementation en vigueur et personnel qualifié en nombre suffisant.

Le personnel exerçant dans de tels établissements doivent également avoir reçu une formation. Il existe 3 niveaux de formation en expérimentation animale :

- I : pour les personnes concevant des protocoles ;
- II : pour les personnes participant aux expérimentations ;
- III : pour les personnes chargées des soins aux animaux.

Les établissements d'expérimentation animale sont donc inspectés par la Direction des Services Vétérinaires (du département d'implantation) et cette inspection prend en compte deux aspects : l'environnement des animaux et leur bien-être. Des sanctions (administratives et/ou pénales) sont prévues en cas de non-conformité à la législation : suspension, modification ou retrait des différentes autorisations, contraventions.

1.3. Limites de cette législation

Cependant, il existe un aspect qui n'a pas été entièrement pris en compte dans la législation : l'éthique. Pourtant ce principe est présent dans le principe fondateur de la Convention Européenne ETS 123 : « *Pour son propre bien-être, l'homme peut et parfois doit utiliser l'animal, mais il a l'obligation morale de s'assurer, dans les limites raisonnables, que, dans chaque cas, la santé et le bien-être de l'animal ne sont pas inutilement menacés* » [31].

A ce principe, s'ajoute également la règle communément appelée « *Règle des 3 R* » énoncée par Russel et Burch [108]. Son nom provient du fait qu'elle repose sur trois termes anglais :

- **REPLACEMENT** c'est-à-dire remplacement de l'animal par des méthodes qualifiées d'alternatives ;
- **REDUCTION** c'est-à-dire diminution du nombre d'animaux utilisés, il est nécessaire de choisir le nombre optimal d'animaux devant être utilisés ;
- **REFINEMENT** c'est-à-dire amélioration des techniques afin de limiter le stress et la douleur chez l'animal.

Même si ces trois principes d'éthique étaient suivis dans de nombreux pays (Etats-Unis, Canada, Australie et quelques pays de l'Union Européenne), la France n'a mis en place que tardivement des comités d'éthique dans les établissements pratiquant l'expérimentation animale et cela sans être « obligé » par la loi. Ainsi des comités d'éthique, composés d'au minimum 3 personnes (dont un non-scientifique et avec si possible un vétérinaire), ont été créés dans des centres de recherche privés ou publics [128]. Il est donc nécessaire d'intégrer dans les protocoles une dimension éthique et cela ne pourra se faire que sous le contrôle de tels comités [14].

Ce sujet est d'autant plus important que l'utilisation des animaux transgéniques soulèvent des questions éthiques et que ces questions ne sont pas prises en compte dans la législation actuelle concernant les OGM.

2. Législation française spécifique aux OGM

Comme nous l'avons vu précédemment, l'Europe a mis en place une législation particulière concernant les micro-organismes génétiquement modifiés et leur utilisation à des fins de recherche. La France, en tant qu'Etat Membre, se devait de transposer les deux Directives européennes, 90/219/CEE [3] et 90/220/CEE [4], en droit français, ce qui a été fait en 1992 avec la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17] et les décrets et arrêtés correspondants.

Dans le cas de notre étude, nous étudierons la réglementation à suivre lors de l'utilisation d'OGM à des fins de recherche (ce qui correspond plus exactement à la transposition en droit français de la Directive 90/219/CEE [3]). Etant donné le nombre de textes à suivre et la complexité de cette législation, le Ministère chargé de la Recherche a publié une circulaire explicitant les différents textes devant être suivis [24]. Le point le plus important de cette réglementation est la demande d'agrément préalable à toute utilisation d'OGM à des fins de recherche.

Nous donnerons, dans un premier temps, le champ d'application de cette législation, puis les obligations liées à l'utilisation des OGM dans le cadre de la recherche et finalement les contrôles et les sanctions en cas de non respect de ces obligations.

2.1. Les OGM : définition, classement et acteurs de la législation

2.1.1. Définitions ([17], [21], [22])

La Directive 90/219/CEE [3] ne concernait que les micro-organismes génétiquement modifiés mais lors de sa transposition en droit français le champ d'application a été étendu aux organismes génétiquement modifiés, la législation française prend donc en compte les micro-organismes génétiquement modifiés mais aussi les plantes et les animaux, c'est-à-dire l'ensemble des règnes vivants.

Dans l'article 1^{er} de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17], les termes « *organismes* » et « *organismes génétiquement modifiés* » sont définis :

« a) Organisme : toute entité biologique non cellulaire, cellulaire, ou multicellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique ; cette définition englobe les micro-organismes, y compris les virus. » [17]

« b) Organisme génétiquement modifié : organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par multiplication ou recombinaison naturelles » [17].

Il faut donc se souvenir que, dans la législation française, sous le terme d'organismes génétiquement modifiés, les micro-organismes sont également inclus.

2.1.1.1. Techniques d'obtention d'OGM au sens de la loi

Dans un souci de clarté, le décret 93-774 [21], dans son article 1^{er}, complète cette définition d'OGM, en énumérant trois types de techniques permettant l'obtention d'OGM, au sens de la loi :

- « 1. Les techniques de recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN), visées par la Recommandation 82/472/CEE, qui utilisent des systèmes vectoriels ; » [21]

La Recommandation 82/472/CEE [1] concernant l'enregistrement des travaux relatifs à l'ADN recombinant donne une définition du terme de « travaux impliquant l'ADN recombinant » et vise ainsi différentes techniques de recombinaison de l'ADN.

Par le terme de « travaux impliquant l'ADN recombinant », le législateur entend : « formation de nouvelles combinaisons de matériaux génétiques par l'insertion de molécules d'acide nucléique, produit de n'importe quelle façon extérieurement à la cellule, à l'intérieur de tout virus, plasmide bactérien ou autre système vectoriel, de manière à permettre leur incorporation dans un organisme hôte à l'intérieur duquel elles ne surviennent pas de façon naturelle, mais où elles peuvent se multiplier de façon continue » [1].

Par « systèmes vectoriels », il est entendu, par exemple, les plasmides, cosmides, phages, virus ou encore les YAC (Yeast Artificial Chromosome), c'est-à-dire des systèmes biologiques permettant de transférer des séquences génétiques.

- « 2. Les techniques impliquant l'incorporation directe dans un micro-organisme ou dans un organisme de matériaux héréditaires préparés à l'extérieur du micro-organisme, ou de l'organisme, y compris la micro-injection, la macro-injection et la micro-encapsulation ; » [17].

Comme « techniques d'incorporation », on trouve, par exemple, l'électroporation, la micro-injection ou encore le canon à particules.

- « 3. Les techniques de fusion cellulaire (y compris la fusion de protoplastes) ou d'hybridation dans lesquelles des cellules vivantes présentant de nouvelles combinaisons de matériaux génétiques héréditaires sont constituées par la fusion de deux cellules ou davantage, au moyen de méthodes ne survenant pas de façon naturelle. » [17].

Cependant, d'après le guide de la Commission de Génie Génétique, l'utilisation d'une molécule nue d'acide nucléique génétiquement modifiée pouvant avoir un effet fonctionnel direct ou indirect est assimilée par la Commission de Génie Génétique à l'utilisation d'un OGM. Cela s'explique par le fait que cette molécule peut pénétrer dans des cellules et ainsi présenter un danger potentiel nécessitant alors une évaluation de risque et donc entraîner la mise en place de mesures de confinement. Cette remarque est donc importante à prendre en compte car, au sens strict de la loi, les molécules nues d'acide nucléique génétiquement modifiées ne font pas partie des OGM. Ceci, de plus, renforce, l'idée qu'il est nécessaire de consulter la Commission de Génie Génétique lors de la mise en œuvre de toute manipulation de génie génétique [28].

2.1.1.2. Techniques exclues du champ d'application de la loi.

Cependant, tous les OGM ne sont pas concernés par cette loi. Tout d'abord, les organismes génétiquement modifiés par multiplication ou recombinaison naturelles ne sont pas concernés (paragraphe b, article 1 [17]).

Puis, comme il est écrit, dans l'article 2 de la loi, les OGM « *obtenus par des techniques qui ne sont pas considérées, de par leur caractère naturel, comme entraînant une modification génétique ou par celles qui font l'objet d'une utilisation traditionnelle sans inconvénient avéré pour la santé publique ou l'environnement* » ne sont pas soumis à cette réglementation.

Cet article est complété, suite à l'avis de la Commission de Génie Génétique, par le décret 93-774 [21], modifié par le décret 94-527 [22]. Les organismes obtenus par les techniques suivantes sont donc exclus :

- « *A condition qu'elles ne fassent pas appel aux techniques de recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou à des organismes génétiquement modifiés :*
 - *La fécondation in vitro ;*
 - *La conjugaison, la transduction, l'infection virale, la transformation ou tout autre processus naturel ;*
 - *L'induction polyploïde. » (Article 2-I [21])*
- « *A condition qu'elles ne comportent pas l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés en tant qu'organismes récepteurs ou parentaux :*
 - *La mutagenèse ;*
 - *La formation et l'utilisation d'hybridomes animaux somatiques ;*
 - *La fusion cellulaire, y compris la fusion de protoplastes, de cellules provenant de végétaux pouvant être produits par des méthodes de culture ou de multiplication traditionnelles ;*
 - *L'autoclone de micro-organismes non pathogènes survenant de façon naturelle et répondant aux critères du groupe I (de la classification des OGM) pour les micro-organismes récepteurs ;*
 - *L'infection de cellules vivantes par les virus, viroïdes ou prions." (Article 2-II [21])*

Une souris transgénique « knock-out » pour un gène donné ou une bactérie contenant un plasmide recombinant, par exemple, sont considérés comme des OGM, alors que une cellule infectée par un virus non OGM ou une protéine, même recombinante, purifiée à partir de cellules d'un OGM ne sont pas considérées par la loi en tant qu'OGM.

Dans le cas de l'utilisation d'animaux transgéniques à des fins de recherche, nous sommes donc en présence d'OGM, d'où la nécessité de suivre cette réglementation. Cependant cette législation est allégée (c'est-à-dire pas d'agrément nécessaire) dans le cas d'utilisation d'OGM avec autorisation de mise sur le marché [22], ce qui est notamment le cas avec certains types de souris transgéniques utilisées pour des tests pharmacologiques.

2.1.2. Classement des OGM

Une fois les OGM définis, la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17] prévoit à l'article 4 du titre II leur classement « *en groupes distincts en fonction des risques qu'ils présentent pour la santé publique et l'environnement, et notamment de leur pathogénicité* ». Ce classement se fait selon des critères précis fixés, après avis de la Commission de Génie Génétique, par le décret 93-774 [21], modifié par le décret 94-527 [22].

Ce classement reprend les principes de classement de la Directive 90/219/CEE [3] : il y a deux groupes (I et II) avec adaptation de cette classification aux OGM avec apparition de 4 classes de risque (1, 2, 3 et 4) qui correspondent aux classes de risques définies par la norme AFNOR NFX 42-070 datée du 5 mars 1989 [3].

Avant toute chose, il est nécessaire de définir ce que la loi entend par le terme de risque : le risque peut être défini comme la probabilité qu'un effet spécifique (ou danger c'est-à-dire, pour un OGM, la possibilité de provoquer des dommages pour la santé humaine ou animale ou pour l'environnement) se réalise dans des conditions expérimentales données [28].

Il ne faut pas oublier que le classement en groupe se fait en prenant en compte chacun des éléments qui composent l'OGM, ainsi que l'OGM en lui-même. Un OGM est la combinaison de 3 éléments, dont il faudra évaluer pour chacun les dangers, et le danger présenté par l'élément le plus dangereux sera prédominant :

- Organisme parental ;
- Organisme récepteur ;
- Couple vecteur-insert.

Cependant, en raison de la complexité des techniques mettant en jeu des OGM, l'évaluation de ces risques doit être faite au cas par cas avec l'intervention de la Commission de Génie Génétique.

2.1.2.1. OGM du groupe I (article 3-I [21] et article 1 [22])

Les OGM appartenant au groupe I sont « *des systèmes expérimentaux mettant en oeuvre des organismes non pathogènes de classe 1 de risque pour lesquels la nature du vecteur ou de la séquence donnée ne justifie pas une modification de classe de risque* ». Afin de faciliter la compréhension de cette définition, des critères sont précisés, ils concernent les quatre éléments à prendre en compte pour l'évaluation.

Ainsi pour être classé dans le groupe I, un OGM doit répondre aux exigences suivantes :

- organismes parental et receveur non susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme, l'animal, la plante ou d'entraîner des effets néfastes pour l'environnement ;
- couple vecteur-insert incapable de doter l'organisme receveur d'un caractère susceptible de provoquer une maladie chez l'homme, l'animal ou la plante ou d'entraîner des effets néfastes pour l'environnement ;
- OGM en lui-même non susceptible de provoquer une maladie chez l'homme, l'animal, la plante ou d'entraîner des effets néfastes à l'environnement.

Il s'agit donc de systèmes expérimentaux non pathogènes dont l'innocuité est avérée par expérience et cela à condition que la nature du vecteur ou de la séquence insérée n'amène pas par elle-même un risque.

Ainsi, une souris transgénique est considérée comme appartenant au groupe I, sauf en cas d'utilisation comme vecteur d'un rétrovirus pathogène ou si le transgène inséré amène un nouveau risque.

2.1.2.2. OGM de groupe II (article 3-II [21] et art 1 [22])

Les OGM du groupe II sont « *des systèmes expérimentaux mettant en œuvre des organismes génétiquement modifiés autres que ceux* » du groupe I et ce groupe « *comprend notamment les micro-organismes de classes de risque 2, 3, et 4* ».

Ainsi, un OGM est considéré comme appartenant au groupe II si il ne peut répondre strictement à la définition du groupe I.

Mais que l'OGM soit classé dans le groupe I ou II, les vecteurs ou les inserts doivent être bien caractérisés. Les inserts doivent être également limités le plus possible aux séquences nécessaires. Ils ne doivent pas non plus conférer à l'organisme hôte un avantage sélectif ou transférer des marqueurs de résistance.

Même si de nombreux critères sont donnés pour faciliter ce classement, ce classement des OGM n'est pas aisé, et c'est à ce niveau qu'intervient notamment la Commission de Génie Génétique qui expertise et classe chaque cas d'utilisation, notamment dans le cas d'utilisations à des fins d'enseignement, de recherche ou de développement, quand les critères mentionnés ci-dessus ne sont pas applicables. Dans ce cas, la Commission de Génie Génétique propose un classement selon des critères autant que possible équivalents (Article 4 [21]).

2.1.3. Les acteurs

Différents acteurs font partie du processus d'obtention de l'agrément qui est le point fondamental de la législation qui nous intéresse. Il y a d'un côté l'exploitant qui fait la demande et de l'autre, les autorités administratives constituées par les différents Ministères et la Commission de Génie Génétique.

2.1.3.1. L'exploitant

Par le terme d'« *exploitant* », il est entendu « *la personne juridique, physique ou morale, responsable des locaux et plus exactement du ou des laboratoires dans lesquels il sera procédé à une ou plusieurs utilisations d'OGM* » [24].

Cette définition est plus amplement développée dans le paragraphe 2.2.1.3.

2.1.3.2. Les différents Ministères

Différents ministères interviennent dans le cadre de l'utilisation d'OGM. Dans la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17], il est fait mention dans le déroulement des différentes dispositions de l'intervention d'une « *autorité administrative* », c'est notamment elle qui délivre l'agrément. Elle doit également être informée de tout changement de l'agrément (conditions, exploitant, etc...) ou de tout accident.

Dans le cas de l'utilisation d'OGM à des fins de recherche, de développement et d'enseignement, l'autorité administrative désignée est le Ministre chargé de la Recherche.

Cependant d'autres ministres peuvent intervenir :

- le Ministre chargé de l'Environnement peut empêcher la délivrance d'un agrément, même si la Commission de Génie Génétique et le Ministre chargé de la Recherche y sont favorables (il est à noter que le Ministre chargé de l'Environnement fait office d'autorité administrative dans le cas de la dissémination volontaire d'OGM) ;
- les Ministres chargés de la Santé et de l'Environnement doivent être informés de tout accident survenant au cours d'une utilisation confinée d'OGM.

2.1.3.3. La Commission de Génie Génétique

La Commission de Génie Génétique a été créée suite au décret 89-306 du 11 mai 1989 [16] modifié par le décret 93-75 du 18 janvier 1993 [19]. Comme il est précisé dans l'article 1^{er} de ce décret, cette commission peut être consultée par les autorités administratives chargées de délivrer l'agrément.

2.1.3.3.1. Missions

Les missions de la Commission de Génie Génétique sont précisées dans l'article 3-1 de la loi n° 92-654 du 13 juillet 1992.

La Commission de Génie Génétique est chargée « *d'évaluer les risques que présentent les organismes génétiquement modifiés et les procédés utilisés pour leur obtention ainsi que les dangers potentiels liés à l'utilisation des techniques de génie génétique* » [17]. Elle est donc à la source de l'évaluation des risques présentés par la mise en œuvre du génie génétique et celle des OGM construits quelle que soit leur utilisation ultérieure, soit utilisation confinée, soit dissémination volontaire.

Dans le cadre de l'utilisation confinée, elle « *propose des mesures de confinement souhaitables pour prévenir les risques liés à l'utilisation de ces organismes, procédés et techniques* » [17].

En tant qu'organe de conseil dans le processus d'agrément, elle « *peut déléguer un ou plusieurs de ses membres pour visiter les installations dans le cadre de l'instruction des demandes d'agrément* » [17].

2.1.3.3.2. Composition

Selon l'article 3 de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992, la Commission de Génie Génétique est composé de 19 « *personnalités désignées en raison de leur compétence scientifique dans des domaines se rapportant au génie génétique et à la protection de la santé publique et de l'environnement* » [17]. A ces 19 scientifiques, s'ajoute « *un membre de l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques* » [17].

La composition est précisée dans le décret 89-306 [16] modifié par le décret 93-75 [19], les membres sont nommés, par arrêté du Ministre chargé de la Recherche pour un mandat de trois ans renouvelable. Les 19 membres sont nommés sur proposition de différents ministres :

- par le Ministre chargé de la Recherche ;
- par celui chargé de l'Environnement ;
- par celui chargé de la Santé ;
- respectivement par ceux chargés de l'Agriculture, de la Consommation, de la Défense, de l'Enseignement supérieur, de l'Industrie, de l'Intérieur et du Travail.

De plus, 6 des membres de la Commission de Génie Génétique doivent être choisis parmi des scientifiques compétents dans le domaine de la protection de la santé publique et de l'environnement (Article 7 [17]). Le Président est nommé par arrêté sur proposition des membres de la Commission.

Actuellement, les membres de la Commission de Génie Génétique ont été nommés par l'arrêté du 17 avril 2000 [27] et le Président par l'arrêté du 3 juillet 2000 [28] (voir Annexe 2)

Pour son fonctionnement, la commission dispose d'un double secrétariat assuré par le Ministère chargé de la Recherche, pour ce qui concerne l'utilisation confinée d'OGM à des fins d'enseignement, de recherche ou de développement et par le Ministère chargé de l'Environnement pour ce qui concerne les utilisations confinées d'OGM à des fins de production industrielle. Dans le cas de notre étude, c'est le Ministère chargé de la Recherche qui assure le secrétariat. De plus, la commission peut également faire appel à des experts externes.

Que ce soit le secrétariat, les experts externes ou les membres de la commission, tous doivent respecter le secret professionnel et la confidentialité des données (Article 5 [19]).

2.1.3.3.3. Avis et recommandations

La Commission émet également des recommandations de portée générale, dont certaines peuvent être rendues publiques, comme, par exemple, le guide paru en avril 2000 [28].

Elle émet également des avis portant sur les utilisations d'OGM, notamment dans le cadre des procédures établies en application de la loi n° 92-654 du 13 juillet 1992 [17]. Ces avis servent notamment au niveau de la Commission Européenne pour le rapport de synthèse sur l'utilisation des OGM qui doit être rédigé régulièrement.

En outre, la Commission de Génie Génétique peut être consultée par toute personne publique ou privée sur toute question se rapportant au génie génétique.

2.2. L'utilisation d'OGM à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement : définitions et obligations

La réglementation concernant les OGM ne s'intéresse pas directement aux OGM, mais plutôt à l'utilisation qui en est faite et comme il est dit à l'article 6 de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 : « *toute utilisation (...) est soumise à agrément* » [17]. Dans le cadre de la recherche médicale, nous nous plaçons dans le cas d'une utilisation confinée. Pour ce qui concerne la dissémination volontaire, une autre législation s'applique (mais il existe des points communs entre ces deux législations).

2.2.1. Définitions

Différentes définitions doivent être données afin de mieux comprendre les principes de la législation.

2.2.1.1. Utilisation (Article 1 [17])

Par le terme de « *utilisation* », le législateur entend : « *toute opération ou ensemble d'opérations au cours desquelles des organismes sont génétiquement modifiés ou au cours desquelles des organismes génétiquement modifiés sont cultivés, mis en œuvre, stockés, détruits ou éliminés* » [17].

De nombreuses étapes de l'utilisation des OGM sont prises en compte : non seulement la construction de l'OGM, mais également son utilisation dans des expériences (mise en œuvre, culture, stockage, élimination, destruction).

Ainsi, l'utilisation de souris transgéniques pour des tests pharmacologiques, par exemple, nécessite un agrément sauf dans le cas où ces souris ont fait l'objet d'une autorisation de mise sur le marché [25], ce qui est encore très rare.

Cette utilisation doit être réalisée « *de manière confinée* » (article 5 [17]), c'est une obligation générale devant être concrétisée par la mise en œuvre de moyens techniques adaptés.

2.2.1.2. Installation

L'installation et l'utilisation sont liées juridiquement via l'agrément (Articles 4 et 5 [20]).

Une installation correspond à un ou plusieurs laboratoires d'un point de vue matériel, c'est-à-dire un ou plusieurs locaux aménagés de façon à y conduire des expérimentations. Ces locaux peuvent se situer dans un ou plusieurs bâtiments mais ces bâtiments doivent être implantés sur le même site géographique.

Ainsi, il est prévu dans le dossier d'agrément une description détaillée des locaux : plan de masse, mais aussi tableau récapitulatif prouvant la conformité de chacun des locaux aux prescriptions techniques. De plus, en cas de modification des locaux, il convient d'en informer le Ministre chargé de la Recherche.

2.2.1.3. Exploitant

Par « *exploitant* », il est entendu la personne juridique, physique ou morale (publique ou privée), responsable des locaux (plus précisément du ou des laboratoires dans lesquels des OGM seront utilisés au sens de la loi). Il est le seul habilité à établir la demande d'agrément (Article 2 [20]) ou faire la demande d'une modification des prescriptions techniques ou des conditions d'utilisation (Article 9 [20]).

Outre l'exploitant, d'autres personnes interviennent (voir Figure 24). La distinction doit être faite entre l'exploitant des locaux et les personnes en charge des travaux de recherche qui peuvent changer plus souvent.

Le terme de « *directeur des travaux* » désigne le responsable scientifique de l'utilisation, chargé de l'encadrement du personnel scientifique. Il peut y avoir succession dans le temps des directeurs de travaux, mais, à un instant donné, un seul est nommément identifié pour les utilisations en cours [24].

Le directeur des travaux de recherche peut désigner un ou plusieurs responsables locaux en charge du suivi d'un ou plusieurs projets menés dans le cadre de l'agrément : ce sont les responsables scientifiques du projet [24].

En outre, en cas de changement de l'exploitant ou du directeur des travaux, le Ministre chargé de la Recherche doit en être informé (Article 8 [20]) et cela dans le mois suivant la date de changement. Mais ce changement n'entraîne, sauf cas particulier, ni obligation d'une nouvelle demande d'agrément, ni retrait ou suspension de l'agrément en cours.

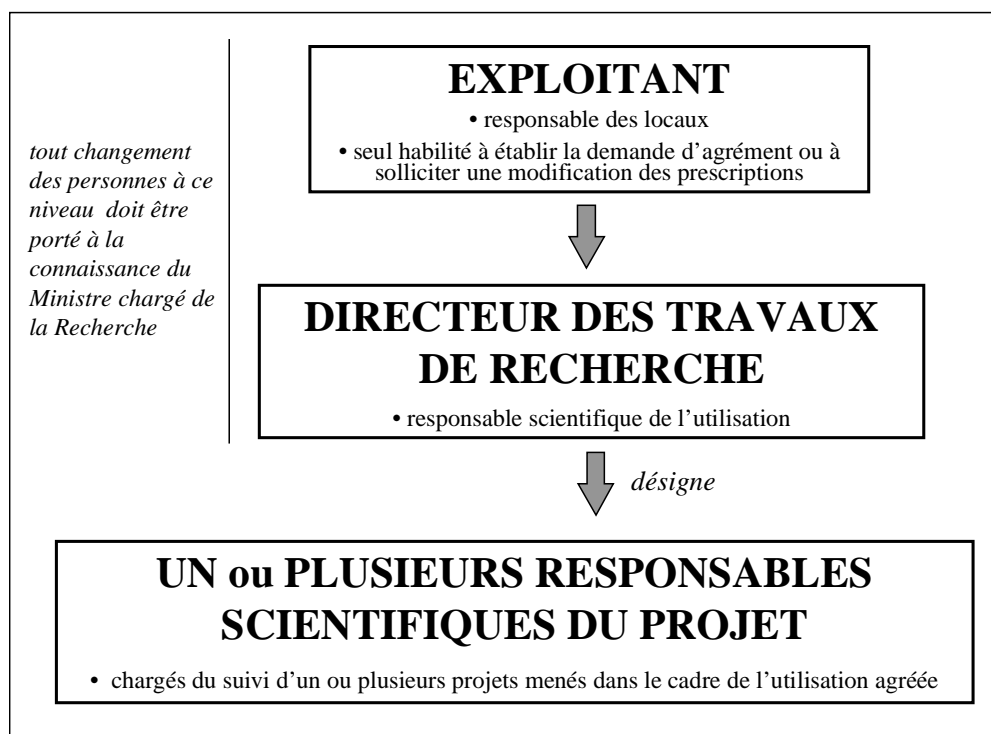


Figure 24 : Les personnes impliquées dans l'agrément au niveau d'une installation

2.2.2. Obligations de l'exploitant et de l'utilisateur

L'utilisation des OGM à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement entraîne pour l'exploitant et l'utilisateur le respect d'un certain nombre d'obligations :

- Obligation de déclaration préalable à toute utilisation : l'agrément ;
- Obligation de confinement avec respect de prescriptions techniques spécifiques à chaque classe de risque ;
- Obligation d'information ;
- Obligation de consultation de la Commission de Génie Génétique.

Nous étudierons chacune de ses obligations ainsi que les démarches qui en découlent.

2.2.2.1. Obligation de déclaration : l'agrément

Cette obligation pour les utilisations à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement est mentionnée dans l'article 6-I de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 : « *toute utilisation (...) est soumise à agrément* » [17].

Cet agrément est « *délivré à l'exploitant de l'installation par l'autorité administrative* », c'est-à-dire dans le cas qui nous intéressent le Ministère chargé de la Recherche et est « *subordonné au respect de prescriptions techniques* ». Par « *prescriptions techniques* », le législateur entend les mesures de confinement qui sont fonction du classement de l'OGM et les moyens d'intervention en cas de sinistre.

L'agrément est « *une décision administrative individuelle prise par le Ministre chargé de la Recherche, portant autorisation de mise en œuvre de l'utilisation projetée dans une installation déterminée* » [24]. Ainsi l'agrément concerne à la fois l'utilisation qui sera faite des OGM mais aussi les conditions de cette utilisation. Il n'est pas accordé de plein droit mais est subordonné au respect de prescriptions et de mesures techniques (Article 6-I [17]).

Le décret 93-773 du 2 mars 1993 [20] explicite la procédure d'obtention de cet agrément, ainsi que les modalités et les délais nécessaires à cette opération et l'arrêté du 27 décembre 1994 [23] fixe le contenu du dossier de demande d'agrément. Il existe des documents type Cerfa disponibles auprès du Ministère chargé de la Recherche.

Pour la demande d'agrément, il y a distinction entre les deux groupes (I et II) définis dans le classement des OGM. Une même utilisation peut comporter la mise en œuvre d'OGM de classes, voire de groupes différents. Cependant si des OGM de groupes différents sont utilisés, deux demandes d'agrément doivent être demandées, une pour chaque groupe.

Le dossier de demande d'agrément comporte un dossier technique, sa composition est fonction du groupe de l'OGM mis en œuvre et le contenu est fixé par l'arrêté du 27 décembre 1994 [23]. De plus, si l'utilisation se fait à des fins de thérapie génique, des renseignements supplémentaires doivent être donnés conformément à l'annexe II de ce même arrêté.

Selon l'article 7 de l'arrêté du 27 décembre 1994 [23], la demande d'agrément doit être remise en 20 exemplaires, cependant il est noté sur les notes explicatives concernant l'agrément et émanant du Ministère chargé de la Recherche qu'il doit être transmis en 6 exemplaires dont un original au Secrétariat de la Commission de Génie Génétique, c'est-à-dire, dans le cas de l'utilisation à des fins de recherche, au Ministère chargé de la Recherche [112].

Deux cas sont possibles au niveau de l'instruction des demandes : la première demande et les demandes ultérieures (renouvellement d'agrément).

L'agrément doit être renouvelé dans différents cas :

- à l'expiration du délai fixé par l'agrément ;
- en cas de modification notable des conditions de l'utilisation ou d'aggravation des risques ;
- quand l'utilisation agréée n'a pas été entreprise dans un délai de trois ans ;
- quand l'installation connaît des modifications de structure.

Tous les détails concernant ces dossiers techniques et leur instructions (procédure d'agrément) seront explicités dans la partie III.

La procédure d'agrément répond à un circuit bien précis qui sera explicité plus longuement dans la partie III, mais qui peut être schématisé (voir Figure 25).

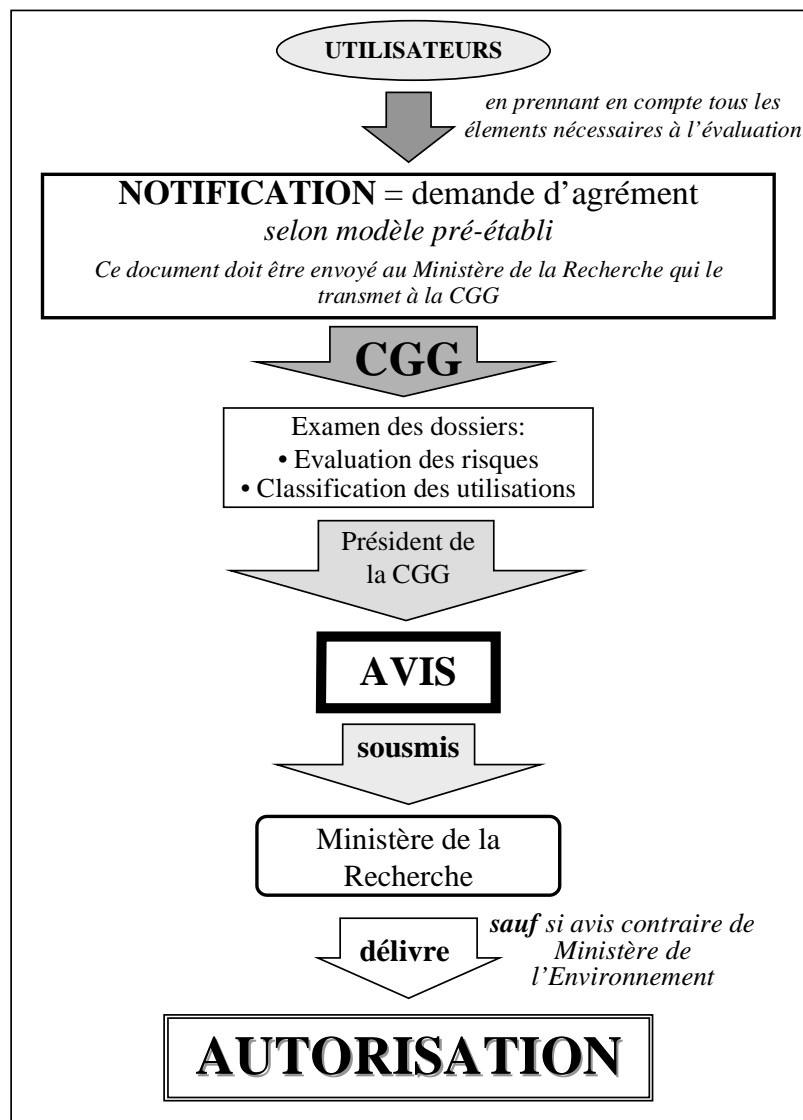


Figure 25 : Déroulement de la demande d'agrément

Selon l'article 6-VI de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992, « *toute demande d'agrément (...) est assortie d'une taxe représentative des frais d'instruction et perçue au profit du budget général de l'Etat* » [17]. Cette somme doit être versée lors du dépôt du dossier. Jusqu'à la fin de l'année 1992, cette somme était de 3 000 FF que ce soit une première demande ou un renouvellement. A partir du 1^{er} janvier 1993, d'après la loi de finance rectificative 92-1476, cette somme est de 10 000 FF par dossier, mais cette somme est réduite à 2 000 FF « *lorsque la demande d'agrément concerne une utilisation confinée autre que la première* » [18], c'est-à-dire pour les renouvellements d'agrément ou les extensions.

2.2.2.2. Obligation de confinement et de respect des prescriptions

L'article 5 de la loi n° 92-654 du 13 juillet 1992 énonce une des obligations de l'utilisation des OGM à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement : « *toute utilisation (...) est réalisée de manière confinée* » [17].

2.2.2.2.1. Le confinement

Le confinement est une obligation générale se concrétisant par la mise en place de moyens techniques adéquats. Il est obtenu en mettant en œuvre « *des barrières physiques, chimiques ou biologiques* » (Article 5 [17]). Celles-ci sont « *définies en fonction du classement des OGM, après avis le cas échéant de la Commission de Génie Génétique* » [17].

Les modalités de confinement dépendent donc du classement de l'OGM en question et les détails pratiques du confinement sont édités dans un document émanant de la Commission de Génie Génétique, « *Principes de classement et guides officiels de la Commission de Génie Génétique* ». Les 4 classes de risques vues précédemment correspondent à 4 niveaux de confinement que nous détaillerons dans la partie III. Ces prescriptions sont éventuellement complétées par différentes normes de l'Afnor ou Association Française de Normalisation (Normes NF X 42.070, NF X 42.080 et NF X 42.075) [28].

2.2.2.2.2. Le suivi des utilisations

En plus de ces mesures de confinement, l'exploitant doit mettre en place des mesures de suivi des utilisations, ce suivi étant différent selon le groupe des OGM en jeu [24].

Dans le cas d'OGM de groupe I, l'exploitant doit tenir à jour un ou plusieurs registres (pour le faire, il peut désigner une ou plusieurs personnes qui seront sous la responsabilité du directeur des travaux de recherche). Ce registre, relié et paraphé, doit être tenu de façon chronologique, sans blanc, ni rature, ni surcharge. Il doit être également mis à la disposition des agents de contrôles [24].

Dans le cas des OGM de groupe II, le dossier de demande d'agrément doit être complété par l'exploitant dans les deux cas suivants :

- quand un nouveau projet est envisagé dans l'installation agréée, à condition que ce projet soit cohérent avec les projets déjà en cours et agréés ;
- quand l'utilisation d'un nouveau groupe d'OGM (de même niveau de risque, nécessitant donc les mêmes mesures de confinement) dans un projet correspondant à une utilisation déjà agréée est mise en œuvre. Il est nécessaire que les hôtes les vecteurs et les inserts soient bien caractérisés.

Tout complément au dossier doit être adressé au Ministre chargé de la Recherche qui pourra demander l'avis de la Commission de Génie Génétique afin de déterminer si le dépôt d'une nouvelle demande d'agrément est nécessaire.

2.2.2.3. Obligation d'information

Il existe plusieurs types d'obligation d'information :

- au public lors de la première demande d'agrément pour utilisation d'OGM de classes de risque 3 ou 4 ;
- au Ministère chargé de la Recherche (et éventuellement autres autorités administratives) dans 3 cas :
 - lors d'un changement d'exploitant ou de directeur des travaux de recherche ;
 - lors de l'apparition de nouveaux éléments susceptibles de modifier l'évaluation des dangers ou des inconvénients ;
 - lors de tout accident survenu lors de l'utilisation et pouvant porter atteinte à la santé ou à l'environnement.

2.2.2.3.1. Procédure d'information du public

Il est précisé à l'alinéa II de l'article 6 de la loi n° 92-654 du 13 juillet 1992 que « lorsque l'agrément porte sur la première utilisation dans une installation d'OGM, l'exploitant met à disposition du public un dossier d'information » [17]. Cependant ce dossier n'est nécessaire que lors d'une première utilisation d'OGM du groupe II de classes 3 et 4 (Article 7-I [20]).

Ce dossier doit contenir diverses informations :

- des informations générales concernant l'activité de l'installation et le but des recherches pour lesquelles les OGM seront utilisés ;
- toutes les informations concernant le classement des OGM, les mesures de confinement, les moyens d'intervention et les prescriptions techniques ;
- le résumé de l'avis de la Commission de Génie Génétique ;
- l'adresse de la Commission de Génie Génétique, permettant au public de donner son avis (une synthèse des informations recueillies et de leurs suites trouveront leur place dans le rapport annuel de la Commission de Génie Génétique).

Cependant, les informations couvertes « *par le secret commercial et industriel ou protégées par la loi, ou dont la divulgation pourrait porter préjudice aux intérêts de l'exploitant (...) ou des personnes qui mettent en œuvre l'utilisation* » peuvent ne pas être mentionnées dans ce dossier (Article 7-I [20]).

Ce dossier est soumis préalablement au visa du Ministre chargé de la Recherche « *dans un délai de 15 jours à compter de la notification de l'agrément* » (Article 7-I [20]). Pendant ce délai, le ministre peut demander à l'exploitant des compléments d'informations qu'il juge nécessaires.

Au plus tard 15 jours après la réception du visa du ministre, l'exploitant doit déposer ce dossier à la mairie de la commune d'implantation de l'installation afin de le mettre à disposition du public (un accusé de réception lui est alors remis). Puis dans les huit jours suivant la réception du dossier à la mairie, « *un avis au public annonçant le dépôt du dossier en mairie est affiché en mairie aux frais de l'exploitant du laboratoire et par les soins du maire* » (Article 7-II [20]).

Si un exploitant de laboratoire ne dépose pas ce dossier d'information, il encourt une peine d'amende (Article 18, alinéa I [20]).

2.2.2.3.2. Vis-à-vis du Ministre chargé de la Recherche et d'autres autorités administratives

Différents cas sont à prendre en compte.

- **Changement d'exploitant ou de directeur de travaux de recherche**

Selon l'article 8 du décret 93-773 [20], le Ministre chargé de la Recherche doit être informé de tout changement de l'exploitant ou du directeur des travaux de recherche que ce soit au cours de l'instruction de l'agrément ou après la délivrance de l'agrément. Cette information doit être donnée dans le mois qui suit le changement.

Cependant, ce type de changement, sauf cas particulier, ne modifie pas les conditions de l'utilisation (pas de nouvel agrément à demander, ni de retrait ou suspension de l'agrément en cours) [17].

- **Apparition de nouveaux éléments susceptibles de modifier l'évaluation des dangers et des inconvénients**

Selon l'article 10 du décret 93-773 [20], une fois l'agrément délivré, l'utilisateur doit informer le Ministre chargé de la Recherche de tout nouveau élément d'information pouvant modifier l'évaluation des dangers ou des inconvénients pour la santé publique ou l'environnement.

Après en avoir pris connaissance, le Ministre chargé de la Recherche peut modifier les prescriptions techniques, suspendre l'agrément (le temps de mettre en place de nouvelles mesures) ou retirer l'agrément (si aucune mesure ne peut faire disparaître les nouveaux risques ou inconvénients). Toutes ces mesures sont faites aux frais de l'exploitant du laboratoire (Article 11 [20]).

- **Lors de tout accident survenu lors de l'utilisation et pouvant porter atteinte à la santé ou à l'environnement**

Selon l'article 12 du décret 93-773, « *tout accident survenu au cours de l'utilisation et de nature à porter atteinte à la santé publique ou à l'environnement* » [20] doit être porté à la connaissance de différentes autorités : les Ministres chargés de la Recherche, de la Santé et de l'Environnement et le Préfet du département.

Les informations suivantes doivent leur être fournies :

- circonstances de l'accident ;
- désignation des OGM libérés ainsi que les quantités libérées ;
- toute information pouvant servir à l'évaluation des effets de cet accident au niveau de la santé publique et/ou de l'environnement ;
- les mesures d'urgences prises.

2.2.2.4. Obligation de consultation de la Commission de Génie Génétique

Il s'agit d'une obligation incombant à tous les utilisateurs d'OGM dans le cadre de l'agrément comme cela est mentionné à l'article 6 de l'arrêté du 27 décembre 1994 : « *l'exploitant est tenu de s'assurer que toute opération effectuée dans le cadre d'une utilisation agréée n'entraîne pas un changement de classes de risque* » [23] et pour cela, en cas de besoin, « *l'exploitant consulte la Commission de Génie Génétique* » [23].

De même, lorsque l'utilisateur envisage de modifier les utilisations, il doit s'informer auprès de la commission que ces changements n'entraînent pas le dépôt d'une nouvelle demande d'agrément.

Il s'agit là d'un des rôles essentiels de la commission, comme il l'est écrit dans la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17] : celui d'organe consultatif.

Ce rôle est d'autant plus renforcé par le déroulement même de la procédure d'agrément (Article 3) : « *dès que le dossier de demande d'agrément est complet, le Ministère chargé de la Recherche (...) transmet pour avis la demande à la Commission de Génie Génétique* » [20]. Il est vrai que c'est la commission qui est la plus à même de juger de l'exactitude du classement et des mesures de confinement prises lors d'une utilisation d'OGM car elle est composée d'experts dans ce domaine.

2.3. Contrôle

Comme il est indiqué dans la circulaire du 16 avril 1996 [24], la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17], en plus d'avoir institué des règles claires en ce qui concerne les OGM, a également mis en place des structures afin de contrôler la correcte mise en œuvre des règles édictées.

2.3.1. Les agents de contrôle

Les articles concernant les agents de contrôle sont les articles 6-IV de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17] et les articles 14 à 16 du décret 93-773 [20]. Ces « *agents habilités et assermentés* » ont pour mission de « *rechercher et constater les infractions* » concernant les mesures dictées par la législation. (Article 6-IV [20]).

Selon l'article 14 du décret 93-773 [20], le Ministre chargé de la Recherche choisit les agents de contrôle « *parmi les fonctionnaires placés sous son autorité et les agents d'organismes publics de recherche* ». Ce choix est décidé par arrêté « *après avis de la Commission de Génie Génétique et du procureur de la République auprès du tribunal de grande instance de leur résidence administrative* ». Cet arrêté précisera également « *l'objet de l'habilitation, sa durée et la circonscription géographique* » (Article 14 [20]). Selon l'article 15 du même décret, si les agents de contrôle sont choisis parmi « *des fonctionnaires des administrations de l'Etat* », le ministre chargé de la recherche doit obtenir « *l'accord du ministre sous l'autorité duquel ils sont placés* ».

Il existe deux catégories d'agents de contrôle (Article 14 [20]) selon les contrôles qu'ils effectuent. Pour le contrôle des laboratoires (c'est-à-dire des installations), les agents doivent « *soit justifier d'un niveau de qualification d'une discipline scientifique au moins égal à celui d'un diplôme universitaire de deuxième cycle, soit être fonctionnaire de catégorie A dans un corps technique de l'Etat et posséder les connaissances scientifiques, techniques et juridiques nécessaires à leur mission* ». En ce qui concerne le contrôle des utilisations, les agents doivent « *justifier d'un niveau de qualification dans une discipline des sciences de la vie au moins égal à celui d'un diplôme universitaire de troisième cycle et d'une expérience confirmée en matière de génie génétique* ». Il est donc important de noter que le choix des agents de contrôle, d'après les textes, se fait par rapport à leurs compétences scientifiques, notamment quand il s'agit d'un sujet aussi pointu que les modifications génétiques.

Pour être habilité à effectuer les contrôles, « *les agents habilités par arrêté du Ministre chargé de la Recherche (...) prêtent serment devant le tribunal de grande instance de leur résidence administrative* », selon la formule suivante (Article 16 [20]) :

« *Je jure et promets de bien et loyalement remplir mes fonctions et d'observer en tout les devoirs qu'elles m'imposent. Je jure également de ne rien révéler ou utiliser de ce qui sera porté à ma connaissance à l'occasion de l'exercice de mes fonctions* ».

Ce serment protège donc les laboratoires visités par ces agents d'une confidentialité, importante dans le milieu de la recherche.

Les agents ainsi habilités et assermentés se voient délivrer une « *carte professionnelle portant mention de l'habilitation, de son objet, de sa durée et de son ressort géographique* » par le Ministère chargé de la Recherche (Article 17 [20]). Un agent est donc assigné à une zone géographique précise, dans un but précis et pour une durée précise. Sur cette carte, le

greffier du tribunal de grande instance où la prestation de serment a eu lieu y appose sa mention.

2.3.2. Le mode de contrôle

Selon l'article 13 de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992, le contrôle se fait en lieu et sur pièce : « *pour accomplir leur mission, les agents mentionnés ... ont accès aux installations et lieux où sont réalisées les opérations visées, à l'exclusion des locaux servant de domicile* » [17]. Dans le cas d'une installation confinée, les agents « *peuvent accéder à ces installations entre 8 heures et 20 heures* ». Avant toute intervention, le procureur de la République doit en être avisé et il « *leur donne, le cas échéant, toutes les instructions utiles* ».

Lors de la constatation d'une infraction, un procès-verbal est dressé et il est « *transmis sans délai au procureur de la République* ». Une copie est également adressée à « *l'intéressé et à l'administration compétente* », c'est à dire dans le cas qui nous intéresse le Ministre chargé de la Recherche. Le procès verbal fait « *foi jusqu'à preuve du contraire* ».

2.3.3. Les infractions et les peines

La loi française, afin de garantir une application correcte des textes et des prescriptions, a mis en place des sanctions et peines à l'encontre de toute personne morale ou physique n'y répondant pas.

Il est possible de distinguer 5 types d'infractions assorties de peines différentes [17, 20].

- **Exploitation d'une installation sans agrément ou en violation des prescriptions techniques**

Toute personne, physique ou morale, exploitant une « *installation utilisant des organismes génétiquement modifiés à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement, sans l'agrément requis* » ou « *en violation des prescriptions techniques* » encourt les sanctions suivantes (il est possible d'encourir les deux peines ou seulement l'une des deux) :

- une peine d'emprisonnement de 2 mois à 1 an ;
- une amende de 2 000 F à 500 000 FF.

Si il y a récidive, une peine d'emprisonnement de 2 mois à 2 ans et/ou une amende de 20 000 F à un million de francs seront prononcées.

De plus, en cas de condamnation, « *le tribunal peut interdire le fonctionnement de l'installation* ». Mais cette interdiction prendra fin « *si un agrément est délivré ultérieurement* ». De même, « *l'exécution provisoire de l'interdiction peut être ordonnée* ».

- **Non respect des nouvelles prescriptions techniques faisant suite à une nouvelle évaluation des dangers**

Comme nous l'avons vu précédemment, dans le cas d'une nouvelle évaluation des dangers ou des inconvénients, une modification des prescriptions techniques peut être imposée et éventuellement l'agrément peut être suspendu pendant le délai nécessaire à la mise en œuvre des nouvelles mesures ou retiré si aucune mesure ne peut faire disparaître ces dangers ou inconvénients.

Cependant en cas de non-respect de ces mesures, l'exploitant de l'installation encourra les peines suivantes (il est possible d'encourir les deux peines ou seulement l'une des deux) :

- une peine d'emprisonnement de 2 mois à 2 ans ;
- une amende de 20 000 F à un million de francs.

De plus, en cas de condamnation, « *le tribunal peut interdire le fonctionnement de l'installation* ».

- **Obstacle à l'exercice des fonctions des agents de contrôle**

Les agents de contrôle assermentés peuvent visiter les installations entre 8 heures et 20 heures et toute personne faisant « *obstacle à l'exercice des fonctions* » de ces agents, encourt les peines suivantes (il est possible d'encourir les deux peines ou seulement l'une des deux) :

- une peine d'emprisonnement de 10 jours à un an ;
- une amende de 2 000 F à 100 000 F.

Dans ces 3 premiers cas, en cas de condamnation, « *le tribunal peut ordonner aux frais du condamné la publication intégrale ou par extraits de sa décision* » (Article 6-V [17]). De plus, il peut éventuellement ordonner « *la diffusion d'un message dont il fixe explicitement les termes* » afin d'informer « *le public des motifs et du contenu de sa décision, dans un ou plusieurs journaux qu'il désigne, ainsi que son affichage* ». Mais les frais de ces publications ne doivent pas « *excéder le montant maximum de l'amende encourue* ».

- **Non dépôt en mairie du dossier d'information**

Une « *peine d'amende prévue pour les contraventions de la troisième classe* » est prévue « *tout exploitant d'un laboratoire dans lequel est mis en œuvre une utilisation d'OGM du groupe II ... qui n'a pas procédé au dépôt d'un dossier d'information à la mairie de la commune ou de l'arrondissement d'implantation du laboratoire* » (Article 18-I, [20]).

Selon l'article 131-13 du Code Pénal, le montant de l'amende pour une contravention de 3^{ème} classe s'élève à 3 000 F au plus.

- **Omission d'information du Ministre chargé de la Recherche suite à un accident.**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'exploitant d'une installation doit prévenir le ministre chargé de la recherche de tout accident survenu pendant l'utilisation. En cas de non respect de cette disposition, une « *peine d'amende prévue pour les contraventions de 5^{ème} classe* » est prévue (Article 18-II [20]).

Selon l'article 131-13 du Code Pénal, le montant de l'amende pour une contravention de 5^{ème} classe s'élève à 10 000 F au plus.

En résumé, la procédure d'agrément mise en place par le biais de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17] se fait selon une démarche précise et reprend les grands principes de la Directive européenne 90/219/CEE [3].

Les utilisateurs établissent une demande d'agrément (ou notification) selon un modèle bien établi (différent selon le groupe d'OGM), cette demande comporte tous les éléments nécessaires à l'évaluation. Cette demande, envoyée au Ministre chargé de la Recherche est transmise à la Commission de Génie Génétique. Cette commission en prenant en compte les différents éléments du dossier procède à l'évaluation des risques et à la classification des utilisations. Suite à une discussion en session plénière, le président de la Commission de Génie Génétique émet un avis (favorable ou non) qu'il soumet au Ministre chargé de la Recherche. C'est ce dernier qui délivre l'autorisation (ou agrément) sauf si il y a contestation de cet avis par le Ministre chargé de l'Environnement (mais ce cas ne s'est jamais présenté [29]).

3. Applications et limites de cette législation

3.1 Quelques chiffres concernant l'utilisation d'OGM en France.

D'après le rapport de synthèse concernant l'application de la Directive 90/219/CEE, pendant la période 1996-1999, 614 nouvelles autorisations ont été délivrées par les autorités françaises. Ces autorisations concernent des opérations mettant en jeu des OGM ou des MGM. Il y a eu 404 autorisations accordées pour des MGM de groupe I (336 pour des installations publiques et 68 pour des installations privées). Au total, ce sont 1498 projets de classe de risque 1 qui ont reçu une autorisation [29].

En ce qui concerne les opérations faisant intervenir des MGM ou des OGM de groupe II, 197 autorisations ont été délivrées (175 pour des installations publiques et 22 pour le secteur privé). Ces autorisations concernent 684 projets de classe de risque 2 ou plus, mais seulement un seul projet de classe de risque 4 a été autorisé et il concerne les opérations menées au sein du laboratoire de haute sécurité Jean Mérieux de Lyon (laboratoire dit « P4 ») [29]. Treize autres autorisations ont été octroyées pour l'utilisation de MGM/OGM des groupes I et II.

Ces chiffres prouvent bien l'intérêt grandissant que suscitent les nouvelles techniques de modifications génétiques que ce soit pour la recherche publique ou privée.

3.2. Limites

Les reproches les plus importants qui pourraient être faits à l'égard de cette législation est la lourdeur des démarches administratives. Mais cette lourdeur est nécessaire vu la possibilité de risques engendrés par ces techniques et si les dossiers de demande étaient moins contraignants, il pourrait être reproché, de la part des opposants farouches à ces techniques, une trop grande facilité de réalisation de ce type d'expériences. En plus des nombreux textes législatifs, s'ajoutent d'autres documents comme le guide de la Commission de Génie Génétique et différents textes normatifs émanant de l'Afnor. Même si ces documents se recoupent souvent, les personnes envisageant la mise en œuvre de l'utilisation d'OGM dans le cadre de la recherche se retrouvent devant un arsenal impressionnant de règles et de prescriptions techniques à suivre. Cependant, il convient de remarquer que le Ministère chargé de la Recherche conscient de ce problème a édicté une circulaire dans le but de clarifier la compréhension des textes législatifs [24].

Un reproche important fait à l'encontre de la loi n°92-654 du 13 juillet 1992 [17] et de ses textes dérivés émane de la Commission des Communautés Européennes dans le rapport de synthèse concernant l'application de la Directive 90/219/CEE [3]. Il concerne la transposition de la Directive 98/81/CE [9] en droit français. Il est vrai que la Directive 90/219/CEE [3] a bien été transposée, par le biais de la loi n° 92-654 du 13 juillet 1992 [17], mais ce n'est pas encore le cas de la Directive 98/81/CE [9] (qui modifie la Directive 90/219/CEE sur certains points) [29]. Il semblerait que ce texte soit actuellement en cours de validation par le Ministre chargé de la Recherche et devait être présenté aux autres ministres compétents au début de l'automne 2000. Cependant, aucune nouvelle loi ou modification des décrets et arrêtés n'a encore été publiée. Il convient donc de se demander quand cette transposition aura lieu et quelles seront ses répercussions au niveau de la démarche d'agrément.

La dernière remarque concernant l'utilisation des OGM concerne un aspect qui n'a pas encore été réellement pris en compte par la législation : le transport. Cependant, un principe doit être suivi : l'emballage des animaux doit être conçu de manière à ce qu'une rupture de confinement ne puisse jamais avoir lieu pendant le transport [28].

En fournissant un cadre juridique à ces nouvelles techniques à fort potentiel, la réglementation en matière d'OGM s'est révélée fort utile, d'autant plus qu'encore à l'heure actuelle tous les risques n'ont pas été identifiés (particulièrement ceux à long terme). Le champ d'application de cette réglementation est vaste, notamment dans les pays de l'Union Européenne (dont la France) ayant choisi de transposer la directive européenne à tous les organismes (et non pas seulement les micro-organismes).

Selon le secteur d'activité, les différentes obligations doivent être suivies et conduisent à la délivrance d'un agrément nécessaire avant de débiter toute expérience mettant en jeu des OGM : élaboration du dossier de demande d'agrément et conformité des locaux aux prescriptions techniques.

PARTIE III :
MISE EN PLACE D'UNE ANIMALERIE
POUR ANIMAUX TRANSGENIQUES

Avant de mettre en place et d'initier des protocoles impliquant l'utilisation d'animaux transgéniques, il est important de comprendre les différents enjeux et de les évaluer. Les problèmes de temps, de coût financier, d'espace, de personnel et d'équipement nécessaires doivent être évalués afin de faire les choix essentiels. Actuellement le nombre de protocoles impliquant des animaux transgéniques augmente et de plus en plus de chercheurs souhaitent travailler avec de tels outils [73].

Dans un premier temps, nous évoquerons les principes généraux devant être suivis pour la conception d'une animalerie ainsi que les dispositifs particuliers pour les animaux transgéniques, c'est-à-dire tous les détails concernant les mesures de confinement. Puis, nous exposerons la démarche à suivre : papiers et formulaires officiels, ministères intervenants, chronologie de la demande.

I. Organisation d'une animalerie pour animaux transgéniques

Comme nous l'avons vu auparavant, l'utilisation des animaux transgéniques en laboratoire répond à différentes réglementations : d'un côté celle concernant l'expérimentation animale et de l'autre celle plus particulière à l'utilisation confinée d'OGM. Ainsi, si l'utilisation d'OGM en expérimentation animale est envisagée, le laboratoire doit procéder à deux demandes d'agrément et doit donc être conçu de façon à être conforme à ces deux réglementations et aux prescriptions inhérentes aux deux agréments.

Actuellement la presque totalité des expérimentations faites en recherche biomédicale et pharmaceutique sur des animaux transgéniques sont réalisées avec des rongeurs et, dans la grande majorité, des souris. Les recommandations données dans cette partie concernera donc plus particulièrement l'hébergement des souris, bien que des informations pour d'autres types d'animaux sont évoquées dans les mêmes textes.

1. Principes généraux d'organisation d'une animalerie

Les caractéristiques de l'animalerie doivent répondre aux législations française et européenne. Ces deux législations découlent directement d'un document élaboré par le Conseil de l'Europe : la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques [31]. La Directive 86/609/CEE [2] en reprend les grands principes et a été transposée en droit français [29]. De plus, suite à sa ratification par la France, la Convention a été également portée à publication dans la législation française par le décret 2001-486 [30] qui en assure alors l'application et l'exécution.

Une législation très similaire est également en vigueur aux Etats-Unis [36] et il existe un guide en regroupant les grands principes ainsi que les recommandations en découlant [92] et il a été également traduit en français [94].

1.1. Les différentes pièces d'une animalerie

Quelques principes sont indispensables à prendre en compte lors de la conception d'une animalerie : la notion de barrière par rapport à l'environnement [77], la séparation des espèces et des provenances et la cohérence des circuits [38].

Une animalerie ne comporte pas uniquement des pièces pour l'hébergement des animaux ; d'autres locaux sont également indispensables : dans toute animalerie, les mêmes catégories de pièces devraient être présentes et reliées entre elles par des circuits (flux).

Pour les animaux, différentes pièces sont nécessaires : pour la stabulation, pour l'expérimentation, pour la quarantaine. Il ne faut pas non plus oublier des pièces dédiées aux soins et éventuellement l'isolement des animaux malades, ainsi qu'une pièce réservée pour les euthanasies et les autopsies. De plus, il convient, pour des raisons éthologiques et sanitaires, de séparer les espèces et les provenances (arrivages et fournisseurs). Dans ce but, il est recommandé d'utiliser une pièce d'hébergement par espèce (si cela n'est pas possible, il convient de séparer au moins les prédateurs et leurs proies) et d'avoir la possibilité de séparer les animaux d'arrivage différents, surtout lors de la période dite de quarantaine. Certains fournisseurs d'équipement pour animaleries ont développés des isolateurs permettant, par exemple, d'héberger dans la même pièce des rats et des souris : ces isolateurs fonctionnent indépendamment comme des pièces séparées.

Une animalerie peut aussi comporter un ou plusieurs laboratoires selon les besoins et le principe de fonctionnement de l'établissement.

Le personnel devrait avoir à disposition différentes pièces comme des vestiaires, des toilettes, des bureaux, une salle de réunion et/ou de repos.

Des salles de rangement devraient également être prévues : pour l'aliment (local étanche, frais, sec et aéré), la litière, les déchets, les équipements propres (portoirs, cages, mangeoires, biberons) et autres fournitures (médicaments, instruments de chirurgie, produits d'entretien, fournitures de bureau).

Des locaux de nettoyage (laveries) et de stérilisation sont indispensables. Leur place dans le plan doit être réfléchi, notamment du point de vue de la cohérence des circuits (flux sale/flux propre).

L'animalerie, pour son fonctionnement, nécessite des équipements techniques mais il est préférable de concentrer ces installations au niveau de locaux techniques indépendants et accessibles de l'extérieur de l'animalerie.

Au regard du grand nombre d'activités, il convient également de bien concevoir les couloirs qui font partie intégrante du système, notamment en ce qui concerne la gestion des flux et la cohérence des circuits. Par exemple, les circuits sale et propre ne doivent pas se croiser (si cela n'est pas possible, un planning peut être mis en place de façon à effectuer des nettoyages entre les passages des flux sales notamment). Mais comme les couloirs sont considérés comme des zones improductives, il convient de bien les étudier afin d'en limiter leur importance tout en tenant compte du fait que leur largeur doit permettre le passage aisé du matériel (chariots de transports, portoirs, cages...).

Ainsi, une animalerie ne comporte pas seulement des pièces d'hébergement pour les animaux : c'est un ensemble complexe de différentes pièces dédiées à différentes activités et cet ensemble doit être conçu de manière à être flexible (c'est-à-dire que les pièces d'hébergement

doivent permettre d'héberger différentes espèces animales dans le temps). Il conviendra également de réfléchir aux possibilités d'extension de l'animalerie dans le futur.

1.2. Les caractéristiques physiques des locaux d'hébergement

Les recommandations suivantes découlent directement de la réglementation actuellement en vigueur.

Les murs et plafonds doivent être lisses, étanches et facilement lavables. Ils doivent être également résistants, notamment aux vapeurs de formol. Il ne doit pas y avoir de fenêtre.

Les sols doivent être uniformes, non glissants, imperméables et résistants aux charges et à l'abrasion (ceci est d'autant plus important au niveau du couloir où le transit de matériel est important). Dans les pièces d'hébergement, les sols doivent être adaptés aux particularités anatomiques et physiologiques des espèces hébergées.

En ce qui concerne les cages et les boxes d'hébergement, leur surface doit être fonction de l'espèce hébergée et du nombre d'animaux. Il existe dans la législation des réglementations pour la surface des cages [2]. De plus, leur conception et les matériaux utilisés doivent être adaptés aux espèces hébergées et ne présenter aucun risque pour eux (blessure). Leur désinfection/formulation doit être aisée.

Il est évidemment recommandé de maintenir dans un état de propreté irréprochable tous les différents locaux de l'animalerie.

Les ouvertures doivent être munies de dispositifs empêchant l'entrée de rongeurs sauvages et/ou d'insectes. Les portes doivent être munies de dispositif (fermeture automatique par exemple) de manière à éviter l'évasion des animaux hébergés ou l'intrusion d'animaux sauvages [78].

1.3. Les paramètres environnementaux

Les paramètres de l'environnement ont aussi un effet sur les animaux de laboratoire et donc éventuellement sur les résultats scientifiques obtenus sur ces animaux. Les facteurs d'environnement peuvent entraîner des modifications physiologiques plus ou moins durables susceptibles d'altérer la valeur de l'animal de laboratoire en tant que réactif biologique [94].

Aux paramètres environnementaux classiques, peuvent s'ajouter des mesures permettant de préserver ou d'améliorer le bien-être des animaux : hébergement en groupe, contact avec les personnes en charge des soins aux animaux, enrichissement physique de l'environnement des animaux.

1.3.1. Les paramètres environnementaux « classiques »

Les variations de certains paramètres environnementaux peuvent avoir un effet très néfaste sur la santé et le bien-être des animaux. Ils devraient donc être régulés en utilisant différents systèmes avec des moyens de détection et des seuils d'alarme.

- Humidité

Il est fortement recommandé que le niveau d'humidité relative (HR) soit maintenu à 55% +/- 10% [78], bien que dans la réglementation, il est précisé que les valeurs doivent être comprises entre 40 et 70%.

- Ventilation

Les systèmes de ventilation doivent être conçus de manière à éviter les courants d'air. Il est recommandé que le taux de renouvellement de l'air soit compris entre 15 et 20 volumes d'air par heure en moyenne. Cependant, lorsque la densité de la population animale est faible, un taux de 8-10 volumes d'air par heure peut être suffisant.

- Température

Il est recommandé de maintenir une température constante appropriée aux espèces hébergées. Dans le cas des souris, la température recommandée est de 20-24°C. Cependant, ces températures peuvent être augmentées pour des nouveau-nés, des animaux jeunes, des animaux malades ou encore, par exemple, des souris nude.

- Eclairage

Il est recommandé d'assurer un éclairage artificiel contrôlé pour satisfaire aux exigences biologiques et comportementales des animaux. Il est recommandé également de contrôler l'intensité lumineuse ainsi que les cycles lumière-obscurité [69]. Certains animaux sont très sensibles à la lumière, comme par exemple les animaux albinos.

- Bruits

L'isolation phonique est recommandée de manière à éviter tout trouble du comportement lié au bruit [27].

1.3.2. L'enrichissement du milieu et le bien-être des animaux

L'enrichissement est un sujet d'actualité et de nombreux centres de recherche mettent en place des programmes d'enrichissement qui devraient être révisés régulièrement.

Il est vrai que pendant longtemps, ce type de programmes n'était mis en place que pour certaines espèces telles que les primates non-humains, les chiens ou encore les porcs ; mais il semblerait que ces pratiques s'appliquent de plus en plus à toutes les espèces dont les rongeurs [115, 123].

L'enrichissement peut être réalisé de différentes manières : hébergement en groupe [69], interactions avec le personnel en charge des soins [92], alimentation variée [69]. Cependant chacune de ces méthodes possèdent des inconvénients : par exemple, l'hébergement en groupe peut être source de blessures [92] notamment quand des souris mâles sont hébergées ensemble.

1.4. Les soins aux animaux

Les soins et la surveillance régulière des animaux doit être assurée par un vétérinaire ou par toute autre personne possédant les connaissances minimales requises. Les soins doivent être reportés sur un registre prévu à cet effet. La mention des visites et des soins doit être datée, signée et visée. Ce registre, comme celui de mouvements des animaux, doit être préalablement visé par le Commissaire de Police ou le Préfet et comporter, en en-tête, les mêmes renseignements [27].

Le personnel en charge des soins aux animaux doit être qualifié et en nombre suffisant afin d'assurer d'une surveillance maximale des animaux. Le personnel doit être apte à détecter tout problème portant atteinte à la santé ou au bien-être des animaux [27].

A leur arrivée, les animaux doivent être inscrits au niveau d'un registre prévu à cet effet, de même leur sortie doit y être mentionnée (registre des mouvements d'animaux). Ce registre doit avoir été visé par le Commissaire de Police ou le Préfet avant son ouverture. Sur la première doivent figurer différents renseignements : nom de l'établissement, nature des activités exercées, nom du directeur de l'établissement, nom et qualifications de personne responsable de l'entretien des animaux (en général, un vétérinaire). De plus, ce registre doit comporter autant de chapitres qu'il y a d'espèces détenues. Cependant, des alternatives à la tenue de ce registre sont possibles (par exemple logiciel informatique) mais elles doivent être validées par la Direction des Services Vétérinaires.

Ces différents registres doivent pouvoir être présentés, à tout moment, aux autorités de contrôle (Direction des Services Vétérinaires).

2. L'animalerie pour animaux transgéniques

2.1. Règles générales

Dans de nombreux articles concernant l'hébergement des rongeurs, il est fait mention des conditions d'hébergement des souris transgéniques. Les principes de base à suivre sont les mêmes [69].

Il convient, néanmoins, de considérer chaque lignée transgénique comme une entité indépendante (les croisements incontrôlés doivent être évités) [106]. Les personnes en charge des soins de ces animaux doivent être qualifiées et habituées à l'observation de tels animaux [124]. Cette observation des animaux est cruciale car elle permet de détecter le moindre problème de santé ou de bien-être ; l'utilisation de fiches d'observation individuelles peut à ce niveau être très intéressante [125].

Dans le guide de la Commission de Génie Génétique, il est fait de mention de règles particulières communes à l'hébergement des animaux transgéniques :

- les animaux impliqués dans des protocoles de transgénèse (c'est-à-dire les animaux effectivement transgéniques et ceux présumés non transgéniques mais ayant reçu de l'ADN étranger lors de leur vie embryonnaire) doivent être élevés à l'écart des autres animaux, ceci afin d'empêcher tout croisement incontrôlé. Ces animaux ne doivent pas pouvoir circuler librement, et donc, les locaux où ils sont hébergés doivent être pourvus d'un dispositif d'accès contrôlé [28] ;

- les cages ou les structures de confinement dans lesquelles des animaux transgéniques sont hébergés doivent être numérotées, répertoriées et identifiées avec la mention « *organismes génétiquement modifiés* ». Ces animaux doivent être également facilement identifiables (différents moyens sont possibles : puces électroniques, marquage aux oreilles ... [133]) afin d'éviter toute identification ambiguë ou inversion. Ce marquage doit permettre de retrouver aisément leur historique. Dans le cas des petits rongeurs, l'identification peut se faire au niveau des oreilles ou des doigts, mais le marquage aux oreilles combiné à la couleur du pelage est le système le plus fréquemment utilisé [68]. L'identification par puces, en raison de son coût, devrait être réservée aux animaux fondateurs de lignée ;
- si ces animaux doivent être transportés, le transport doit se faire dans les mêmes conditions de confinement que l'hébergement [28] ;
- une fois que les animaux transgéniques ne sont plus impliqués dans des protocoles, leur euthanasie doit être réalisée de manière à ce qu'aucun transfert génétique ne puisse avoir lieu [28] ;
- il est éventuellement possible de réutiliser des animaux présumés non-transgéniques (après réalisation d'un examen par PCR) dans d'autres protocoles mais ils ne doivent jamais être utilisés pour la reproduction [28].

A ces principes de base, s'ajoute des recommandations plus techniques (concernant surtout la conception des locaux) et rendues obligatoires par la loi : le confinement.

2.2. Le confinement

2.2.1. Classement des animaux transgéniques

Selon la nature des modifications génétiques réalisées (utilisation de vecteurs viraux, micro-injection, manipulation des cellules ES...), les animaux doivent être hébergés dans des conditions de confinement différentes : les animaux transgéniques sont donc classés en 4 classes (1 à 4), ce classement reprenant le principe de classement des OGM exposé dans la partie II. De ce fait, les animaux de classe 1 appartiennent au groupe I et les autres au groupe II [28].

Il y a quatre classes d'animaux abritant un gène étranger (voir Tableau 4) [28] :

- **Classe 1 :**
 - animaux abritant un gène ne leur conférant aucun effet nuisible connu pour l'homme ou l'environnement ;
 - animaux ne relarguant jamais de particules virales ;
 - animaux susceptibles de relarguer des particules virales de classe 1.
- **Classe 2 :**
 - animaux abritant un gène mobilisable ayant un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou leur conférant aux animaux un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement. C'est le cas notamment des animaux abritant par exemple un gène de prion ou un gène codant pour récepteur de virus ;
 - animaux susceptibles de relarguer des particules virales de classe 2.
- **Classe 3 :**

- animaux susceptibles de relarguer des particules virales de classe 3 ou abritant un gène de prion muté associé à une pathogénicité chez l'homme.

- **Classe 4 :**

- animaux susceptibles de relarguer des particules virales de classe 4.

Classe	1	2	3	4
Types d'animaux	abritant un gène ne leur conférant aucun effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou ne relarguant jamais de particules virales ou relarguant des particules virales de classe 1	abritant un gène mobilisable ayant un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou conférant à l'animal un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou relarguant des particules virales de classe 2	relarguant des particules virales de classe 3	relarguant des particules virales de classe 4

Tableau 4 : Tableau récapitulatif du classement des animaux [28]

Comme, en règle générale, les souris transgéniques utilisées dans des protocoles expérimentaux en recherche pharmaceutique sont des souris obtenues par micro-injection : elles sont considérées comme des OGM appartenant à la classe 1.

2.2.2. Les différents confinements selon la classe [28]

A chaque classe d'animaux correspond un type d'animaleries : il y a donc 4 types d'animaleries (A1 à A4 - voir Tableau 5).

2.2.2.1. Les animaleries de type A1

Les animaleries de type A1 sont des animaleries dites « conventionnelles » (voir Annexe 3) avec des dispositifs spécifiques empêchant la dissémination des animaux dans l'environnement selon l'espèce concernée.

Les animaux sont éliminés à la fin des expériences.

2.2.2.2. Les animaleries de type A2

Deux cas sont à prendre en considération :

- Animaux relarguant des particules virales :

Ces animaux sont hébergés dans des animaleries ayant les caractéristiques de confinement des locaux de type L2 (voir Annexe 3) : signalisation du laboratoire par pictogramme « Danger biologique », local en dépression, sas en légère surpression (dans le but d'éviter toute entrée d'air contaminé dans le sas), autoclavage du matériel et des cages, utilisation d'un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type 2 (afin de protéger le manipulateur, la manipulation et l'environnement), port de gants lors de la manipulation des animaux (surtout si il y a risque de morsures ou de griffures). Les animaux sont maintenus dans des enceintes ne permettant pas la diffusion de particules virales. Les déchets (animaux et déchets d'activités de soin) sont inactivés par autoclavage (voir Annexe 3).

- Animaux abritant des gènes mobilisables nuisibles pour l'homme ou l'environnement ou leur conférant un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement

Les animaux sont hébergés dans des animaleries ayant les caractéristiques des animaleries de type A1 et incluant des dispositifs renforcés pour empêcher toute dissémination des animaux dans l'environnement. Il peut être également nécessaire d'empêcher la contamination de ces animaux par des organismes vivants étrangers, il convient dans ce cas d'utiliser, par exemple, des isolateurs en dépression ou des cages à couvercle filtrant.

2.2.2.3. Les animaleries de type A3

Les animaux sont hébergés dans des animaleries ayant les caractéristiques des animaleries de type A1 et comportant, en plus, le confinement des locaux de type voir Annexe 3) : local sous pression négative avec sas, filtrage de l'air sortant et entrant par des filtres HEPA, autoclave à double entrée, PSM de type 2.

Il convient d'héberger les animaux dans des cages à couvercle filtrant ou des isolateurs en dépression. Tous les déchets sont inactivés par autoclavage. Il est possible également de mettre en place des systèmes semblables à ceux utilisés dans le 2^{ème} cas de l'animalerie de type A2.

2.2.2.4. Les animaleries de type A4

Les animaux sont hébergés dans des animaleries ayant les caractéristiques des animaleries de type A1 et comportant, en plus, le confinement des locaux de type L4 (voir Annexe 3). Il est possible également de mettre en place des systèmes semblables à ceux utilisés dans le 2^{ème} cas de l'animalerie de type A2.

Type d'animalerie	A1	A2	A3	A4
Classe des animaux	1	2	3	4
Confinement physique	<p>conditions habituelles d'élevage avec des barrières physiques spécifiques pour les espèces pouvant se multiplier dans l'environnement</p> <p>les animaux transgéniques sont isolés des animaux non expérimentaux</p> <p>tous les animaux expérimentaux sont éliminés</p>	<p>conditions définies pour l'animalerie A1</p> <p>+</p> <p>les animaux sont maintenus à l'intérieur de barrières physiques renforcées s'ils abritent des gènes nuisibles pour l'homme ou l'environnement</p> <p>les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L2 s'ils relarguent des particules virales</p> <p>tous les animaux expérimentaux sont autoclavés</p>	<p>conditions définies pour l'animalerie A1</p> <p>+</p> <p>les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L3</p> <p>tous les animaux expérimentaux sont autoclavés</p>	<p>conditions définies pour l'animalerie A1</p> <p>+</p> <p>les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L4</p> <p>tous les animaux expérimentaux sont autoclavés</p>

Tableau 5 : Tableau récapitulatif du confinement des animaux abritant des gènes étrangers [28]

II. L'agrément des animaleries pour animaux transgéniques

Comme nous l'avons vu dans la partie II concernant la législation, l'utilisation confinée d'animaux transgéniques est soumise à un agrément spécifique et préalable à toute utilisation. Nous expliciterons donc dans cette partie le déroulement de la demande d'agrément ainsi que la composition du dossier de demande d'agrément.

Remarque : comme pour tous les établissements d'expérimentation animale, un agrément (« agrément des établissements d'expérimentation animale ») doit être demandé : un dossier constitué par le formulaire type Cerfa 50-341 correctement rempli et accompagné des documents nécessaires (plans, liste des personnes habilitées, liste des agents animaliers et des techniciens...) doit être déposé auprès de la Direction des Services Vétérinaires du département d'implantation de l'établissement. Cependant si il est décidé d'implanter au sein d'un établissement déjà agréé une unité pour animaux transgéniques, il suffira de faire seulement une demande d'agrément pour l'utilisation d'OGM.

1. Les principes de l'agrément

L'agrément est préalable aux manipulations envisagées : avant de débiter toute expérimentation mettant en jeu des OGM, l'agrément doit avoir été demandé et accepté. Si les expériences se déroulent sans agrément, des sanctions sont prévues (voir Partie II).

Un agrément correspond à une combinaison précise d'éléments : OGM utilisé (ou plus précisément groupe et classe de l'OGM en question), installation, utilisateur. L'agrément est donné pour un lieu précis (site géographique unique) avec une ou plusieurs installations. Il désigne également des étapes, des méthodes, des responsables et des opérateurs. Il est également accordé pour une durée limitée.

L'agrément par le biais du dossier technique prévu doit permettre le classement des manipulations selon 4 différentes classes de risque et selon la classe de risque, des mesures de confinement précises devront être suivies.

Bien que l'agrément soit donné pour un groupe d'OGM (I ou II), le Ministère chargé de la Recherche recommande fortement de faire une demande d'agrément par groupe (I et II) [24].

Ainsi une demande d'agrément est une étape importante et doit donc être bien réfléchi. Avant de débiter toute demande d'agrément, il est nécessaire d'établir avec précision son projet et notamment de déterminer quel groupe d'OGM sera utilisé.

Le cas des OGM de groupe I, qui correspond à la classe de risque 1, est le plus fréquent pour des animaux transgéniques : ce sont des OGM répondant à certains critères (voir Tableau 6).

OGM de groupe I	
Organismes parental et receveur	non susceptible de provoquer une maladie chez l'homme, l'animal, la plante ou d'entraîner des effets néfastes pour l'environnement
Couple vecteur/insert	incapable de doter le receveur d'un caractère susceptible de le rendre pathogène pour l'homme, l'animal ou la plante ou d'entraîner des effets néfastes pour l'environnement
OGM en lui-même	non susceptible de provoquer une maladie chez l'homme, l'animal, la plante ou d'entraîner des effets néfastes pour l'environnement

Tableau 6 : Les caractéristiques des OGM de groupe I (d'après [28])

Pour les OGM de groupe II correspondant aux classes de risque 2, 3 et 4, il est considéré que tout OGM qui ne peut répondre strictement à la définition du groupe I doit être classé dans le groupe II. Mais il ne faut pas oublier que ce groupe rassemble 3 classes de risque différentes (correspondant à 3 niveaux de confinement différents). Ce classement, même si il est basé sur le classement des micro-organismes pathogènes, est plus difficile à déterminer. C'est pourquoi chaque cas doit être examiné par la Commission de Génie Génétique

Nous allons donc voir quel modèle doit suivre une demande d'agrément dans deux cas :

- la première demande dans le cas de l'utilisation d'OGM de groupe I puis de groupe II ;
- la demande ultérieure, c'est-à-dire pour un prolongement d'agrément.

2. La première demande d'agrément

L'agrément est délivré par le Ministre chargé de la Recherche après accord du Ministre chargé de l'Environnement. La demande d'agrément doit être établie par l'exploitant du laboratoire.

2.1. Les conditions de la première demande d'agrément

Une première demande d'agrément doit être faite : si aucune utilisation d'OGM du groupe demandé n'a été entreprise et si aucun agrément n'a été déjà accordé pour ce groupe. Si, par exemple, un laboratoire possède déjà l'agrément pour des OGM de groupe I et qu'il souhaite utiliser des OGM de groupe II, il doit dans ce cas faire une première demande d'agrément pour des OGM de groupe II. C'est pourquoi le Ministère chargé de la Recherche recommande de déposer simultanément les deux types de demande d'agrément (groupe I et groupe II) [24].

2.2. Les dossiers de demande d'agrément

Il existe deux types de formulaire de type Cerfa selon le groupe d'OGM en question. Cependant ces deux formulaires diffèrent très peu.

2.2.1. Pour les OGM de groupe I

Dans le cas des OGM de groupe I, le formulaire à renseigner est le formulaire Cerfa n°11674*01 (voir Annexe 4) qui comporte 18 pages et qui est disponible via internet [112].

Ce document s'articule autour de quatre parties et comporte tous les renseignements nécessaires à l'examen du dossier par la Commission de Génie Génétique et les Ministères chargés de l'Environnement et de la Recherche. Les quatre parties sont les suivantes :

- renseignements relatifs au laboratoire : cette partie regroupe toutes les informations concernant non seulement les personnes impliquées dans l'utilisation (exploitant, directeur des travaux de recherche, scientifiques et techniciens impliqués dans le ou les projets, responsables Hygiène et Sécurité), mais aussi les informations sur la structures de locaux dans lesquels les projets seront réalisés ;
- renseignements globaux relatifs à l'utilisation d'OGM : il s'agit d'un descriptif de la thématique des recherches réalisées nécessitant l'utilisation d'OGM, c'est-à-dire les buts poursuivis et les résultats attendus ;
- description détaillée des différents projets : cette demande peut être faite pour un ou plusieurs projets et chaque projet doit être décrit avec précision (proposition de classement de l'OGM en question, renseignements techniques et scientifiques sur l'OGM en question. Cette partie est à reproduire autant de fois qu'il y a de projets ;
- durée de la demande d'agrément : la durée demandée est généralement de 5 ans.

2.2.2. Pour les OGM de groupe II

Dans le cas des OGM de groupe II, le formulaire à renseigner est le formulaire Cerfa n°11675*01 (voir Annexe 5) qui comporte 18 pages et qui est disponible via internet [112].

Ce formulaire est très semblable au formulaire du groupe I, le seul point de différence est la nécessité de fournir, dans le cas d'utilisation d'OGM de classes de risque 3 ou 4, une description des sources potentielles de danger liées à la situation du laboratoire ainsi que les conditions météorologiques prédominantes.

2.2.3. Conseils de rédaction des dossiers

Quelques recommandations doivent être prises en compte avant de commencer à remplir un dossier de demande d'agrément et des notices explicatives ont été éditées dans ce but (voir Annexes 6 et 7).

Les formulaires rassemblent l'ensemble des renseignements pouvant être nécessaires à l'évaluation des dossiers par la Commission de Génie Génétique. Pour faciliter cette évaluation, toutes les rubriques doivent être renseignées. Notamment, les nombreux tableaux sont essentiels pour la compréhension de l'ensemble des activités du laboratoire en question.

Ils permettent une évaluation synthétique de la conformité des locaux. Si ces tableaux ne sont pas correctement remplis, le dossier ne sera pas considéré comme complet.

De plus, les signatures des responsables scientifiques et juridiques sont indispensables pour la validité du dossier.

2.3. L'instruction des dossiers de demande d'agrément

Que ce soit pour le groupe I ou II, l'instruction de la première demande d'agrément suit les mêmes modalités. Toutes ces modalités sont décrites dans le décret 93-773 [20].

2.3.1. Envoi des dossiers

Une fois le dossier rempli, le demandeur envoie au Ministère chargé de la Recherche l'original ainsi que le nombre de copies requises. Cependant, au niveau du nombre de copies requises, les informations diffèrent : dans la circulaire du 16 avril 1996 [24], il est fait mention de 20 copies, alors qu'au niveau des notices explicatives (formulaires Cerfa n° 50779#01 et 50780#01 - voir Annexes 6 et 7), il est fait mention de 6 exemplaires c'est-à-dire l'original et 5 copies. L'adresse du Ministère de la Recherche est la suivante :

Ministère de la Recherche Direction de la Recherche Secrétariat de la Commission de Génie Génétique 1, rue Descartes 75231 PARIS Cedex 05

2.3.2. Instruction des dossiers

C'est le Ministère chargé de la Recherche qui traite les demandes et se charge de l'instruction des dossiers dans le cadre de l'utilisation d'OGM à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement. L'instruction rassemble les différentes étapes conduisant de la réception du dossier et son examen jusqu'à la délivrance ou au refus de l'agrément.

Le Ministère dispose d'un délai de 90 jours à partir de la date de l'enregistrement du dossier complet. Cette date correspond à la date portée sur l'accusé de réception délivré par le Ministère une fois le dossier complet.

Cependant ce délai peut être prolongé d'un mois s'il y a impossibilité de statuer dans le délai imparti de 90 jours. De plus, ce délai ne prend pas en compte les délais nécessaires aux compléments d'informations (une fois le dossier enregistré).

Une fois le dossier complet, le Ministère transmet le dossier à la Commission de Génie Génétique pour consultation. Lors de la préparation du dossier technique d'agrément, un classement de risque de l'OGM en question est proposé par le rédacteur. Mais la Commission a pour rôle d'expertiser les dossiers (qui lui sont envoyés à ce but par le Ministère chargé de la Recherche) et dispose d'un délai de 60 jours à partir la date d'enregistrement pour faire connaître son avis. Le but de cette expertise est de vérifier si le classement de l'OGM est correct et si les locaux sont bien adaptés aux risques présentés par l'OGM. Pour la mener à

bien, la Commission peut demander à avoir un entretien avec le demandeur pour compléter certaines informations et/ou envoyer un ou plusieurs de ses membres visiter les installations. En outre, la Commission se doit de garder confidentielles toutes les informations des dossiers.

Suite à cette expertise, la Commission de Génie Génétique indique un classement de risque (qui peut ou non correspondre au classement proposé par le rédacteur de la demande) et les niveaux de confinement adaptés aux circonstances, ainsi que la durée de l'agrément.

Il est possible que le niveau de confinement soit différent du classement de l'OGM en question. Le niveau de confinement peut être différent selon les étapes d'obtention et d'utilisation. Certaines étapes mettant en jeu un OGM de groupe I peuvent avoir des niveaux de confinement différents (par exemple L1 et L2) mais même si il est fait mention d'un confinement L2, cela ne signifie pas que l'agrément est valable pour des OGM de groupe II.

Ainsi, la Commission de Génie Génétique émet un avis (dossier conforme ou non) qu'elle transmet à la fois au Ministre chargé de l'Environnement et au Ministre chargé de la Recherche.

Le Ministre chargé de l'Environnement peut faire opposition à une demande d'agrément et dispose pour cela d'un délai de 14 jours (il peut faire connaître son avis, favorable ou non, avant la fin de ce délai afin d'accélérer le processus). Son silence vaut pour acceptation. Il est à noter, qu'à ce jour, le Ministre ne s'est jamais opposé à un agrément [29].

C'est au Ministre chargé de la Recherche, muni de l'avis de la Commission de Génie Génétique et du Ministre chargé de l'Environnement, de prendre la décision de donner ou de refuser l'agrément (avant l'expiration du délai de 90 jours).

Remarque : dans le cas de la première utilisation d'OGM de classes 3 et 4, une formalité se rajoute : le demandeur doit mettre à disposition du public un dossier d'information. Ce dossier doit être déposé à la mairie de la commune d'implantation de l'installation. Il doit comporter diverses informations telles que des informations générales sur l'activité de l'installation (type de recherches en cours par exemple), sur la finalité des recherches concernées, sur le type d'OGM utilisés (classement) et sur les mesures de confinement mises en œuvre.

2.3.3. La notification de l'agrément

L'exploitant doit attendre la réponse écrite (ou notification) du Ministre chargé de la Recherche avant d'entreprendre l'utilisation d'OGM pour laquelle il a demandé l'agrément. Si cette réponse est positive, l'exploitant reçoit une décision portant agrément pour une durée de validité indiquée (en général 5 ans). Si la réponse est négative, le Ministre doit expliquer sa décision. Il ne faut pas oublier que l'agrément n'est accordée que si l'installation est en conformité avec le classement proposé par la Commission de Génie Génétique.

Une fois la notification reçue, il est important de conserver ce document et de noter le numéro attribué par la Commission de Génie Génétique ainsi que la date de la décision. Ces renseignements devront être mentionnés dans toutes les correspondances ultérieures adressées à la Commission de Génie Génétique (demande de renseignements, compléments d'informations, renouvellement d'agrément ...).

3. Le renouvellement d'agrément

3.1. Les conditions du renouvellement d'agrément

Deux conditions sont nécessaires pour faire une demande de renouvellement d'agrément.

Tout d'abord, le laboratoire en faisant la demande doit déjà avoir obtenu un premier agrément pour le même groupe d'OGM. Si il y a changement de groupe d'OGM, une première demande d'agrément pour le groupe en question doit être faite.

La deuxième condition dépend de la situation :

- la durée de l'agrément précédent arrive à expiration ;
- l'agrément a été demandé il y a trois ans et la notification a été faite mais depuis aucune utilisation agréée n'a été entreprise ;
- il y a eu interruption de l'utilisation agréée pendant au moins deux ans ;
- il y a changement de groupe d'OGM, que ce soit I puis II ou II puis I ;
- un nouveau projet doit être entrepris mais il n'y a aucun rapport de cohérence avec les projets de la demande de cohérence ;
- des modifications de structure de l'installation sont prévues ;
- dans le cas des OGM de groupe II, des modifications de protocole ou de nouvelles connaissances peuvent entraîner une aggravation du risque, avérée ou supposée.

3.2. La procédure de renouvellement d'agrément

Le dossier à renseigner sera le même que lors d'une première demande (c'est-à-dire document Cerfa n° 11674*01 pour le groupe I - voir Annexe 4 - ou document Cerfa n° 11675*01 pour le groupe II - voir Annexe 5), mais il est nécessaire d'y mentionner le numéro de l'agrément précédent (ce numéro est celui donné suite à la notification de l'agrément).

Le seul changement au niveau de la procédure est le raccourcissement du délai de décision de 90 jours à 60 jours : la Commission de Génie Génétique ne dispose que de 45 jours pour émettre un avis et le Ministre chargé de l'Environnement doit faire connaître son opposition dans un délai maximal de 8 jours. De plus, si aucune réponse ne parvient dans le délai imparti de 60 jours, le renouvellement de l'agrément sera considéré comme acquis : l'agrément est donc tacite. Mais en cas de refus, cette décision doit être motivée.

4. Modifications d'un projet déjà agréé

Nous avons donc vu précédemment que un agrément est donné pour une combinaison précise d'éléments, tout changement doit être signalé selon une démarche précise.

Différents cas sont possibles : le passage d'un groupe d'OGM à un autre, les modifications dans le cas de chaque groupe d'OGM.

4.1. Passage d'un groupe à un autre

Comme l'agrément est donné pour un groupe d'OGM et seulement un, tout changement de groupe entraîne une nouvelle demande d'agrément.

C'est pour cette raison qu'il est conseillé lorsque des manipulations requièrent un agrément pour le groupe II de faire également une demande pour le groupe I car il est possible que les manipulations intermédiaires fassent appel à des OGM de groupe I [24].

4.2. Modifications de l'agrément dans le cas du groupe I

Dans le cas de l'agrément pour le groupe I, l'exploitant du laboratoire se doit de tenir un ou plusieurs registres chronologiques, reliés et paraphés. Cela doit être fait sans blanc, ni rature, ni surcharge. Dans ce ou ces registres doivent être consignés toute modification ou tout incident survenus au cours du projet [24].

Ces registres doivent également être présentés aux agents en cas de contrôle de l'installation.

4.3. Modifications de l'agrément dans le cas du groupe II

Différents cas se présentent et selon le cas, des démarches particulières doivent être suivies.

Préalablement à toute modification envisagée, telle que un changement de classes de risque de l'OGM (c'est-à-dire classes 2, 3 ou 4), un changement d'insert de vecteur ou d'hôte, un changement de technique ou encore un changement de directeur des travaux, l'exploitant se doit d'en informer par lettre le Ministre chargé de la Recherche.

De plus, l'exploitant doit compléter le dossier de demande d'agrément fourni au Ministre chargé de la Recherche dans deux cas :

- chaque fois qu'un nouveau projet est envisagé dans l'installation à condition que ce projet présente une cohérence thématique avec l'utilisation agréée
- chaque fois que la mise en œuvre d'un nouvel ensemble d'OGM (de même niveau de risque que ceux décrits dans la demande d'agrément) est envisagée dans le cadre d'un projet inclus dans une utilisation déjà agréée.

En cas de modification de la structure des locaux, il faut procéder à une nouvelle demande d'agrément.

Cette disposition est également valable quand des changements de protocoles expérimentaux ou des nouvelles connaissances conduisent à une aggravation du risque, c'est-à-dire une augmentation de la classe de risque. Ces deux derniers cas sont compréhensibles car il y a un risque de non-concordance des mesures de confinement (donc de protection) avec le niveau de risque.

La mise en place d'une animalerie pour animaux transgéniques requiert à la fois le respect rigoureux de mesures techniques de confinement et l'obtention d'un agrément administratif spécifique préalable.

CONCLUSION

Les animaux transgéniques sont en passe de devenir indispensables à toute recherche scientifique dans le domaine de la biologie, mais leur utilisation requiert le respect de règles pour assurer la validité des résultats obtenus et la considération des principes d'éthique en matière d'expérimentation animale : le statut sanitaire et son maintien, le fond génétique et le bien-être.

Pour la qualité du statut sanitaire des animaux hébergés, certaines règles doivent être respectées tels que la quarantaine et l'éventuelle redétermination des lignées acquises, la désinfection des pièces d'hébergement et le suivi sanitaire des colonies en utilisant par exemple des animaux « sentinelles ». Du point de vue de la génétique, le maintien des lignées peut nécessiter des croisements entre différentes souches, mais ceux-ci doivent être réfléchis et correctement réalisés. En ce qui concerne le bien-être de ces animaux, l'observation de ces animaux doit être faite régulièrement par des personnes compétentes.

Au delà de la législation relative à l'expérimentation animale, en tant qu'organisme génétiquement modifiés, l'utilisation d'animaux transgéniques à des fins de recherche est subordonnée au respect d'une législation relativement récente au niveau européen et français.

En fournissant un cadre juridique à ces nouvelles techniques à fort potentiel, la réglementation en matière d'OGM s'est révélée fort utile, d'autant plus qu'encore à l'heure actuelle tous les risques n'ont pas été identifiés (particulièrement ceux à long terme). Le champ d'application de cette réglementation est vaste, notamment dans les pays de l'Union Européenne (dont la France) ayant choisi de transposer la directive européenne à tous les organismes (et non pas seulement les micro-organismes).

Selon le secteur d'activité, les différentes obligations doivent être suivies et conduisent à la délivrance d'un agrément nécessaire avant de débiter toute expérience mettant en jeu des OGM : élaboration du dossier de demande d'agrément et conformité des locaux aux prescriptions techniques.

Ainsi, la mise en place d'une animalerie pour animaux transgéniques requiert à la fois le respect rigoureux de mesures techniques de confinement et l'obtention d'un agrément administratif spécifique préalable.

TEXTES LEGISLATIFS

TEXTES LEGISLATIFS

Législation européenne

1. CONSEIL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Recommandation du Conseil 82/472/CEE du 30 juin 1982 concernant l'enregistrement des travaux relatifs à l'acide désoxyribonucléique (ADN) recombinant, JOCE N° L 213 du 21 juillet 1982, 15-17
2. CONSEIL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Directive 86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, JOCE N° L 358 du 18 décembre 1986, 1-28
3. CONSEIL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Directive du Conseil 90/219/CEE du 23 avril 1990 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés, JOCE N° L 117 du 8 mai 1990, 1-14
4. CONSEIL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Directive du Conseil 90/220/CEE du 23 avril 1990 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, JOCE N° L 117 du 8 mai 1990, 15-27
5. CONSEIL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Directive du Conseil 90/679/CEE du 26 novembre 1990 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (septième directive particulière au sens de l'article 16 paragraphe 1 de la directive 89/391/CEE), JOCE N° L 374 du 31 décembre 1990, 1-12
6. COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Directive 94/15/CE de la Commission du 15 avril 1994 adaptant au progrès technique la directive adaptant pour la première fois, la directive 90/220/CEE du Conseil relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, JOCE N° L 103 du 22 avril 1994, 20-27
7. COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Directive 97/35/CE de la Commission du 18 juin 1997 portant deuxième adaptation au progrès technique de la directive 90/220/CEE du Conseil relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, JOCE N° L 169 du 27 juin 1997, 72-73
8. COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Directive 97/59/CE de la Commission du 7 octobre 1997 portant adaptation au progrès technique de la directive 90/679/CEE du Conseil concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (septième directive particulière au sens de l'article 16 paragraphe 1 de la directive 89/391/CEE), JOCE N° L 282 du 15 octobre 1997, 33-35

9. CONSEIL DE L'UNION EUROPEENNE, Directive 98/81/CE du Conseil du 26 octobre 1998 modifiant la directive 90/219/CEE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés, JOCE N° L 330 du 5 décembre 1998, 13-31
10. COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Décision de la Commission 2000/608/CE du 27 septembre 2000 relative aux notes explicatives concernant l'évaluation des risques visée à l'annexe III de la directive 90/219/CEE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés, JOCE N° L 258 du 12 octobre 2000, 43-48
11. CONSEIL DE L'UNION EUROPEENNE, Décision du Conseil 2001/204/CE du 8 mars 2001 complétant la directive 90/219/CEE en ce qui concerne les critères permettant d'établir l'innocuité pour la santé humaine et l'environnement de types de micro-organismes génétiquement modifiés, JOCE N° L 73 du 15 mars 2001, 32-34

Législation française

12. MINISTERE DE L'AGRICULTURE, Décret n° 87-848 du 19 octobre 1987 pris pour application de l'article 454 du code pénal et du troisième alinéa de l'article 276 du code rural et relatif aux expériences pratiquées sur les animaux, JORF du 20 octobre 1987, 12245-12248
13. MINISTERE DE L'AGRICULTURE, Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions de fourniture aux laboratoires agréés des animaux utilisés à des fins de recherches scientifiques ou expérimentales, JORF du 27 avril 1988, 5607
14. MINISTERE DE L'AGRICULTURE, Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution des l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux, JORF du 27 avril 1988, 5608
15. MINISTERE DE L'AGRICULTURE, Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements d'expérimentation animale, JORF du 27 avril 1988, 5608-5610
16. MINISTERE DE LA RECHERCHE ET DE LA TECHNOLOGIE, Décret n° 89-306 du 11 mai 1989 portant création d'une commission de génie génétique, JORF du 13 mai 1989, 6088-6089
17. GOUVERNEMENT, Loi n° 92-654 du 13 juillet 1992 relative au contrôle de l'utilisation et de la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés et modifiant la loi n° 76-663 du 19 juillet 1976 relative aux installations classées pour la protection de l'environnement, JORF du 16 juillet 1992, 9523-9527
18. GOUVERNEMENT DE LA REPUBLIQUE FRANCAISE, Loi n°92-1476 du 31 Décembre 1992, LOI de finances rectificative pour 1992, JORF du 5 janvier 1993, page 2-10

19. MINISTERE DE LA RECHERCHE ET DE L'ESPACE, Décret n° 93-75 du 18 janvier 1993 modifiant le décret n° 89-306 du 11 mai 1989 portant création d'une commission de génie génétique, JORF du 20 janvier 1993, 1008-1009
20. MINISTERE DE LA RECHERCHE ET DE LA TECHNOLOGIE, Décret n° 93-773 du 27 mars 1993 pris pour application s'agissant des utilisations civiles de l'article 6 de la loi n° 92-654 du 13 juillet 1992 relative au contrôle de l'utilisation et de la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés et modifiant la loi n° 76-663 du 19 juillet 1976 relative aux installations classées pour la protection de l'environnement, JORF du 30 mars 1993, 5712-5714
21. MINISTERE DE LA RECHERCHE ET DE LA TECHNOLOGIE, Décret n° 93-774 du 27 mars 1993 fixant la liste des techniques de modification génétique et les critères de classement des organismes génétiquement modifiés, JORF du 30 mars 1993, 5714-5715
22. MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE, Décret n° 94-527 du 21 juin 1994 modifiant le décret n° 93-774 du 27 mars 1993 fixant la liste des techniques de modification génétique et les critères de classement des organismes génétiquement modifiés, JORF du 28 juin 1994, 9336-9337
23. MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT ET DE LA RECHERCHE, Arrêté du 27 décembre 1994 relatif au dossier de demande d'agrément prévu au titre Ier du décret n) 93-773 du 27 mars 1993, JORF du 15 janvier 1995, 786-789
24. MINISTERE DE LA RECHERCHE ET DE LA TECHNOLOGIE, Circulaire du 16 avril 1996 relative aux utilisations confinées d'organismes génétiquement modifiés à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement, JORF du 2 juin 1996, 8167-8173
25. MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE, Décret n° 95-487 du 28 avril 1995 pris pour application, s'agissant d'organismes génétiquement modifiés, du titre III de la loi n) 92-654 du 13 juillet 1992 relative au contrôle de l'utilisation et de la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés et modifiant la loi n° 76-663 du 19 juillet 1976 relative aux installations classées pour la protection de l'environnement, JORF du 30 avril 1995, 6766-6768
26. MINISTERE DU TRAVAIL ET DES AFFAIRES SOCIALES, Arrêté du 13 août 1996 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les industries et les laboratoires de recherche et d'enseignement où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes, JORF du 7 septembre 1996, 13379-13382
27. MINISTERE DE LA RECHERCHE, Arrêté du 17 avril 2000 portant nomination à la commission de génie génétique, JORF du 22 avril 2000, 6172
28. MINISTERE DE LA RECHERCHE, Arrêté du 3 juillet 2000 portant nomination à la commission de génie génétique, JORF du 12 juillet 2000, 10602
29. MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE, Décret n° 2001-464 du 29 mai 2001 modifiant le décret n° 87-848 du 19 octobre 1987 pris pour application de

l'article 454 du code pénal et du troisième alinéa de l'article 276 du code rural et relatif aux expériences pratiquées sur les animaux, JORF du 31 mai 2001, 8682-8685

- 30.** MINISTERE DES AFFAIRES ETRANGERES, Décret no 2001-486 du 6 juin 2001 portant publication de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, adoptée à Strasbourg le 18 mars 1986 et signée par la France le 2 septembre 1987, JORF du 8 Juin 2001, page 9094-9120
- 31.** CODE RURAL, Articles 283-1 et 283-2, In : Code rural - Code forestier, 1999, Ed. Dalloz, 2422 p.
- 32.** CODE PENAL, Articles 511-1 et 511-2, In : Code pénal, 2000, Ed. Dalloz, 1968 p.

BIBLIOGRAPHIE

1. AALAS (The American Association for Laboratory Animal Science), Health Care of Genetically Altered Animals, *Comparative Medicine*, 2000, **50** (5), 482
2. ACADEMIE DE MONTPELLIER. (Page consultée le 2 novembre 2001). Site pédagogique de l'Académie de Montpellier - 99 réponses sur l'Union Européenne [en ligne]. Adresse URL : <http://www.ac-montpellier.fr/ressources/99/99UEaccueil.html>
3. AFNOR, Biotechnologies - Liste des espèces microbiennes communément reconnues comme pathogènes pour l'homme, Norme NF X 42-040, Paris, La Défense, 1990
4. ANAGNOSTOPOULOS, A.V., TBASE : The Relationalized Database of Transgenic Animals and Targeted Mutations, In : HOUDEBINE, L.M., *Transgenic Animals. Generation and Use*, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 533-552
5. AVERY, O.T., MCLEOD, C.M., MCCARTY, M., Induction of transformation by a desoxyribinucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, 1944, **79**, 137-158
6. BABINET, C., COHEN-TANNOUDJI, M., Vingt ans d'interventions délibérées sur le génome de la souris, *médecine/sciences*, 2000, 16 (1), 31-42
7. BACHELLERIE, R., Nouvelles directives européennes et mise sur le marché des viandes de gibier, Thèse de doctorat vétérinaire, 2000, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 173 p.
8. BAKER, D.G., Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats and Rabbits and their Effects on Research, *Clinical Microbiological Review*, 1998, **11** (2), 231-236
9. BEARDMORE, J.A., Transgenics, autotransgenics, and allotransgenics, *Transgenics Research*, 1997, **6**, 107-108
10. BEN MEPHAM, T., COMBES, R.D., BALLS, M., BARBIERI, O., BLOKHUIS, H.J., COSTA, P., CRILLY, R.E., DE COCK BUNING, T., DELPIRE, V.C., O'HARE, M.J., HOUDEBINE, L.M., VAN KREIJL, C.F., VAN DER MEER, M., REINHARDT, C.A., WOLFE, E., VAN ZELLER, A-M., The use of transgenic animals in the European Union : The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 28, *ATLA*, 1998, **26**, 21-43
11. BERLANGA, J., INFANTE, J., CAPO, V., DELAFUENTE, J., CASTRO, F.O., Characterisation of transgenic mice lineages. 1. overexpression of hGH causes the formation of liver intranuclear pseudoinclusion bodies and renal and hepatic injury, *Acta Biotechnologica*, 1993, **13**, 361-371
12. BIOTECHNOLOGY AND THE EUROPEAN PUBLIC CONCERTED ACTION, Europe ambivalent on biotechnology, *Nature*, 1997, **387**, 845-847
13. BISHOP, J.O., Chromosomal Insertion of Foreign DNA, In : HOUDEBINE, L.M., *Transgenic Animals. Generation and Use*, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 219-224

14. BONNOD, J., Ethique en expérimentation animale, *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1992, **17**, 201-205
15. BOYD GROUP. Genetic engineering : animal welfare and ethics, September 1999. (Page consultée le 03/08/01). Available from the World Wide Web : <http://boyd-group.demon.co.uk/genmod.htm>
16. BRADLEY, A. EVANS, M., KAUFMAN, M.H., ROBERTSON, E., Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines, *Nature*, 1984, **309**, 255-256
17. BREM, G., WANKE, R., Phenotypic and patho-morphological characteristics in a halfsib-family of transgenic mice carrying foreign MT-hCG genes, In : Beynen A C and Solleved HA (eds), *New Developments in Biosciences : Their Implications for Laboratory Animal Science*, 1988, 93-98, Martinus Nijhoff : Dordrecht
18. BRINSTER, R.L., The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development, *J. Exp. Med.*, 1974, **140**, 1049-1056
19. BRINSTER, R.L., ALLEN, J.M., BEHRINGER, R.R., GELINAS, R.E., PALMITER, R.D., Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 836-840
20. BRINSTER, R.L., CHEN, H.Y., TRUMBAUER, M.E., YAGLE, M.K., Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by micro-injecting eggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 4438-4442
21. CAPECCHI, M.R., Altering the genome by homologous recombination, *Science*, 1989, **244**, 1288-1292
22. CARVALLO, D., CANARD, G., TUCKER, D., Standardization of Transgenic Lines : from Founder to an Established Animal Model, In : HOUDEBINE, L.M., *Transgenic Animals. Generation and Use*, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 403-409
23. CECCALDI, P., MILLET, A., Xénogreffe et transgénèse, *Biofutur*, 1996, **158**, 17-25
24. CHADA, K. MAGRAM, J., RAPHAEL, K., RADICE, G., LACY, E., COSTANTINI, F., Specific expression of a foreign beta-globin gene in erythroid cells of transgenic mice, *Nature*, 1985, **314**, 377-380
25. CHARLES RIVER LABORATORIES, *Transgenic Animal Science : Principle and Methods*. (Page consultée le 25 septembre 2001). Available from the World Wide Web : <http://www.criver.com/techdocs/transgen.html>
26. CHEN, T.T., POWERS, D.A., Transgenic fish, *Trends in Biotechnology*, 1990, **8**, 209-215
27. CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) [en ligne]. (Page consultée le 21 août 2001). Département des Sciences de la vie. Adresse URL : <http://www.cnrs.fr/SDV>

28. COMMISSION DE GENIE GENETIQUE, Principes de classement et guide officiels de la Commission de Génie Génétique, Avril 2000, 227 p., Available from the World Wide Web : <http://www.recherche.gouv.fr/commis/genetique/>
29. COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, Rapport de la Commission élaboré à partir à partir des rapports des Etats membres sur l'expérience tirée de l'application de la Directive 90/219/CEE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés - Période 1996-1999 - COM (2001) 263 final, 29 pages, Available from the World Wide Web : http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/rpt/2001/com2001_0263fr01.pdf
30. COMMITTEE ON TRANSGENIC NOMENCLATURE (NRC), Standardized Nomenclature for Transgenic Animals, *ILAR News*, 1992, **34** (4), 45-52
31. CONSEIL DE L'EUROPE, Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, Strasbourg, France, 18/03/1986, Available from the World Wide Web : <http://conventions.coe.int/Treaty/FR/Treaties/Html/123.htm>
32. CONTRERA, J.F., Transgenic Animals : Refining the Two-Year Rodent Carcinogenicity Study, *Lab Animal*, 1998, **27** (2), 30-33
33. COZZI, E., WHITE, D.J.G., The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans, *Nature Medicine*, 1995 (September), **1** (9), 964-966
34. CREPIN, M., Expression des gènes et génie génétique, Herman, Paris, France, 1987, 305 p.
35. DE FELIPE, C., HERRERO, J.F., O'BRIEN, J.A., PALMER, J.A., DOYLE, C.A., SMITH, A.J.H., LAIRD, J.M.A., BELMONTE, C., CERVERO, F., HUNT, S.P., Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P, *Nature*, 1998, **392**, 394-397
36. DEGRYSE, A-D., DENAIS, D., How will International Standards Drive U.S. Regulations : The Council of Europe, the European Union and Animal Welfare, SCAW (Scientists Center for Animal Welfare) Winter Conference, 10-12 décembre 2001, communication personnelle
37. DETOLLA, L.J., STUMP, K.C., ALLEN, E.D., Transgenic Animal Care and Treatment, *Lab Animal*, 1994, 24-25
38. DONAS, B., Conception et réalisation d'animaleries d'expérimentation animale en accord avec les législations et réglementations actuellement en vigueur, Thèse de doctorat vétérinaire, 1992, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 180 p.
39. DURFEE, W.J., FAITH, R.E., Biological Security : Quarantine and Testing Policies for Protecting Transgenic Colonies, *Lab Animal*, 1999, **28** (2), 45-48
40. ELOIT, M., Principes de la réglementation française en matière d'expérimentation animale, *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1992, **17**, 151-154

41. EVANS, M.J., KAUFMAN, M.H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 1981, **292**, 154-156
42. FAZIO, S., LINTON, M.R., Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis, *Frontiers in Bioscience*, 2001, **6**, 515-525
43. FELASA Working Group on Animal Health, Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies, *Laboratory Animals*, 1994, **28**, 1-12
44. FELASA Working Group on Animal Health, FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guineapig and rabbit experimental units, *Laboratory Animals*, 1996, **30**, 193-208
45. FLECHON, J.-E., What are ES cells ?, In : HOUDEBINE, L.M., Transgenic Animals. Generation and Use, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 157-166
46. FLORENCE, G., DAVOUST, B., BONI, M., DEMONCHAUX, J.-P., FALCY, C., MILHAUD, C., DOUCET, J., Ethique et expérimentation animale dans les organismes de recherche dépendant du Ministère de la Défense, *Sci. Tech. Anim. Lab.* (2001), **24**, 95-103
47. GAGNE, M., POTHIER, F., SIRARD, M.A., Gene Micro-injection into Bovine Pronuclei, In : HOUDEBINE, L.M., Transgenic Animals. Generation and Use, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 27-36
48. GIRCOR (Groupe interprofessionnel de réflexion et de communication sur la recherche). (Page consultée le 15 novembre 2001). Site du GIRCOR - FAQ, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.gircor.net/faq/default.htm>
49. GIRCOR (Groupe interprofessionnel de réflexion et de communication sur la recherche). (Page consultée le 17 octobre 2001). Site du GIRCOR - La Connaissance par les gènes, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.gircor.net/gene/default.htm>
50. GORDON, J.W., Transgenic Technology and Laboratory Animal Science, *ILAR Journal*, 1997, **38** (1), 32-41
51. GORDON, J.W., RUDDLE, F.H., Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei, *Science*, 1981, **214**, 1244-1246
52. GORDON, J.W., SCANGOS G.A., PLOTKIN, D.J., BARBOSA, J.A., RUDDLE, F.H., Genetic transformation of mouse embryos by micro-injection of purified DNA, *PNAS USA*, 1980, **77**, 7380-84
53. GROUPE DE TRAVAIL FELASA SUR LA SANTE ANIMALE, Recommandations relatives au contrôle sanitaire des élevages de souris, rats, hamsters, cobayes et lapins, *Sci Tech Anim Lab*, 1993, **18**, 141-163
54. GV-SOLAS Working Group on Hygiene (NICKLAS, W.), Implications of infectious agents on results of animal experiments, *Laboratory Animals*, 1999, **33** (suppl. 1), S1:39-S1:87

55. HAMMER, R.E., PURSEL, V.G., REXROAD, C.E., WALL, R.J., BOLT, D.J., EBERT, K.M., PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L., Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by micro-injection, *Nature*, 1985, **315**, 680-3
56. HARKNESS, J.E., WAGNER, J.E., *Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*, 3rd edition, London : Lea and Febiger, 1983
57. HOUDEBINE, L.M., Ethical implications of knock-out and transgenic techniques for animal research, In : *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences, vol. 13)*, 1999, Elsevier Science BV, Ed : CRUSIO, W.E., GERLAI, R.T., 936-948
58. HOUDEBINE, L.M., *Les animaux transgéniques*, 1^{ère} édition, 1998. Paris : Tec&Doc Lavoisier, 181 p.
59. HOUDEBINE, L.M., The Biosafety Problems of Transgenic Animals, 559-562, In : HOUDEBINE, L.M., *Transgenic Animals : Generation and Use*
60. HUBRECHT, R., Genetically modified animals, welfare and UK legislation, *Animal Welfare*, 1994, **4**, 163-170
61. IRWIN, M.H., MOFFATT, R.J., PINKERT, C.A., Identification of transgenic mice by PCR analysis of saliva, *Nat Biotechnol*, 1996, **14**(9), 1146-1148
62. JACKSON LABORATORY. (Page consultée le 6 septembre 2001). Site de la base de données TBASE, [en ligne]. Adresse URL : <http://tbase.jax.org/>
63. JACKSON LABORATORY. (Page consultée le 6 septembre 2001). Site de la base de données IMR, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.jax.org/resources/documents/imr/>
64. JAENISCH, R., Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney Leukemia virus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, **73** (4), 1260-1264
65. JAENISCH, R., Transgenic Animals, *Science*, 1988, **240**, 1468-1474
66. JAENISCH, R., MINTZ, B., Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice from preimplantation blastocysts injected with viral DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, **71** (4), 1250-1254
67. JALLAT, S., Les souris transgéniques, *Biofutur*, Juin 1991, **45**, 3-11
68. JANNE, J., ALHONEN, L., Transgenic animals : practical aspects, management, logistics, In : *Proceedings of the Sixth Symposium of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations, Harmonization of Laboratory Animal Husbandry*, Basel, Switzerland, 19-21 June 1996, London : The Royal Society of Medicine Press Limited, 41-44.
69. JENNINGS, M., BATCHELOR, G.R., BRAIN, P.F., DICK, A., ELLIOTT, H., FRANCIS, R.J., HUBRECHT, R.C., HURST, J.L., MORTON, D.B., PETERS, A.G., RAYMOND, R., SALES G.D., SHERWIN, C.M., WEST, C., Refining rodent

- husbandry : the mouse, Report of the Rodent Refinement Working Party, *Laboratory Animals*, 1998, **32**, 233-259
70. KERNBAUM, S., Dictionnaire de Médecine, Ed Médecine-Sciences , 6^{ème} édition, Flammarion, Paris, 1998.
 71. KRULEWSKI, T.F., NEUMANN, P.E., GORDON, J.W., Insertional mutation in a transgenic mouse allelic with Purkinje cell degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**(10), 3709-3712
 72. LAINE, J., SIMONS, J., Expérimentation et animaux transgéniques : état actuel de la réglementation française, *Sci Tech Anim Lab*, 1996, **21**, 53-60
 73. LAKE, J.P., HAINES, D., LINDER, C., DAVISSON, M., Dollars and Sense : Time and Cost factors critical to establishing genetically engineered mouse colonies, *Lab. Animal*, 1999, **28** (8), 24-31
 74. LAVITRANO, M., CAMAIONI, A., FAZIO, V.M., DOLCI, S., FARACE, M.G., SPADAFORA, C., Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice, *Cell*, 1989, **57**(5), 717-723
 75. LINDER, C.C., The Influence of Genetic Background on Spontaneous and Genetically Engineered Mouse Models of Complex Diseases, *Lab Animal*, 2001, **30** (5) 34-39
 76. MAC LAREN, A., Cloning : Pathways to a Pluripotent Future, *Science*, 2000, **288**, 1775-1780
 77. MAHOUY, G., Le concept de barrières physiques dans les contrôles de l'environnement microbien à l'intérieur des unités animales, *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1978, **3** (1) 7-18
 78. MARTI, S., Hébergement des animaux transgéniques de classe A1, *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 2001, **24**, 81-83
 79. MARTIN, G.R., Isolation of a pluripotent cell-line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**(12), 7634-7638
 80. MC CREATH K.J., HOWCROFT, J., CAMPBELL, K.H.S., COLMAN, A., SCHNIEKE, A.E., KIND, A.J., Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells, *Nature*, 2000, **405**, 1066-1069
 81. MILLER, M.W., RUBIN, E.M., Transgenic Animals in Atherosclerosis Research, In : HOUEBINE, L.M., Transgenic Animals. Generation and Use, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 445-448
 82. MINISTERE DE LA RECHERCHE, Les enjeux des recherche sur les OGM, Juillet 2001, 32 pages, available from the World Wide Web : <http://www.recherche.gouv.fr/brochure/enjogm.pdf>
 83. MINTZ, B., ILLMENSEE, K., Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, **72**, 3585-3589.

84. MOGIL, J.S., GRISEL, J.E., Transgenic studies of pain, *Pain*, 1998, **77**, 107-128
85. MONASTERCKY, G.M., GEISTFELD, J.G., The Production and Verification of Transgenic Mouse Strain, *Lab Animal*, 1997, 36-40
86. MONNEREAU, L., Cours de Biologie du Développement, 2^{ème} année de 1^{er} cycle, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 1997, Communication personnelle
87. MORANGE, M., Le concept de gène, *Biofutur*, 2000, **206**, 24-25
88. MORELL, J.M., Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice, *Laboratory Animals*, 1999, **33**, 201-206
89. MUIR, W.M., HOWARD, R.D., Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success : Sexual selection and the Trojan gene hypothesis, *PNAS USA*, 1999, **96**(24), 13853-13856
90. MYHR, B.C., Validation studies with Muta Mouse : a transgenic mouse model for detecting mutations in vivo, *Environ. Mol. Mutagen.*, 1991, **18** (4), 308-315
91. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Infectious Disease of Mice and Rats, National Academy Press, Washington D.C., U.S.A., 1991, 397 p.
92. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington D.C., U.S.A., 1996, 115 p.
93. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Occupational Health and Safety in the Care and Use of Research Animals, National Academy Press, Washington D.C., USA, 1997, 154 p.
94. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Guide pour les Soins et l'Utilisation des Animaux de Laboratoire, National Academy Press, Washington D.C., U.S.A., 2000, 115 p.
95. NICKLAS, W., Health care of transgenic animals, In : Proceedings of the Sixth Symposium of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations, Harmonization of Laboratory Animal Husbandry, Basel, Switzerland, 19-21 June 1996, London : The Royal Society of Medicine Press Limited, 45-49.
96. PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L., HAMMER, R.E., TRUMBAUER, M.E., ROSENFELD, M.G., BIRNBERG, N.C., EVANS, R.M., Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes, *Nature*, 1982, **300**, 611-615
97. PERROT, A., RICHARD, Y., VEILLET, F., Progrès réalisés depuis 20 ans dans le domaine du contrôle sanitaire des rongeurs de laboratoire : incidence positive pour la qualité des expérimentations, *Sci Tech Anim Lab*, 1993, **18**, 167-178
98. PETERSON, K.R., CLEGG, C.H., LI, Q., STAMATOYANNOPOULOS, G., Production of transgenic mice with yeast artificial chromosomes, *Trends in Genetics*, 1997, **13**(2), 61-66

99. PICAUVET, D., Cours de législation de 3^{ème} année de 2nd cycle, 1999-2000, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Communication personnelle
100. PINKERT, C.A., The History and Theory of Transgenic Animals, *Lab Animal*, 1997, 29-34
101. POOLE, T.B., Welfare considerations with regard to transgenic animals, *Animal Welfare*, 1995, **4**, 81-85
102. RAMIREZ-SOLIS, R., LUI, P., BRADLEY, A., Chromosome engineering in mice, *Nature*, 1995, **378**, 720-724
103. REN, S., LI, M., CAI, H., HUDGINS, S., FURTH, P.A., A Simplified Method to Prepare PCR Template DNA for Screening of Transgenic and Knockout Mice, *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 2001, **40** (2), 27-30
104. RICHA, J., LO, C.W., Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected chromosome fragments, *Science*, 1989, **245**, 175-177
105. RONFORT, C., LEGRAS, C., VERDIER, G., The use of retroviral vectors for gene transfer into bird embryo, In : HOUDEBINE, L.M., *Transgenic Animals. Generation and Use*, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 83-94
106. ROSEWALL, I., Introduction to Using Transgenic Mice in Research, *LASA Good Practice Guidelines*, 2001, **2** (1), 1-4
107. ROTHS, J.B., FOXWORTH, W.B., MCARTHUR, M.J., MONTGOMERY, C.A., KIER, A.B., Spontaneous and Engineered Mutant Mice as Models for Experimental and Comparative Pathology : History, Comparison, and Developmental Technology, *Laboratory Animal Science*, 1999, **49** (1), 12-34
108. RUSSEL, W.M., BURCH, R.L., *The Principles of Humane Experimental Technique*, London : Methuen, 1959, 283 p.
109. SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N., Enzymatic amplification of β -Globin Genomic Sequences and restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, *Science*, 1985, **230**, 1350-1354
110. SAUER, B., HENDERSON, N., Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 5166-5170
111. SEBESTENY, A., MILITE, G., MARTELOSSI, P., Microbiologically monitored fumigation of a new built SPF laboratory rodent facility, *Laboratory Animals*, 1992, **26**, 132-139
112. SERVICE PUBLIC - le service électronique des formulaires. Les formulaires de demande d'agrément d'utilisation confinée d'OGM [on line]. (Page consultée le 20 juillet 2001). Site du Ministère de l'Éducation. Available from the World Wide Web : <http://www.education.gouv.fr/prat/formul/11674v01.htm>

113. SILLS, R.C., FRENCH, J.E., CUNNINGHAM, M.L., New models for assessing carcinogenesis : an ongoing process, *Toxicol. Lett.*, 2001, **120** (1-3), 187-98
114. SMITH, A.G., HOOPER, M.L., Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma et embryonic stem cells, *Dev Biol*, 1987, **121**(1), 1-9
115. SMITH, M.M., HARGADEN, M., Developing a Rodent Enrichment Program, *Lab Animal Europe*, 2001, **1**(8), 28-33
116. SMITH, M.W., Genetically modified (transgenic) animals, 93-106, In : WOOD, M., SMITH, M.W., Health and Safety in Laboratory Animal Facilities, Laboratory Animals Ltd, 1999, 249 p.
117. SMITHIES, O., GREGG, R.G., BOGGS, S.S., KORALEWSKI, M.A., KUCHERPALATI, R.S., Insertion of DNA sequences into the human chromosome beta-globin locus by homologous recombination, *Nature*, 1985, **317**, 230-234
118. STUHLMANN, H., CONE, R., MULLIGAN, R.C., JAENISCH, R., Introduction of a selectable gene into different animal tissues by a retrovirus recombinant vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 7151-7155
119. SZTEIN J.M., MCGREGOR, T.E., BEGIDIAN, H.J., MORBRAATEN, L.E., Transgenic mouse strain rescue by frozen Ovaries, *Laboratory Animal Science*, 1999, **49** (1), 99-100
120. THE MICROINJECTION WORKSHOP v2K1. (Page consultée le 16/08/01). Microinjection apparatus, available from the World Wide Web : <http://ourworld.compuserve.com/homepages/TheBroons/index.htm>
121. TOWNES, T.M., LINGREL, J.B., CHEN, H.Y., BRINSTER, R.L., PALMITER, R.D., Erythroid-specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice, *EMBO J*, 1985, **4**(7), 1715-1723
122. UNION EUROPEENNE. (page consultée le 10 septembre 2001). Site de de l'Union Européenne, [en ligne]. Adresse URL : http://europa.eu.int/index_fr.htm
123. VAN DE WEERD, H.A., BAUMANS, V., BLOM, H.J.M., VAN ZUPHTEN, L.F.M., Behavioural consequences of environmental enrichment in two strains of mice, In : Proceedings of the Fifth Symposium of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations, Welfare and Science, Brighton, U.K., 8-11 June 1993, London : The Royal Society of Medicine Press Limited, 49-53.
124. VAN DER MEER, M., BAUMANS, V., VAN ZUPHTEN, L.F.M., Use and welfare aspects of transgenic animals, In : Proceedings of the Sixth Symposium of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations, Harmonization of Laboratory Animal Husbandry, Basel, Switzerland, 19-21 June 1996, London : The Royal Society of Medicine Press Limited, 49-51.

125. VAN DER MEER, M., ROLLS, A., BAUMANS, V., OLIVIER, B., VAN ZUPHTEN, L.F.M., Use of score sheets for welfare assessment of transgenic mice, *Laboratory Animals*, 2001, **35** (4), 379-389
126. VAN GANSEN, P., *Biologie Générale*, 2^{ème} édition, Masson, Paris, France, 415 p.
127. VEILLET, F., Les agents infectieux d'actualité et leur dépistage chez les rongeurs de laboratoire, *Sci Tech Anim Lab*, 1998, **23**, 115-121
128. VERSCHUERE, B., AUTISSIER, C., DEGRYSE, A.D., GALLIX, P., GOTTI, B., LAURENT, J., LEINOT, M., PEYCLIT, I., Ethics committee recommendations for laboratory animals in private research in France, *Laboratory Animals*, 2000, **34**, 236-243
129. VIDAL, D.R., PAUCOUD, J-C., THIBAUT, F., ISOARD, P., Biosécurité au laboratoire - Risque biologique, normalisation et pratique, *Ann. Pharmaceutiques Françaises*, 1993, **51** (3), 154-166
130. WALL, R.J., KERR, D.E., BONDIOLI, K.R., Transgenic dairy cattle : genetic engineering on a large scale, *J. Dairy Sci*, 1997, **80** (9), 2213-24
131. WANG, Z.Q., KIEFER, F., URBANEK, P., WAGNER, E.F., Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection, *Mech Dev*, 1997, **62**(2), 137-145
132. WATSON, J.D., GILLMAN, M., WITKOWSKI, J., ZOLLER, M., The introduction of foreign genes into mice, In : *Recombinant DNA*, WATSON, J.D., GILLMAN, M., WITKOWSKI, J., ZOLLER, M., 1992, 255-272, 2nd edition.
133. WEYAND, M.E., Methods for individual identification of laboratory mice and rats, *Lab Animal*, 1998, **27** (10), 42-49
134. WIGHT, D.C., WAGNER, T.E., Transgenic mice : a decade of progress in technology and research, *Mutation Research*, 1994, **307**, 429-440
135. WILLIAMS, R.L., HILTON, D.J., PEASE, S., WILLSON, T.A., STEWART, C.L., GAERING, D.P., WAGNER, E.F., METCALF, D., NICOLA, N.A., GOUGH, N.M., Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells, *Nature*, 1988, **336**, 684-687
136. ZALTA, J.-P., La transgénèse : Maîtrise des risques, contraintes réglementaires, Les actes du colloque GIRCOR : Transgénèse, Paris, 29 mai 1997, *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1998, **23**, 179-188

ANNEXES

Annexe 1 : REGLES DE NOMENCLATURE POUR LA DENOMINATION DES ANIMAUX TRANSGENIQUES [30]

Même si les techniques de transgénèse sont de plus en plus utilisées conduisant ainsi à la création croissante de nouvelles lignées d'animaux, il n'existait pas encore de nomenclature standardisé pour les animaux transgéniques. L'exemple de ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources), organisation faisant partie du NRC (National Research Council) aux Etats-Unis qui a mis en place un système standardisé de nomenclature est un exemple à suivre dans ce domaine.

La base de ce type de dénomination d'un animal transgénique est simple et repose sur 3 parties, selon le modèle suivant :

TgX(YYYYYY)#####Zzz

Ce code est bien sûr précédé par la dénomination de l'animal chez lequel la manipulation génétique a été faite (souche de l'animal et fournisseur, le tout avec des abréviations standards).

La première partie comporte toujours les lettres « **Tg** » (signifiant « transgène ») et une lettre désignant le mode d'insertion de l'ADN :

- **N** dans le cas d'une insertion non homologue
- **R** dans celui d'une insertion via une infection par un vecteur rétroviral
- **H** dans le celui d'une recombinaison homologue

Exemples :

Des souris obtenues via l'infection d'embryons par des vecteurs du MuLV (Murine Leucomia Virus) seront désignées par les lettres **TgR**, alors que des souris obtenues par micro-injection ou électroporation d'ADN de MuLV dans des zygotes seront désignées par les lettres **TgN**. Des souris obtenues à partir de cellules ES par introduction d'ADN puis par recombinaison avec une séquence génomique homologue seront désignées par les lettres **TgH**.

La deuxième partie concerne la désignation de l'insert, c'est-à-dire les caractéristiques prédominantes du transgène. Cette partie est toujours entre parenthèses et ne contient pas plus de 8 caractères, soit uniquement des lettres, soit une combinaison de lettres et de chiffres. Il ne doit pas y avoir de lettre en italique, d'indice, d'exposant, d'espace ou de signe de ponctuation. Le choix de la désignation de l'insert est fait par l'investigateur mais il doit suivre les règles suivantes :

- les symboles courts (d'au plus 6 caractères) sont préférables. Le nombre total de caractères avec le numéro de laboratoire (voir plus loin) ne doit pas excéder 11 caractères.
- La désignation de l'insert doit identifier la séquence insérée ainsi que ces caractéristiques importantes. Si le transgène comporte des séquences d'un gène bien dénommé, il est préférable que la désignation comporte le symbole standard de ce gène (si le symbole du gène est trop long, seulement les lettres du début doivent être utilisées). Même si dans le symbole du gène il y a des tirets, ceux-ci ne doivent pas apparaître dans la désignation. Pour l'aide à la désignation, il existe différentes organisations, notamment The Jackson Laboratory ou ILAR aux Etats-Unis.
- Les symboles qui sont identiques aux noms d'autres gènes doivent être évités. Par exemple, il serait incorrect d'utiliser le symbole *Ins* pour désigner le terme « Insertion » car *Ins* est le symbole du gène de l'insuline.

- Une série d'animaux transgéniques produits avec la même construction d'ADN peuvent avoir la même désignation d'insert, sans que cela puisse pour autant être obligatoire car il est possible que certaines lignes aient des caractéristiques propres et uniques. Si il y a deux symboles différents utilisés pour la même construction d'ADN dans des lignées transgéniques différentes, les descriptions publiées doivent clairement préciser qu'il s'agit de la même construction. Deux constructions génétiques différentes utilisés en production d'animaux transgéniques, que ce soit dans le même laboratoire ou dans des laboratoires séparés, ne devraient pas être identifiés par le même code.
- Il est possible d'utiliser des abréviations standards dans la désignation. Si c'est la cas, cette abréviation doit être placée à la fin de la désignation. Cette liste d'abréviations est non exhaustive et d'autres abréviations peuvent être ajoutées et mis en place par des comités internationaux de nomenclature. La dénomination de l'insert devrait permettre l'identification de la séquence insérée et non sa location ou la phénotype en découlant.

Abréviation	Dénomination complète
An	anonymous sequence = séquence anonyme
Ge	genomic clone = clone génomique
Im	insertional mutation = mutation insertionnelle
Nc	noncoding sequence = séquence non codante
Rp	reporter sequence = séquence de type reporter
Sn	synthetic sequence = séquence synthétique
Et	enhancer trap construct = ?
Pt	promoter trap construct = ?

La troisième partie est constitué de deux parties : le numéro assigné par le laboratoire et le code du laboratoire.

Le numéro assigné par le laboratoire est un numéro unique donnée par le laboratoire à chaque insertion transmise de façon correcte à la lignée germinale (il y a eu confirmation par étude de la descendance). Il est possible d'utiliser au maximum 5 chiffres, mais le nombre total de chiffre de la désignation de l'insert et de ce numéro de doit pas excéder 11 chiffres. Deux lignées créées dans le même laboratoire ne devrait pas avoir le même numéro. Ce numéro est unique même si la séquence insérée est identique, la position d'insertion étant différente. Ce numéro peut avoir une signification au sein du laboratoire ou correspondre à un numéro d'ordre.

Le code du laboratoire est donné à chaque laboratoire produisant des animaux transgéniques. Un laboratoire qui s'est déjà vu attribuer un tel code précédemment doit l'utiliser à nouveau. Le registre de ces codes est suivi par ILAR. Ce code peut correspondre, par exemple à l'abréviation du nom de la personne responsable du laboratoire.

Exemple :

C57BL/6J-TgN(CD8Ge)23Jwg : le clone génomique (Ge) codant pour CD8 humain (CD8) est inséré dans l'ADN d'une souris de souche C57BL/6 (C57 BL6/N) provenant de Jackson Laboratories (J). Il s'agit de la 23^{ème} (23) souris « screenée » dans une série de microinjections réalisées au sein du laboratoire de Jon W. Gordon (Jwg).

Annexe 2 : COMPOSITION DE LA COMMISSION DE GENIE GENETIQUE

Les différents membres de la Commission de Génie Génétique sont [27] :

Sur proposition du ministre chargé de la recherche

Mr Gérard DEVAUCHELLE
Mr Louis-Marie HOUDEBINE
Mme Anne PETITJEAN
Mr Roland ROSSET

Sur proposition de la ministre chargée de l'environnement

Mr Yves BRYGOO
Mr Yves CHUPEAU
Mme Ariane TOUSSAINT
Mr Pascal SIMONET

Sur proposition de la ministre chargée de la santé

Mme Pascale BRIAND
Mr Dominique DORMONT
Mr Robert DRILLIEN
Mr Patrick GRIMONT

Sur proposition du ministre chargé de l'agriculture

Mr Pascal BOIREAU

Sur proposition du ministre chargé de la consommation

Mr Jean-Luc PERNODET

Sur proposition du ministre chargé de la défense

Mr Daniel PARZY

Sur proposition du ministre chargé de l'enseignement supérieur

Mr Jean-Claude PATTE

Sur proposition du ministre chargé de l'industrie

Mr François-Loïc COSSET

Sur proposition du ministre chargé de l'intérieur

Mr Elie DASSA

Sur proposition de la ministre chargée du travail

Mr Jean-Michel HEARD

Le Président est Mr ROSSET Rolland [28].

Annexe 3 : MESURES DE CONFINEMENT [28]

a) Conception du laboratoire				
	L1	L2	L3	L4
1. Signalisation du laboratoire (pictogramme "danger biologique")	Non	Oui	Oui	Oui
2. Laboratoire séparé des autres locaux par au moins une porte	Oui	Oui	Oui, fermeture automatique	Oui
3. Accès au laboratoire via un sas	Non	Non	Oui	Oui
4. Accès réglementé et verrouillable. Accès possible pour les seuls travailleurs autorisés	Non	Oui	Oui	Oui, par un sas
5. Possibilité de fermer hermétiquement le lieu de travail pour permettre la désinfection (formulation)	Non	Optionnel	Oui	Oui
6. Filtration de l'air extrait du lieu de travail	Non	Non	Oui, filtre HEPA	Oui, double filtre HEPA
7. Filtration de l'air entrant dans le lieu de travail	Non	Non	Optionnel	Oui
8. Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un système équivalent permettant de voir les occupants	Non	Non	Oui	Oui
9. Moyen de communication avec l'extérieur	Non	Non	Optionnel	Oui
10. Maintien d'une pression négative dans le laboratoire par rapport aux zones voisines	Non	Non	Oui	Oui
11. Système d'alarme permettant de détecter tout changement inacceptable de la pression de l'air	Non	Non	Oui	Oui
12. Approvisionnement en énergie électrique de secours	Non	Non	Optionnel	Oui
13. Système de ventilation de secours	Non	Non	Non	Oui

b) Aménagements internes				
	L1	L2	L3	L4
1. Poste de sécurité microbiologique	Non	Oui, type II	Oui, type II	Oui, type II ou type III
2. Vêtements de protection	Oui	Oui	Vêtements de protection adaptés et surbottes	Change complet avant l'entrée et la sortie du laboratoire
3. Aménagements pour le rangement des vêtements de protection dans le laboratoire	Oui	Oui	Oui	Oui
4. Douche pour la décontamination des travailleurs	Non	Non	Optionnel	Oui
5. Lavage des mains: lavabos dont les robinets peuvent être manoeuvrés sans utiliser les mains	Non	Oui (2)	Oui	Oui
6. Résistance des surfaces à l'eau, nettoyage aisé sans endroits inaccessibles au nettoyage	Oui (sols)	Oui (sols)	Oui (sols, murs et plafonds)	Oui (murs, plafonds et sols, résistants aux agents chimiques de nettoyage)
7. Surface des paillasse imperméables à l'eau, résistante aux acides, alcalins, solvants et désinfectants	Oui	Oui	Oui	Oui
8. Lutte efficace contre les vecteurs, par exemple rongeurs et insectes	Oui	Oui	Oui	Oui
9. Présence d'un autoclave	Oui, sur le site	Oui, dans la bâtiment	Oui, dans le laboratoire double entrée (3)	Oui, dans le laboratoire double entrée
10. Présence dans le laboratoire d'un équipement de base spécifique (matériel marqué)	Non	Non	Oui	Oui

c) Pratiques opératoires

	L1	L2	L3	L4
1. Stockage des agents biologiques en lieu sûr	Oui	Oui	Oui	Oui, accès protégé
2. Manipulation des matières infectées et de tout animal dans un système approprié de confinement (4)		Optionnel	Oui	Oui
3. Utilisation de conteneurs spécifiques pour aiguilles contaminées, objets piquants ou tranchants souillés	Oui	Oui	Oui	Oui
4. Contrôle de la dissémination des aérosols formés	Minimiser	Minimiser	Empêcher	Empêcher
5. Gants	Optionnel	Optionnel	Oui	Oui
6. Inactivation du matériel contaminé et des déchets	Oui	Oui	Oui	Oui
7. Décontamination des équipements avant sortie du laboratoire (centrifugeuses, PSM...)	Oui	Oui	Oui	Oui
8. Inactivation des effluents des éviers et des douches	Non	Non	Oui	Oui

(1) Oui = Exigence, Non = Pas d'exigence, Optionnel = doit être décidé au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront ou non être appliquées

(2) Pour les nouvelles installations

(3) Des dérogations exceptionnelles à cette prescription peuvent être accordées

(4) Lorsque des animaux de laboratoire sont délibérément contaminés par un ou plusieurs agents pathogènes, ils doivent être manipulés ou hébergés dans des locaux répondant aux conditions et niveaux de confinements requis du fait de la classification du ou des agents pathogènes utilisés

Annexe 4 : FORMULAIRE DE PREMIERE DEMANDE D'AGREMENT POUR LES OGM DE GROUPE I

MINISTERE DE LA RECHERCHE

Cerfa

N° 11674*01

**PREMIERE DEMANDE D'AGREMENT (1) D'UTILISATION (2) CONFINEE
D'ORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES (OGM) DE LA CLASSE 1
(GROUPE I)**

(décret n° 93-773 du 27mars 1993 et arrêté du 27 décembre 1994)

I - RENSEIGNEMENTS RELATIFS AU LABORATOIRE

1 - Exploitant du laboratoire (5)

NOM et Prénom ou Raison sociale	
Adresse	rue n° Code postal : _ _ _ _ _ Commune :

2 - Laboratoire

Intitulé :	
Adresse	rue n° Code postal : _ _ _ _ _ Commune :
Téléphone : télécopie : e-mail :	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

3 - Directeur des travaux de recherche (6)

NOM et Prénom	
Formation et qualification	

4 - Responsables scientifiques des projets et opérateurs

NOM	Prénom	Formation, expérience, protection prophylactique

La loi n° 78 - 17 du 6 janvier 1978 relative aux fichiers nominatifs garantit un droit d'accès et de rectification des données auprès des organismes destinataires du formulaire.

4 – Responsables scientifiques des projets et opérateurs - suite -

NOM	Prénom	Formation, expérience, protection prophylactique

5 - Responsables du contrôle, de la surveillance, de la sécurité et des conditions de travail (7)

Responsable Hygiène et Sécurité ou Président du Comité d'Hygiène et Sécurité de l'Établissement

NOM et Prénom :	
Formation et qualification	

Ingénieur Hygiène et Sécurité de l'Organisme de rattachement (le cas échéant)

NOM et Prénom :	
Formation et qualification	

Correspondant Hygiène et sécurité du Laboratoire (le cas échéant)

NOM et Prénom :	
Formation et qualification	

6 - Description détaillée démontrant la mise en conformité des locaux et de l'équipement du laboratoire où sera mise en œuvre l'utilisation d'OGM (8)

(Ne pas oublier de remplir les tableaux 1.1, 1.2 et/ou 1.3 selon la nature de l'utilisation)

TABLEAU I – 1 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE DES LABORATOIRES

MESURE DE CONFINEMENT	NIVEAUX DE CONFINEMENT(I)							
	L1		L2		L3		L4	
	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★
a) conception du laboratoire								
1. Signalisation du laboratoire (pictogramme "danger biologique").	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
2. Laboratoire séparé des autres locaux au moins par une porte.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui, fermeture automatique	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
3. Accès au laboratoire via un sas.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
4. Accès réglementé et verrouillable. Accès possible pour les seuls travailleurs autorisés.	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui, par un sas	<input type="checkbox"/>
5. Possibilité de fermer hermétiquement le lieu de travail pour permettre la désinfection (fumigation).	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
6. Filtration de l'air extrait du lieu de travail.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui, filtre HEPA	<input type="checkbox"/>	Oui, double filtre HEPA	<input type="checkbox"/>
7. Filtration de l'air entrant dans le lieu de travail.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
8. Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un système équivalent permettant de voir les occupants	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
9. Moyen de communication avec l'extérieur.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
10. Maintien d'une pression négative dans le laboratoire par rapport aux zones voisines	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
11. Système d'alarme pour détecter tout changement inacceptable de la pression de l'air	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
12. Approvisionnement en énergie électrique de secours	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
13. Système de ventilation de secours.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>

★ dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite

**TABLEAU I – 1 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE DES LABORATOIRES - SUITE-
b) Aménagements internes**

	L1		L2		L3		L4	
	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★
1. Poste de sécurité microbiologique	Non	<input type="checkbox"/>	Oui, type II	<input type="checkbox"/>	Oui, type II	<input type="checkbox"/>	Oui, type II ou type III	<input type="checkbox"/>
2. Vêtements de protection	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Vêtements de protection adaptés et surbottes	<input type="checkbox"/>	Change complet avant l'entrée et la sortie du laboratoire	<input type="checkbox"/>
3. Aménagements pour le rangement des vêtements de protection dans le laboratoire	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
4. Douche pour la décontamination des travailleurs	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
5. Lavage des mains : lavabos dont les robinets peuvent être manœuvrés sans utiliser les mains	Non	<input type="checkbox"/>	Oui (II)	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
6. Résistance des surfaces à l'eau, nettoyage aisé sans endroits inaccessibles au nettoyage	Oui (sols)	<input type="checkbox"/>	Oui (sols)	<input type="checkbox"/>	Oui (sols, murs et plafonds)	<input type="checkbox"/>	Oui (sols murs, et plafonds, résistants aux agents chimiques de nettoyage)	<input type="checkbox"/>
7. Surface des paillasses imperméable à l'eau, résistante aux acides, alcalis, solvants et désinfectants.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
8. Lutte efficace contre les vecteurs, par exemple rongeurs et insectes.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
9. Présence d'un autoclave	Oui, sur le site	<input type="checkbox"/>	Oui, dans le bâtiment	<input type="checkbox"/>	Oui, dans le laboratoire, double entrée	<input type="checkbox"/>	Oui, dans le laboratoire double entrée	<input type="checkbox"/>
10. Présence dans le laboratoire d'un équipement de base spécifique (matériel marqué)	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>

★ dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite

TABLEAU I – 1 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE DES LABORATOIRES – SUITE ET FIN –

c) Pratiques opératoires

	L1		L2		L3		L4	
	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★
1. Stockage des agents biologiques en lieu sûr	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui, accès protégé	<input type="checkbox"/>
2. Manipulation des matières infectées et de tout animal contaminé dans un système approprié de confinement (IV)	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
3. Utilisation de conteneurs spécifiques pour aiguilles contaminées, objets piquants ou tranchants souillés	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
4. Contrôle de la dissémination des aérosols formés.	Minimiser	<input type="checkbox"/>	Minimiser	<input type="checkbox"/>	Empêcher	<input type="checkbox"/>	Empêcher	<input type="checkbox"/>
5. Gants	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
6. Inactivation du matériel contaminé et des déchets.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
7. Décontamination des équipements avant sortie du laboratoire (centrifugeuses, PSM..).	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
8. Inactivation des effluents des éviers et des douches.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>

★ dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite

(I) Lexique :

- Oui : exigence.
- Non : pas d'exigence.
- Optionnel : doit être décidé, au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront ou non - être appliquées.

(II) Pour les nouvelles installations

(III) Des dérogations exceptionnelles à cette prescription peuvent être accordées. Consulter le paragraphe III de l'annexe III.1 du Guide de la CGG.

(IV) Lorsque des animaux de laboratoire sont délibérément contaminés par un ou plusieurs agents pathogènes, ils doivent être manipulés ou hébergés dans des locaux répondant aux conditions et niveaux de confinement requis du fait de la classification du ou des agents pathogènes utilisés.

TABLEAU I – 2 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE DES LOCAUX D'ANIMALERIE

Classe des animaux	1	2	3	4
Types d'animaux	abritant un gène ne leur conférant aucun effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou ne relarguant jamais de particules virales ou relarguant des particules virales de classe 1	abritant un gène mobilisable ayant un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou conférant à l'animal un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou relarguant des particules virales de classe 2	relarguant des particules virales de classe 3	relarguant des particules virales de classe 4

Type d'animalerie	A1		A2		A3		A4	
	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★
Confinement physique	conditions habituelles d'élevage avec des barrières physiques spécifiques pour les espèces pouvant se multiplier dans l'environnement <input type="checkbox"/>		conditions définies pour l'animalerie A1 <input type="checkbox"/>		conditions définies pour l'animalerie A1 <input type="checkbox"/>		conditions définies pour l'animalerie A1 <input type="checkbox"/>	
	les animaux transgéniques sont isolés des animaux non expérimentaux <input type="checkbox"/>		les animaux sont maintenus à l'intérieur de barrières physiques renforcées s'ils abritent des gènes nuisibles pour l'homme ou l'environnement <input type="checkbox"/>		les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L3 <input type="checkbox"/>		les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L4 <input type="checkbox"/>	
	tous les animaux expérimentaux sont éliminés <input type="checkbox"/>		les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L2 s'ils relarguent des particules virales <input type="checkbox"/>		tous les animaux expérimentaux sont autoclavés ou incinérés <input type="checkbox"/>		tous les animaux expérimentaux sont autoclavés ou incinérés <input type="checkbox"/>	
Classe des animaux	1 <input type="checkbox"/>		2 <input type="checkbox"/>		3 <input type="checkbox"/>		4 <input type="checkbox"/>	

★ dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite.

TABLEAU I – 3 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE POUR LA CULTURE DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES

Classe générale de confinement	L1		L2		L3		L4	
	S1		S2		S3		S4	
	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★
Type de serre								
Matériaux de construction	quelconques, normes bâtiment	<input type="checkbox"/>	impermeables à l'eau résistance contrôlée	<input type="checkbox"/>	impermeables à l'eau résistants aux chocs	<input type="checkbox"/>	impermeables à l'eau résistants aux chocs	<input type="checkbox"/>
Nature du sol	quelconque ou gravier	<input type="checkbox"/>	gravier dés herbé, désinfectable ou imperméable	<input type="checkbox"/>	impermeable + collecte et stérilisation des eaux	<input type="checkbox"/>	impermeable + collecte et stérilisation des eaux	<input type="checkbox"/>
Aération	Filets anti-animaux obligatoires	<input type="checkbox"/>	filets anti-insectes < 1mm	<input type="checkbox"/>	local étanche	<input type="checkbox"/>	local étanche	<input type="checkbox"/>
	Filets anti-insectes pollinisateurs < 1mm	<input type="checkbox"/>	hygrométrie contrôlable	<input type="checkbox"/>	filtres EU3 à EU7	<input type="checkbox"/>	pression négative	<input type="checkbox"/>
Abords	libres	<input type="checkbox"/>	libres	<input type="checkbox"/>	contrôlés	<input type="checkbox"/>	clôture de sécurité	<input type="checkbox"/>
	zone nue autour du local	<input type="checkbox"/>	zone nue autour du local	<input type="checkbox"/>	local fermé à clé	<input type="checkbox"/>	local fermé à clé	<input type="checkbox"/>
Système du vide de paille	quelconque	<input type="checkbox"/>	quelconque	<input type="checkbox"/>	zone nue autour du local	<input type="checkbox"/>	zone nue autour du local	<input type="checkbox"/>
Douche	quelconque	<input type="checkbox"/>	quelconque	<input type="checkbox"/>	filtres EU3 à EU7	<input type="checkbox"/>	filtres EU3 à EU7	<input type="checkbox"/>
Signalisation du risque pour l'environnement	non	<input type="checkbox"/>	non	<input type="checkbox"/>	non, désinfection des mains dans la serre	<input type="checkbox"/>	oui	<input type="checkbox"/>
Destruction des plantes	oui	<input type="checkbox"/>	oui	<input type="checkbox"/>	oui	<input type="checkbox"/>	oui	<input type="checkbox"/>
	plantes détruites	<input type="checkbox"/>	plantes et substrats stérilisés ou incinérés dans le local ou dans un bâtiment voisin, ou expédiés en conteneurs étanches vers un incinérateur agréé	<input type="checkbox"/>	plantes et substrats stérilisés ou incinérés dans le local ou dans un bâtiment voisin, ou expédiés en conteneurs étanches vers un incinérateur agréé	<input type="checkbox"/>	plantes ou substrats détruits (stérilisés ou incinérés) dans le local ou évacués à travers un autoclave à double entrée	<input type="checkbox"/>

**TABLEAU I – 3 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE POUR LA CULTURE DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES
(SUITE ET FIN)**

Type de serre	S1		S2		S3		S4	
	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★
Accès	par sas à pollinisateurs, réservé aux expérimentateurs (visites possibles) <input type="checkbox"/>		par sas à pollinisateurs, réservé aux expérimentateurs (visites possibles) <input type="checkbox"/>		sas dont les portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément strictement réservé aux expérimentateurs et au personnel d'entretien <input type="checkbox"/>		sas dont les portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément strictement réservé aux expérimentateurs <input type="checkbox"/>	
Vêtements	blouse <input type="checkbox"/>		blouse <input type="checkbox"/>		blouse, chaussures, couvre-chef qui sont stérilisés soit dans le local, soit dans un local voisin avant d'être sortis <input type="checkbox"/>		blouse, chaussures, couvre-chef qui sont stérilisés avant d'être sortis <input type="checkbox"/>	
Effluents	non collectés <input type="checkbox"/>		soit non collectés, prévoir récupération des graines, soit collectés avec récupération des graines et stérilisation pour manipulation Ep2 <input type="checkbox"/>		collectés pour récupération des graines et stérilisation avant rejet <input type="checkbox"/>		collectés et stérilisés avant rejet <input type="checkbox"/>	
Registre pour les expériences	non <input type="checkbox"/>		non <input type="checkbox"/>		oui <input type="checkbox"/>		oui <input type="checkbox"/>	

★ dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite

II - RENSEIGNEMENTS GLOBAUX RELATIFS A L'UTILISATION D'OGM

Nature de l'utilisation (9) :	
Thématique générale du laboratoire :	
Titre de l'utilisation englobant les différents projets (3) qui la constituent	
But de l'utilisation :	
Résumé :	
Objectifs et résultats attendus :	

III. DESCRIPTION DETAILLEE DES DIFFERENTS PROJETS

projet A :

Titre du projet :		
Responsable scientifique du projet :	NOM	Prénom

A.1 (Cocher la case correspondante)

- Ce projet a fait l'objet d'une "déclaration d'utilisation" en application de l'article 19 du décret 93-773.

Le numéro d'enregistrement de ce dossier est : |_|_|_|_|_|

Le classement notifié par la CGG est : GROUPE CLASSE CONFINEMENT

5 copies du dossier initial et des compléments déclaratifs sont joints à cette demande.

- Ce projet n'a pas fait l'objet d'une "déclaration d'utilisation" en application de l'article 19 du décret 93-773.

- Ce projet a fait l'objet d'une "demande d'agrément" en application de l'article 19 du décret 93-773.

Le numéro d'enregistrement de ce dossier est : |_|_|_|_|_|

Le classement notifié par la CGG est : GROUPE CLASSE CONFINEMENT

- Ce projet n'a pas fait l'objet d'une "demande d'agrément" en application de l'article 19 du décret 93-773.

- Ce projet a fait l'objet de modifications par rapport au dossier de déclaration d'utilisation ou au dossier de demande d'agrément

Description des modifications :

- Ce projet n'a pas fait l'objet de modifications par rapport au dossier de déclaration d'utilisation

A.2 - Propositions de classement du ou des organismes génétiquement modifiés mis en œuvre dans le projet.

A.3 - Renseignements d'ordre scientifique et technique requis, en application des articles 1 et 2 pour autant qu'ils soient pertinents.

I. - Organisme donneur, nature de l'insert.

Donneur 1

1. Classe de l'organisme.
2. Description du phénotype : s'il s'agit d'une souche répertoriée modifiée, indiquez avec précision la modification et ses conséquences, notamment la résistance aux agents antimicrobiens.
3. Pathogénicité : vis-à-vis de l'homme, des animaux ou des plantes, décrite de façon Nature : définition et caractérisation du micro-organisme ou de l'organisme.
4. Nom complet : nom taxonomique et souche.
5. détaillée; le cas échéant, il faut indiquer :
6. l'expérience antérieure d'utilisation ;
7. les tests de pathogénicité effectués.
8. Stabilité phénotypique.
9. Informations sur le croisement et transfert génétique.

Insert 1.1

1. Origine subcellulaire de l'ADN.
2. Caractérisation : taille approximative, gène isolé, ADNc, banque génomique ou d'ADNc

si l'insert n'a pas été cloné dans le laboratoire, indiquer le laboratoire d'origine et le numéro de l'agrément s'il s'agit d'un laboratoire français; décrire complètement la construction s'il s'agit d'un laboratoire étranger.

3. Nature de la séquence mise en œuvre : marqueurs phénotypiques, nature et propriétés du ou des produits

- séquences codantes :
 - nom du gène
 - nature du produit
 - propriétés du produit
- séquences non codantes et signaux d'expression :
 - nature
 - fonctions
 - propriétés

Insert 1.2

Insert 1.3

etc.

Donneur 2

1. Nature.
2. Nom complet.
3. Classe de l'organisme.
4. Description du phénotype.
5. Pathogénicité.
6. Stabilité phénotypique.
7. Informations sur le croisement et transfert génétique.

Insert 2.1

1. Origine subcellulaire de l'ADN.
2. Caractérisation.
3. Nature de la séquence mise en œuvre :
 - séquences codantes :
 - nom du gène
 - nature du produit
 - propriétés du produit
 - séquences non codantes et signaux d'expression :
 - fonctions
 - nature
 - propriétés

Insert 2.2

Insert 2.3 etc.

II. - Hôte(s) organisme(s) récepteur(s).

Hôte 1

1. Nature : définition et caractérisation du micro-organisme ou de l'organisme.
2. Nom complet : nom taxonomique et souche.
3. Classe de l'organisme.
4. Description du phénotype : s'il s'agit d'une souche répertoriée modifiée, indiquer avec précision la modification et ses conséquences, notamment la résistance aux agents antimicrobiens.
5. Pathogénicité : vis-à-vis de l'homme, des animaux ou des plantes, décrite de façon détaillée; le cas échéant, indiquer :
6. - l'expérience antérieure d'utilisation ;
7. - les tests de pathogénicité effectués.
8. Stabilité phénotypique.
9. Informations sur les possibilités de dissémination : conjugaison, croisement et autres mécanismes de transfert. Le cas échéant, mentionnez toute information sur le mode de reproduction de l'organisme ou sur le cycle infectieux.

Hôte 2

1. Nature.
2. Nom complet.
3. Classe de l'organisme.
4. Description du phénotype.
5. Pathogénicité.
6. Stabilité phénotypique.
7. Informations sur les possibilités de dissémination. etc.

III. - Autres renseignements relatifs aux organismes récepteurs et aux organismes donneurs.

1. Habitat naturel et répartition géographique, caractéristiques climatiques des habitats originaux :
2. Participation significative aux processus environnementaux (tels que la fixation de l'azote ou la régulation du pH) :
3. Interactions avec d'autres organismes présents dans l'environnement et effets sur ces organismes (y compris, les aptitudes éventuelles à la compétition ou à la symbiose).
4. Aptitude à former des structures de survie (par exemple spores ou sclérotés).

IV. - Vecteurs.

Vecteur 1

1. Nature.
2. Description documentée du vecteur : références et cartes.

(La fourniture des cartes précises des vecteurs est obligatoire. C'est un élément déterminant pour permettre le classement. Il ne s'agit pas de carte de restriction mais de cartes représentant les éléments fonctionnels du vecteur)

3. Phénotype.
4. Mobilisation , transférabilité.
5. Classe de risque :
 - si le vecteur utilisé est un vecteur de référence modifié, indiquez de façon précise la modification et les conséquences impliquées ;
 - en particulier, si de nouveaux gènes sont exprimés après la modification ou la présence de l'insert, il faut indiquer :
 - les nouveaux gènes ;
 - la modification de spécificité d'hôte ;
 - les modifications fonctionnelles ;
 - la stabilité phénotypique.

Vecteur 2

1. Nature.
2. Description documentée du vecteur.
3. Phénotype.
4. Mobilisation , transférabilité.
5. Classe de risque.

etc.

V. - Association hôte-vecteur-insert.

Décrire **toutes** les combinaisons hôte-vecteur-insert, et pour chacune d'elle indiquer :

1. Mode d'introduction.
2. Localisation subcellulaire du vecteur ou de son insert.
3. Estimation du nombre de copies du vecteur ou de sites d'insertion
4. Modifications connues ou prévisibles des propriétés de l'hôte.

VI. - Caractéristiques et dimension de l'utilisation.

1. Type de l'utilisation (9).
2. Volumes maximaux mis en œuvre.

VII. - Considérations d'ordre sanitaire.

1. Effets de toxicité ou d'allergénicité de l'organisme génétiquement modifié non viable ou de leurs produits métaboliques.
2. Risques liés au produit.
3. Comparaison entre la pathogénicité de l'organisme génétiquement modifié et celle de l'organisme donneur, récepteur ou, le cas échéant, parental.
4. Capacité de colonisation.
5. Pathogénicité de l'organisme génétiquement modifié pour les humains ne souffrant pas de déficiences immunitaires :
 - a) Maladies provoquées et mécanismes de la pathogénicité, y compris le mode de propagation et la virulence;
 - b) Communicabilité ;
 - c) Dose infectieuse ;
 - d) Gamme d'hôtes, possibilité d'altération ;
 - e) Possibilité de survie à l'extérieur de l'hôte humain ;
 - f) Présence de vecteurs ou de moyens de dissémination ;
 - g) Stabilité biologique ;
 - h) Schémas de résistance aux antibiotiques ;
 - i) Allergénicité ;
 - j) Existence de thérapies appropriées.

VIII. - Considérations d'ordre environnemental.

1. Facteurs affectant la survie, la multiplication et la dissémination de l'organisme génétiquement modifié dans l'environnement.
2. Techniques existantes de détection, d'identification et de surveillance de l'organisme génétiquement modifié.
3. Techniques existantes permettant de détecter le transfert du nouveau matériel génétique à d'autres organismes.
4. Habitats connus et prévus de l'organisme génétiquement modifié.
5. Description des écosystèmes dans lesquels l'organisme génétiquement modifié pourrait être disséminé accidentellement.
6. Mécanismes prévus et résultats de l'interaction entre l'organisme génétiquement modifié et les organismes ou les organismes génétiquement modifiés susceptibles d'être exposés en cas de dissémination dans l'environnement.
7. Effets connus ou prévus sur les plantes et les animaux, par exemple la pathogénicité, l'infectiosité, la toxicité, la virulence, la faculté d'agir comme vecteur d'un organisme pathogène, l'allergénicité, la colonisation.
8. Implications connues ou prévues dans les processus biogéochimiques.
9. Existence de méthodes de décontamination de la zone en cas de dissémination dans l'environnement.

A.4 - Description des méthodes de manipulation des organismes génétiquement modifiés.

Modalité de la mise en œuvre des OGM selon les bonnes pratiques.

Conditions du traitement des déchets et des effluents et de leur élimination

projet A

A.6 tableaux récapitulatifs des éléments du trinôme donneur- vecteur- receveur

Titre du projet		
Responsable scientifique du projet	NOM :	Prénom :

A.6.1. Construction de banques

Constitution de la banque d'ADN									
Organismes donneurs		Organismes receveurs de la banque		Vecteurs (I)	Nature de la banque (II)			Nom de la banque (III)	Classe de la banque (IV)
Noms taxonomiques	Classe (V)	Noms taxonomiques	Classe (V)	Nom des vecteurs	ADN génomique	ADNc	PCR		
Donneur 1		Receveur 1		Vecteur1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
		Receveur 2			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Donneur 2		Receveur 3		Vecteur2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
etc		etc		etc	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

A.6.2. Isolement des clones et mise en œuvre des séquences clonées

Organismes donneurs d'inserts (organisme ou banque) (7)		Inserts	Vecteurs (I)		Organismes receveur intermédiaire ou final		Classe de l'OGM résultant
Noms taxonomiques ou nom de la banque	Classe (IV) (V)	Nature des inserts ou des types d'inserts (VI)	Nom des vecteurs	Classe (IV)	Noms taxonomiques	Classe (IV)	
Donneur 1		Insert 1.1	Vecteur1		Receveur 1		
		Insert 1.1	Vecteur 2		Receveur 2		
		Insert 1.2	Vecteur 3		Receveur 1		
Donneur 2		Insert 2.1	Vecteur 4		Receveur 3		

A.6.2. Isolement des clones et mise en œuvre des séquences clonées (suite et fin)

Organismes donneurs d'inserts (organisme ou banque) (7)		Inserts	Vecteurs (I)		Organismes receveur intermédiaire ou final		Classe de l'OGM résultant
Noms taxonomiques ou nom de la banque	Classe (IV) (V)	Nature des inserts ou des types d'inserts (VI)	Nom des vecteurs	Classe (IV)	Noms taxonomiques	Classe (IV)	
		Insert 2.2	etc.		etc.		
		Insert 2.3	etc.		etc.		
etc.		etc.	etc.		etc.		

(I) Indiquer les noms des vecteurs. Ces derniers doivent être décrits dans le paragraphe A.III.3

(II) Cocher la case correspondante

(III) Donner un nom à la banque ce qui permettra de l'identifier dans le tableau A.6.2

(IV) Se référer au chapitre 3 du Guide de la CGG

(V) Se référer aux Annexes II.1, II.2, II.3 et II.4 du Guide de la CGG

(VI) Indiquer le nom des gènes insérés

Dupliquer les pages correspondant au projet A pour documenter les :

- Projet B (en numérotant les paragraphes de B.1 à B.6)

- Projet C (en numérotant les paragraphes de C.1 à C.6)

etc...

IV- DUREE DE L'AGREMENT

Durée demandée (11)	
---------------------	--

Fait à _____, le ____/____/____

le chef d'Unité ou de Laboratoire, directeur des travaux de recherche	NOM Prénom : Signature :
---	--

l'exploitant	NOM Prénom : qualité : Signature :
--------------	---

Confidentialité (12) :.....
.....

Pièces jointes (le cas échéant)

Dossier initial de "déclaration d'utilisation" enregistré par la CGG sous le N° : ____

Complément déclaratif N°: CD ____ (Si la déclaration d'utilisation a fait l'objet de compléments déclaratifs)

Demande d'agrément enregistrée par la CGG sous le N° : ____ (en cas de modification d'agrément ou en cas de demande de renouvellement de l'agrément)

4 – Responsables scientifiques des projets et opérateurs - suite -

NOM	Prénom	Formation, expérience, protection prophylactique

5 - Responsables du contrôle, de la surveillance, de la sécurité et des conditions de travail (7)

Responsable Hygiène et Sécurité ou Président du Comité d'Hygiène et Sécurité de l'Etablissement

NOM et Prénom :	
Formation et qualification	

Ingénieur Hygiène et Sécurité de l'Organisme de rattachement (le cas échéant)

NOM et Prénom :	
Formation et qualification	

Correspondant Hygiène et sécurité du Laboratoire (le cas échéant)

NOM et Prénom :	
Formation et qualification	

6 - Description détaillée démontrant la mise en conformité des locaux et de l'équipement du laboratoire où sera mise en œuvre l'utilisation d'OGM (8)

(Ne pas oublier de remplir les tableaux 1.1, 1.2 et/ou 1.3 selon la nature de l'utilisation et de joindre un plan détaillé des locaux pour l'utilisation des OGM des classes 3 et 4)

TABLEAU I – 1 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE DES LABORATOIRES

MESURE DE CONFINEMENT	NIVEAUX DE CONFINEMENT(I)							
	L1		L2		L3		L4	
	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*
a) conception du laboratoire								
1. Signalisation du laboratoire (pictogramme "danger biologique").	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
2. Laboratoire séparé des autres locaux au moins par une porte.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui, fermeture automatique	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
3. Accès au laboratoire via un sas.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
4. Accès réglementé et verrouillable. Accès possible pour les seuls travailleurs autorisés.	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui, par un sas	<input type="checkbox"/>
5. Possibilité de fermer hermétiquement le lieu de travail pour permettre la désinfection (fumigation).	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
6. Filtration de l'air extrait du lieu de travail.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui, filtre HEPA	<input type="checkbox"/>	Oui, double filtre HEPA	<input type="checkbox"/>
7. Filtration de l'air entrant dans le lieu de travail.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
8. Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un système équivalent permettant de voir les occupants	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
9. Moyen de communication avec l'extérieur.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
10. Maintien d'une pression négative dans le laboratoire par rapport aux zones voisines	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
11. Système d'alarme pour détecter tout changement inacceptable de la pression de l'air	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
12. Approvisionnement en énergie électrique de secours	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
13. Système de ventilation de secours.	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>

* dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite

TABLEAU I – 1 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE DES LABORATOIRES - SUITE-

b) Aménagements internes

	L1		L2		L3		L4	
	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*
1. Poste de sécurité microbiologique	Non <input type="checkbox"/>		Oui, type II	<input type="checkbox"/>	Oui, type II	<input type="checkbox"/>	Oui, type II ou type III	<input type="checkbox"/>
2. Vêtements de protection	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Vêtements de protection adaptés et surbottes	<input type="checkbox"/>	Change complet avant l'entrée et la sortie du laboratoire	<input type="checkbox"/>
3. Aménagements pour le rangement des vêtements de protection dans le laboratoire	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
4. Douche pour la décontamination des travailleurs	Non <input type="checkbox"/>		Non <input type="checkbox"/>		Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
5. Lavage des mains : lavabos dont les robinets peuvent être manœuvrés sans utiliser les mains	Non <input type="checkbox"/>		Oui (II)	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
6. Résistance des surfaces à l'eau, nettoyage aisé sans endroits inaccessibles au nettoyage	Oui (sols)	<input type="checkbox"/>	Oui (sols)	<input type="checkbox"/>	Oui (sols, murs et plafonds)	<input type="checkbox"/>	Oui (sols murs, et plafonds, résistants aux agents chimiques de nettoyage)	<input type="checkbox"/>
7. Surface des paillasse imperméable à l'eau, résistante aux acides, alcalis, solvants et désinfectants.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
8. Lutte efficace contre les vecteurs, par exemple rongeurs et insectes.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
9. Présence d'un autoclave	Oui, sur le site <input type="checkbox"/>		Oui, dans le bâtiment	<input type="checkbox"/>	Oui, dans le laboratoire, double entrée	<input type="checkbox"/>	Oui, dans le laboratoire double entrée	<input type="checkbox"/>
10. Présence dans le laboratoire d'un équipement de base spécifique (matériel marqué)	Non	<input type="checkbox"/>	Non	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>

*dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite

**TABLEAU I – 1 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE DES LABORATOIRES –
SUITE ET FIN –**

c) Pratiques opératoires

	L1		L2		L3		L4	
	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*
1. Stockage des agents biologiques en lieu sûr	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui, accès protégé	<input type="checkbox"/>
2. Manipulation des matières infectées et de tout animal contaminé dans un système approprié de confinement (IV)	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
3. Utilisation de conteneurs spécifiques pour aiguilles contaminées, objets piquants ou tranchants souillés	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
4. Contrôle de la dissémination des aérosols formés.	Minimiser	<input type="checkbox"/>	Minimiser	<input type="checkbox"/>	Empêcher	<input type="checkbox"/>	Empêcher	<input type="checkbox"/>
5. Gants	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Optionnel	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
6. Inactivation du matériel contaminé et des déchets.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
7. Décontamination des équipements avant sortie du laboratoire (centrifugeuses, PSM..).	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>
8. Inactivation des effluents des éviers et des douches.	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>	Oui	<input type="checkbox"/>

* dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite

(I) Lexique :

- Oui : exigence.
- Non : pas d'exigence.
- Optionnel : doit être décidé, au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront ou non - être appliquées.

(II) Pour les nouvelles installations

(III) Des dérogations exceptionnelles à cette prescription peuvent être accordées. Consulter le paragraphe III de l'annexe III.1 du Guide de la CGG.

(IV) Lorsque des animaux de laboratoire sont délibérément contaminés par un ou plusieurs agents pathogènes, ils doivent être manipulés ou hébergés dans des locaux répondant aux conditions et niveaux de confinement requis du fait de la classification du ou des agents pathogènes utilisés.

TABLEAU I – 2 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE DES LOCAUX D'ANIMALERIE

Classe des animaux	1	2	3	4
Types d'animaux	abritant un gène ne leur conférant aucun effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou ne relarguant jamais de particules virales ou relarguant des particules virales de classe 1	abritant un gène mobilisable ayant un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou conférant à l'animal un effet nuisible pour l'homme ou l'environnement ou relarguant des particules virales de classe 2	relarguant des particules virales de classe 3	relarguant des particules virales de classe 4

Type d'animalerie	A1		A2		A3		A4	
	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★	Prescription	★
Confinement physique	conditions habituelles d'élevage avec des barrières physiques spécifiques pour les espèces pouvant se multiplier dans l'environnement <input type="checkbox"/>		conditions définies pour l'animalerie A1 <input type="checkbox"/>		conditions définies pour l'animalerie A1 <input type="checkbox"/>		conditions définies pour l'animalerie A1 <input type="checkbox"/>	
	les animaux transgéniques sont isolés des animaux non expérimentaux <input type="checkbox"/>		les animaux sont maintenus à l'intérieur de barrières physiques renforcées s'ils abritent des gènes nuisibles pour l'homme ou l'environnement <input type="checkbox"/>		les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L3 <input type="checkbox"/>		les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L4 <input type="checkbox"/>	
	tous les animaux expérimentaux sont éliminés <input type="checkbox"/>		les animaux sont maintenus dans les conditions définies pour les locaux de type L2 s'ils relarguent des particules virales <input type="checkbox"/>		tous les animaux expérimentaux sont autoclavés ou incinérés <input type="checkbox"/>		tous les animaux expérimentaux sont autoclavés ou incinérés <input type="checkbox"/>	
Classe des animaux	1 <input type="checkbox"/>		2 <input type="checkbox"/>		3 <input type="checkbox"/>		4 <input type="checkbox"/>	

★ dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite.

TABLEAU I – 3 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE POUR LA CULTURE DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES

Classe générale de confinement	L1		L2		L3		L4	
	S1		S2		S3		S4	
	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*
Matériaux de construction	quelconques, normes bâtiment <input type="checkbox"/>		imperméables à l'eau résistance contrôlée <input type="checkbox"/>		imperméables à l'eau résistants aux chocs <input type="checkbox"/>		imperméables à l'eau résistants aux chocs <input type="checkbox"/>	
Nature du sol	quelconque ou gravier <input type="checkbox"/>		gravier dés herbé, désinfectable ou imperméable <input type="checkbox"/>		imperméable + collecte et stérilisation des eaux <input type="checkbox"/>		imperméable + collecte et stérilisation des eaux <input type="checkbox"/>	
Aération	Filets anti-animaux obligatoires <input type="checkbox"/>		filets anti-insectes < 1mm <input type="checkbox"/>		local étanche <input type="checkbox"/>		local étanche <input type="checkbox"/>	
	Filets anti-insectes pollinisateurs < 1mm <input type="checkbox"/>		hygrométrie contrôlable <input type="checkbox"/>		filtres EU3 à EU7 <input type="checkbox"/>		pression négative <input type="checkbox"/> filtres HEPA à la serre <input type="checkbox"/>	
Abords	libres <input type="checkbox"/>		libres <input type="checkbox"/>		contrôlés <input type="checkbox"/>		clôture de sécurité <input type="checkbox"/>	
	zone nue autour du local <input type="checkbox"/>		zone nue autour du local <input type="checkbox"/>		local fermé à clé <input type="checkbox"/> zone nue autour du local <input type="checkbox"/>		local fermé à clé <input type="checkbox"/> zone nue autour du local <input type="checkbox"/>	
Système du vide de paille	quelconque <input type="checkbox"/>		quelconque <input type="checkbox"/>		filtres EU3 à EU7 <input type="checkbox"/>		filtres EU3 à EU7 <input type="checkbox"/>	
Douche	non <input type="checkbox"/>		non <input type="checkbox"/>		non, désinfection des mains dans la serre <input type="checkbox"/>		oui <input type="checkbox"/>	
Signalisation du risque pour l'environnement	oui <input type="checkbox"/>		oui <input type="checkbox"/>		oui <input type="checkbox"/>		oui <input type="checkbox"/>	
Destruction des plantes	plantes détruites <input type="checkbox"/>		plantes et substrats stérilisés ou incinérés dans le local ou dans un bâtiment voisin, ou expédiés en conteneurs étanches vers un incinérateur agréé <input type="checkbox"/>		plantes et substrats stérilisés ou incinérés dans le local ou dans un bâtiment voisin, ou expédiés en conteneurs étanches vers un incinérateur agréé <input type="checkbox"/>		plantes ou substrats détruits (stérilisés ou incinérés) dans le local ou évacués à travers un autoclave à double entrée <input type="checkbox"/>	

**TABLEAU I – 3 : RECAPITULATIF DE LA CONFORMITE POUR LA CULTURE DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES
(SUITE ET FIN)**

Type de serre	S1		S2		S3		S4	
	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*	Prescription	*
Accès	par sas à pollinisateurs, réservé aux expérimentateurs <input type="checkbox"/> (visites possibles)		par sas à pollinisateurs, réservé aux expérimentateurs <input type="checkbox"/> (visites possibles)		sas dont les portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément strictement réservé aux expérimentateurs et au personnel d'entretien <input type="checkbox"/>		sas dont les portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément strictement réservé aux expérimentateurs <input type="checkbox"/>	
Vêtements	blouse <input type="checkbox"/>		blouse <input type="checkbox"/>		blouse, chaussures, couvre-chef qui sont stérilisés soit dans le local, soit dans un local voisin avant d'être sortis <input type="checkbox"/>		blouse, chaussures, couvre-chef qui sont stérilisés avant d'être sortis <input type="checkbox"/>	
Effluents	non collectés <input type="checkbox"/>		soit non collectés, prévoir récupération des graines <input type="checkbox"/> soit collectés avec récupération des graines et stérilisation pour manipulation Ep2 <input type="checkbox"/>		collectés pour récupération des graines et stérilisation avant rejet <input type="checkbox"/>		collectés et stérilisés avant rejet <input type="checkbox"/>	
Registre pour les expériences	non <input type="checkbox"/>		non <input type="checkbox"/>		oui <input type="checkbox"/>		oui <input type="checkbox"/>	

* dans chaque case, une croix indique une exigence prescrite satisfaite

II - RENSEIGNEMENTS GLOBAUX RELATIFS A L'UTILISATION D'OGM

Nature de l'utilisation (9) :	
Thématique générale du laboratoire :	
Titre de l'utilisation englobant les différents projets (3) qui la constituent	
But de l'utilisation :	
Résumé :	
Objectifs et résultats attendus :	

**TABLEAU RECAPITULATIF D'ENSEMBLE COHERENT DE PROJETS CONSTITUANT UNE
DEMANDE D'AGREMENT**

PROJETS AYANT FAIT L'OBJET DE DECLARATION ET/OU D'AGREMENT AVEC OU SANS COMPLEMENT DECLARATIF(CD)							
Titre du Projet	NOM et Prénom du responsable scientifique du projet (3)	N° enregistrem. de la CGG du projet déclaré et de ses CD	Décision de classement et de prescriptions de confinement (I)			La présente demande apporte-t-elle des modifications (10) et compléments au projet tel qu'il a été déclaré avec ses CD ?	
			Date	Classe	Confin e-ment	oui (II)	non
Projet A :		□ □ □ □ □	□ □ □ □ / □ □ □ □ / □ □ □ □ □			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Projet B :		□ □ □ □ □	□ □ □ □ / □ □ □ □ / □ □ □ □ □			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Projet C :		□ □ □ □ □	□ □ □ □ / □ □ □ □ / □ □ □ □ □			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
etc. (jusqu'à projet ...)		□ □ □ □ □	□ □ □ □ / □ □ □ □ / □ □ □ □ □			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

PROJETS N'AYANT PAS FAIT L'OBJET D'UNE DECLARATION			
Titre du Projet	NOM et Prénom du responsable scientifique du projet	Classement proposé	
		Classe	Confinement
Projet S :			
Projet T :			
etc.			

(I) Un projet peut comprendre plusieurs parties classées différemment. Il convient d'indiquer ces différents classements partiels.

(II) Les modifications et compléments doivent être décrits de façon circonstanciée pour chaque projet identifié par son titre.

Il est possible de regrouper dans un même document les modifications et compléments qui seraient communs à plusieurs projets d'une même utilisation en identifiant clairement les projets.

III. DESCRIPTION DETAILLEE DES DIFFERENTS PROJETS

projet A :

Titre du projet :		
Responsable scientifique du projet :	NOM	Prénom

A.1 (Cocher la case correspondante)

- Ce projet a fait l'objet d'une "déclaration d'utilisation" en application de l'article 19 du décret 93-773.

Le numéro d'enregistrement de ce dossier est : I__I__ I__ I__ i

Le classement notifié par la CGG est : GROUPE CLASSE CONFINEMENT

5 copies du dossier initial et des compléments déclaratifs sont joints à cette demande.

- Ce projet n'a pas fait l'objet d'une "déclaration d'utilisation" en application de l'article 19 du décret 93-773.

- Ce projet a fait l'objet d'une "demande d'agrément" en application de l'article 19 du décret 93-773.

Le numéro d'enregistrement de ce dossier est : I__I__ I__ I__ I__

Le classement notifié par la CGG est : GROUPE CLASSE CONFINEMENT

- Ce projet n'a pas fait l'objet d'une "demande d'agrément" en application de l'article 19 du décret 93-773

- Ce projet a fait l'objet de modifications par rapport au dossier de déclaration d'utilisation ou au dossier de demande d'agrément

Description des modifications :

- Ce projet n'a pas fait l'objet de modifications par rapport au dossier de déclaration d'utilisation

A.2 - Propositions de classement du ou des organismes génétiquement modifiés mis en œuvre dans le projet.

A.3 - Renseignements d'ordre scientifique et technique requis, en application des articles 1 et 2 pour autant qu'ils soient pertinents.

I. - Organisme donneur, nature de l'insert.

Donneur 1

1. Classe de l'organisme.
2. Description du phénotype : s'il s'agit d'une souche répertoriée modifiée, indiquez avec précision la modification et ses conséquences, notamment la résistance aux agents anti-microbiens.
3. Pathogénicité : vis-à-vis de l'homme, des animaux ou des plantes, décrite de façon Nature : définition et caractérisation du micro-organisme ou de l'organisme.
4. Nom complet : nom taxonomique et souche.
5. détaillée; le cas échéant, il faut indiquer :
6. l'expérience antérieure d'utilisation ;
7. les tests de pathogénicité effectués.
8. Stabilité phénotypique.
9. Informations sur le croisement et transfert génétique.

Insert 1.1

1. Origine subcellulaire de l'ADN.
2. Caractérisation : taille approximative, gène isolé, ADNc, banque génomique ou d'ADNc

si l'insert n'a pas été cloné dans le laboratoire, indiquer le laboratoire d'origine et le numéro de l'agrément s'il s'agit d'un laboratoire français; décrire complètement la construction s'il s'agit d'un laboratoire étranger.

3. Nature de la séquence mise en œuvre : marqueurs phénotypiques, nature et propriétés du ou des produits
 - séquences codantes :
nom du gène
nature du produit
propriétés du produit
 - séquences non codantes et signaux d'expression :
nature
fonctions
propriétés

Insert 1.2

Insert 1.3

etc.

Donneur 2

1. Nature.
2. Nom complet.
3. Classe de l'organisme.
4. Description du phénotype.
5. Pathogénicité.
6. Stabilité phénotypique.
7. Informations sur le croisement et transfert génétique.

Insert 2.1

1. Origine subcellulaire de l'ADN.
2. Caractérisation.
3. Nature de la séquence mise en œuvre :
 - séquences codantes :
nom du gène
nature du produit
propriétés du produit
 - séquences non codantes et signaux d'expression :
fonctions
nature
propriétés

Insert 2.2

Insert 2.3 etc.

II. - Hôte(s) organisme(s) récepteur(s).

Hôte 1

1. Nature : définition et caractérisation du micro-organisme ou de l'organisme.
2. Nom complet : nom taxonomique et souche.
3. Classe de l'organisme.
4. Description du phénotype : s'il s'agit d'une souche répertoriée modifiée, indiquer avec précision la modification et ses conséquences, notamment la résistance aux agents anti-microbiens.
5. Pathogénicité : vis-à-vis de l'homme, des animaux ou des plantes, décrite de façon détaillée; le cas échéant, indiquer :
 - l'expérience antérieure d'utilisation ;

- les tests de pathogénicité effectués. Stabilité phénotypique.
6. Informations sur les possibilités de dissémination : conjugaison, croisement et autres mécanismes de transfert. Le cas échéant, mentionnez toute information sur le mode de reproduction de l'organisme ou sur le cycle infectieux.

Hôte 2

1. Nature.
2. Nom complet.
3. Classe de l'organisme.
4. Description du phénotype.
5. Pathogénicité.
6. Stabilité phénotypique.
7. Informations sur les possibilités de dissémination. etc.

III. - Autres renseignements relatifs aux organismes récepteurs et aux organismes donneurs.

1. Habitat naturel et répartition géographique, caractéristiques climatiques des habitats originaux :
2. Participation significative aux processus environnementaux (tels que la fixation de l'azote ou la régulation du pH) :
3. Interactions avec d'autres organismes présents dans l'environnement et effets sur ces organismes (y compris, les aptitudes éventuelles à la compétition ou à la symbiose).
4. Aptitude à former des structures de survie (par exemple spores ou sclérotés).

IV. – Vecteurs.

Vecteur 1

1. Nature.
2. Description documentée du vecteur : références et cartes.

(La fourniture des cartes précises des vecteurs est obligatoire. C'est un élément déterminant pour permettre le classement. Il ne s'agit pas de carte de restriction mais de cartes représentant les éléments fonctionnels du vecteur)

3. Phénotype.
4. Mobilisation, transférabilité.
5. Classe de risque :
 - si le vecteur utilisé est un vecteur de référence modifié, indiquez de façon précise la modification et les conséquences impliquées ;
 - en particulier, si de nouveaux gènes sont exprimés après la modification ou la présence de l'insert, il faut indiquer :
 - les nouveaux gènes ;
 - la modification de spécificité d'hôte ;
 - les modifications fonctionnelles ;
 - la stabilité phénotypique.

Vecteur 2

1. Nature.
2. Description documentée du vecteur.
3. Phénotype.
4. Mobilisation, transférabilité.
5. Classe de risque.

etc.

V. - Association hôte-vecteur-insert.

Décrire **toutes** les combinaisons hôte-vecteur-insert, et pour chacune d'elle indiquer :

1. Mode d'introduction.

2. Localisation subcellulaire du vecteur ou de son insert.
3. Estimation du nombre de copies du vecteur ou de sites d'insertion.
4. Modifications connues ou prévisibles des propriétés de l'hôte.

VI. - Caractéristiques et dimension de l'utilisation.

1. Type de l'utilisation (9).
2. Volumes maximaux mis en œuvre.

VII. - Considérations d'ordre sanitaire.

1. Effets de toxicité ou d'allergénicité de l'organisme génétiquement modifié non viable ou de leurs produits métaboliques.
2. Risques liés au produit.
3. Comparaison entre la pathogénicité de l'organisme génétiquement modifié et celle de l'organisme donneur, récepteur ou, le cas échéant, parental.
4. Capacité de colonisation.
5. Pathogénicité de l'organisme génétiquement modifié pour les humains ne souffrant pas de déficiences immunitaires :
 - a) Maladies provoquées et mécanismes de la pathogénicité, y compris le mode de propagation et la virulence;
 - b) Communicabilité ;
 - c) Dose infectieuse ;
 - d) Gamme d'hôtes, possibilité d'altération ;
 - e) Possibilité de survie à l'extérieur de l'hôte humain ;
 - f) Présence de vecteurs ou de moyens de dissémination ;
 - g) Stabilité biologique ;
 - h) Schémas de résistance aux antibiotiques ;
 - i) Allergénicité ;
 - j) Existence de thérapies appropriées.

VIII. - Considérations d'ordre environnemental.

1. Facteurs affectant la survie, la multiplication et la dissémination de l'organisme génétiquement modifié dans l'environnement.
2. Techniques existantes de détection, d'identification et de surveillance de l'organisme génétiquement modifié.
3. Techniques existantes permettant de détecter le transfert du nouveau matériel génétique à d'autres organismes.
4. Habitats connus et prévus de l'organisme génétiquement modifié.
5. Description des écosystèmes dans lesquels l'organisme génétiquement modifié pourrait être disséminé accidentellement.
6. Mécanismes prévus et résultats de l'interaction entre l'organisme génétiquement modifié et les organismes ou les organismes génétiquement modifiés susceptibles d'être exposés en cas de dissémination dans l'environnement.
7. Effets connus ou prévus sur les plantes et les animaux, par exemple la pathogénicité, l'infectiosité, la toxicité, la virulence, la faculté d'agir comme vecteur d'un organisme pathogène, l'allergénicité, la colonisation.
8. Implications connues ou prévues dans les processus biogéochimiques.
9. Existence de méthodes de décontamination de la zone en cas de dissémination dans l'environnement.

A.4 - Description des méthodes de manipulation des organismes génétiquement modifiés.

Modalité de la mise en œuvre des OGM selon les bonnes pratiques.

Conditions du traitement des déchets et des effluents et de leur élimination.

A.5 - Lorsqu'il s'agit d'OGM des classes de risque 3 ou 4, description des sources potentielles de danger liées à la situation du laboratoire et, le cas échéant, celles des conditions météorologiques prédominantes.

projet A

A.6 tableaux récapitulatifs des éléments du trinôme donneur- vecteur- receveur

Titre du projet		
Responsable scientifique du projet	NOM :	Prénom :

A.6.1. Construction de banques

Constitution de la banque d'ADN									
Organismes donneurs		Organismes receveurs de la banque		Vecteurs (I)	Nature de la banque (II)			Nom de la banque (III)	Classe de la banque (IV)
Noms taxonomiques	Classe (V)	Noms taxonomiques	Classe (V)	Nom des vecteurs	ADN génomique	ADNc	PCR		
Donneur 1		Receveur 1		Vecteur1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
		Receveur 2			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Donneur 2		Receveur 3		Vecteur2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
					<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
etc		etc		etc	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

A.6.2. Isolement des clones et mise en œuvre des séquences clonées

Organismes donneurs d'inserts (organisme ou banque) (7)		Inserts	Vecteurs (I)		Organismes receveur intermédiaire ou final		Classe de l'OGM résultant
Noms taxonomiques ou nom de la banque	Classe (IV) (V)	Nature des inserts ou des types d'inserts (VI)	Nom des vecteurs	Classe (IV)	Noms taxonomiques	Classe (IV)	
Donneur 1		Insert 1.1	Vecteur1		Receveur 1		
		Insert 1.1	Vecteur 2		Receveur 2		
		Insert 1.2	Vecteur 3		Receveur 1		
Donneur 2		Insert 2.1	Vecteur 4		Receveur 3		

A.6.2. Isolement des clones et mise en œuvre des séquences clonées (suite et fin)

Organismes donneurs d'inserts (organisme ou banque) (7)		Inserts	Vecteurs (I)		Organismes receveur intermédiaire ou final		Classe de l'OGM résultant
Noms taxonomiques ou nom de la banque	Classe (IV) (V)	Nature des inserts ou des types d'inserts (VI)	Nom des vecteurs	Classe (IV)	Noms taxonomiques	Classe (IV)	
		Insert 2.2	etc.		etc.		
		Insert 2.3	etc.		etc.		
etc.		etc.	etc.		etc.		

(I) Indiquer les noms des vecteurs. Ces derniers doivent être décrits dans le paragraphe A.III.3

(II) Cocher la case correspondante

(III) Donner un nom à la banque ce qui permettra de l'identifier dans le tableau A.6.2

(IV) Se référer au chapitre 3 du Guide de la CGG

(V) Se référer aux Annexes II.1, II.2, II.3 et II.4 du Guide de la CGG

(VI) Indiquer le nom des gènes insérés

Dupliquer les pages correspondant au projet A pour documenter les :

- Projet B (en numérotant les paragraphes de B.1 à B.6)

- Projet C (en numérotant les paragraphes de C.1 à C.6)

etc...

IV- DUREE DE L'AGREMENT

Durée demandée (11)	
---------------------	--

Fait à _____, le __/__/____

le chef d'Unité ou de Laboratoire, directeur des travaux de recherche	NOM Prénom : Signature :
---	--

l'exploitant	NOM Prénom : qualité : Signature :
--------------	---

Confidentialité (12) :

Pièces jointes (le cas échéant)

Dossier initial de "déclaration d'utilisation" enregistré par la CGG sous le N° : ____

Complément déclaratif N°: CD ____ (Si la déclaration d'utilisation a fait l'objet de compléments déclaratifs)

Demande d'agrément enregistrée par la CGG sous le N° : ____ (en cas de modification d'agrément ou en cas de demande de renouvellement de l'agrément)

MINISTERE DE LA RECHERCHE

Cerfa

*NOTICE EXPLICATIVE D'AIDE AU REMPLISSAGE DU FORMULAIRE DE DEMANDE
D'AGREMENT D'UTILISATION (2) CONFINEE D'ORGANISMES GENETIQUEMENT
MODIFIES OGM DE LA CLASSE 1 (GROUPE I)*

Remarque ; certains tableaux figurant dans le formulaire utilisent des renvois de notes en chiffres arabes et en chiffres romains ; les renvois en chiffres romains font référence à des notes situées en fin de tableau ; les renvois de notes en chiffres arabes font référence aux notes ci-après.

Notes :

(1) - Demande d'agrément :

La demande d'agrément peut correspondre à des situations différentes pour les laboratoires:

- soit le laboratoire a fait dans le cadre des mesures transitoires d'application de la loi une "déclaration d'utilisation d'OGM" ayant donné lieu à un classement par la Commission de Génie Génétique (CGG) valable deux ans. Dans ce cas la demande d'agrément doit être déposée avant la fin des deux ans en indiquant le numéro d'enregistrement du dossier et en signalant les éventuelles modifications par rapport au dossier initial.
- soit le laboratoire n'a pas déposé de déclaration d'utilisation. Dans ce cas l'utilisation ne peut pas être mise en œuvre avant d'avoir obtenu l'agrément.

La demande d'agrément peut comporter des projets dont la mise en œuvre est prévue dans un délai de trois ans.

La demande d'agrément porte à la fois sur les protocoles expérimentaux et sur les locaux et leur équipement. Ceux-ci doivent être en conformité avant la demande d'agrément et les expérimentations ne peuvent pas être entreprises sans obtention de l'agrément.

L'agrément varie en fonction des différents types d'utilisation c'est-à-dire en fonction de la nature et du nombre d'OGM, des techniques mises en œuvre mais aussi en fonction de la finalité des projets de recherche.

(1) - Utilisation :

Toute opération ou ensemble d'opérations au cours desquelles des organismes sont génétiquement modifiés ou au cours desquelles des organismes génétiquement modifiés sont cultivés, mis en œuvre, stockés, détruits ou éliminés (le décret 93-774 modifié par le décret 94-527 du 21.6.94 précise les techniques concernées). Pour une utilisation donnée, le directeur des travaux est le responsable scientifique de l'utilisation. Il est chargé notamment d'encadrer le personnel qui se trouve sous son autorité scientifique. Les directeurs de travaux peuvent se succéder dans le temps, un seul est désigné, pour une ou plusieurs utilisations agréées en cours.

(2) - Projet :

Le directeur des travaux de recherche peut désigner un ou plusieurs responsables chargés du suivi d'un ou plusieurs projets menés dans le cadre de l'utilisation agréée. Ils sont désignés sous le nom de responsable scientifique.

Une même utilisation peut regrouper plusieurs projets à la condition :

- **qu'ils soient réalisés dans des locaux (un ou plusieurs bâtiments) implantés sur un même site géographique et relevant d'un même exploitant, 2/3**
- **qu'ils forment un ensemble cohérent.**

(3) - Classes :

Les OGM appartiennent à quatre classes distinctes en fonction des risques qu'ils présentent pour la santé publique ou l'environnement et notamment par leur pathogénicité. Une même utilisation peut comporter la mise en œuvre d'OGM relevant de classes de risque différentes. Il convient de consulter les "Principes de classement et guides officiels de la Commission de Génie Génétique" pour une description des classes d'OGM.

Les organismes, en particulier les micro-organismes, génétiquement modifiés font l'objet d'un classement en groupes, en fonction des classes de risque et des critères définis dans le décret 93-774 modifié par les décrets 94-527 du 21.6.94 et 98-18 du 8.1.98.

- **La classe 1** est constituée par des systèmes expérimentaux mettant en œuvre des organismes non pathogènes de classe 1 de risque pour lesquels la nature du vecteur ou de la séquence clonée ne justifie pas une modification de classe de risque.
- **Les classes de risque 2, 3 et 4** sont constituées par des systèmes expérimentaux mettant en œuvre, soit des organismes pathogènes, soit des organismes hôtes non pathogènes mais chez lesquels la nature du vecteur et/ou de la séquence clonée peuvent induire une pathogénicité et donc justifier une modification de la classe de risque.

(1) - Exploitant :

On entend par "exploitant", la personne juridique, physique ou morale, responsable des locaux et plus exactement du ou des laboratoires dans lesquels il sera procédé à une ou plusieurs utilisations d'OGM au sens de la loi. L'exploitant peut être une personne morale publique ou privée (CNRS, INSERM, société privée..., représentés par leur directeur, directeur général voire président directeur général) ou une personne physique. Il faut distinguer l'exploitant des locaux, qui en principe est unique, et relativement stable, de la ou des personnes qui dirigent les travaux de recherche plus sujettes à changement.

(2) - Directeur des travaux de recherche :

Le directeur des travaux est le responsable scientifique de l'utilisation. Il est chargé notamment d'encadrer le personnel qui agit sous son autorité scientifique. Les directeurs de travaux peuvent se succéder dans le temps, mais un seul est désigné pour une ou plusieurs utilisations agréées en cours.

Il peut désigner un ou plusieurs responsables chargés du suivi d'un ou plusieurs projets menés dans le cadre de l'utilisation agréée désignés comme **responsables scientifiques du projet**.

(3) - Responsables de la sécurité :

Indiquer le nom et prénoms des personnes responsables du contrôle, de la surveillance et de la sécurité ainsi que leur formation et leurs qualifications.

Pour toutes les unités relevant du CNRS, indiquer l'ingénieur d'Hygiène et de Sécurité de la Délégation Régionale et l'ACMO. Pour les unités associées, indiquer également l'Ingénieur d'Hygiène et de Sécurité de l'organisme contractant.

Pour les unités relevant de l'INSERM, indiquer l'ingénieur d'Hygiène et de Sécurité de l'ADR.

(4) - Locaux et équipements :

Cette description doit permettre d'évaluer l'adéquation des locaux aux prescriptions et doit comporter notamment un plan précis des locaux et la description des éléments techniques (le type des postes de sécurité microbiologique (PSM), l'emplacement des centrifugeuses, congélateurs, autoclaves, les conditions dans lesquelles sont éliminés les déchets et, éventuellement, la présence d'aménagements mobiles). Remplir le(s) tableau(x) 1-1, 1-2, 1-3 selon les cas. (voir la circulaire ministérielle).

(5) - Nature :

Préciser enseignement, recherche ou développement.

(6) - Modifications :

les modifications par rapport à la déclaration d'utilisation peuvent porter sur :

- le changement du directeur des travaux (directeur d'unité) ou du responsable de projet, dans ce cas le signaler.
- le changement de locaux, dans ce cas le préciser et décrire les nouveaux locaux,
- des changements d'ordre scientifique. Indiquer l'existence de ces modifications dans le tableau 2 et les détailler de façon claire et précise (au besoin dans un tableau).

exemples :

- *changement de groupes de risque d'OGM dans une même utilisation, que ce changement se produise à la hausse ou à la baisse ;*
- *nouveau projet n'ayant pas de rapport de cohérence avec l'utilisation agréée ; il s'agit alors d'une nouvelle utilisation*
- *modification de la structure de l'installation*

(1) - Durée de l'agrément :

Sauf cas particulier, la durée est de 5 ans.

(2) - Possibilité de confidentialité :

“La demande d'agrément signale les informations devant, selon le demandeur, rester confidentielles”.

Ainsi l'exploitant du laboratoire, le cas échéant, pourra adresser, en un exemplaire unique et sous pli séparé, les renseignements dont la diffusion lui apparaîtrait de nature à entraîner la divulgation de secrets en matière commerciale et industrielle et de façon générale, de secrets protégés par la loi. Pour tout renseignement complémentaire s'adresser au Secrétariat de la Commission de Génie Génétique

Le dossier doit être envoyé, en six exemplaires, dont un original, à l'adresse suivante :

Ministère de la Recherche Direction de la recherche Secrétariat de la Commission de Génie Génétique 1 rue Descartes – 75231 PARIS Cedex 05

MINISTERE DE LA RECHERCHE

Cerfa

*NOTICE EXPLICATIVE D'AIDE AU REMPLISSAGE DU
FORMULAIRE DE DEMANDE D'AGREMENT D'UTILISATION (2)
CONFINEE D'ORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES OGM
DES CLASSES 2, 3, 4 (GROUPE II)*

Remarque ; certains tableaux figurant dans le formulaire utilisent des renvois de notes en chiffres arabes et en chiffres romains ; les renvois en chiffres romains font référence à des notes situées en fin de tableau ; les renvois de notes en chiffres arabes font référence aux notes ci-après.

Notes

(1) - Demande d'agrément :

La demande d'agrément peut correspondre à des situations différentes pour les laboratoires :

- soit le laboratoire a fait dans le cadre des mesures transitoires d'application de la loi une "déclaration d'utilisation d'OGM" ayant donné lieu à un classement par la Commission de Génie Génétique (CGG) valable deux ans. Dans ce cas la demande d'agrément doit être déposée avant la fin des deux ans en indiquant le numéro d'enregistrement du dossier et en signalant les éventuelles modifications par rapport au dossier initial.
- soit le laboratoire n'a pas déposé de déclaration d'utilisation. Dans ce cas l'utilisation ne peut pas être mise en œuvre avant d'avoir obtenu l'agrément.

La demande d'agrément peut comporter des projets dont la mise en œuvre est prévue dans un délai de trois ans.

La demande d'agrément porte à la fois sur les protocoles expérimentaux et sur les locaux et leur équipement. Ceux-ci doivent être en conformité avant la demande d'agrément et les expérimentations ne peuvent pas être entreprises sans obtention de l'agrément.

L'agrément varie en fonction des différents types d'utilisation c'est-à-dire en fonction de la nature et du nombre d'OGM, des techniques mises en œuvre mais aussi en fonction de la finalité des projets de recherche.

(1) - Utilisation :

Toute opération ou ensemble d'opérations au cours desquelles des organismes sont génétiquement modifiés ou au cours desquelles des organismes génétiquement modifiés sont cultivés, mis en œuvre, stockés, détruits ou éliminés (le décret 93-774 modifié par le décret 94-527 du 21.6.94 précise les techniques concernées). Pour une utilisation le directeur des travaux est le responsable scientifique de l'utilisation. Il est chargé notamment d'encadrer le personnel qui se trouve sous son autorité scientifique. Les directeurs de travaux peuvent se succéder dans le temps, un seul est désigné pour une plusieurs utilisations agréées en cours.

(2) - Projet :

Le directeur des travaux de recherche peut désigner un ou plusieurs responsables chargés du suivi d'un ou plusieurs projets menés dans le cadre de l'utilisation agréée. Ils sont désignés sous le nom de responsable scientifique.

Une même utilisation peut regrouper plusieurs projets à la condition :

- **qu'ils soient réalisés dans des locaux (un ou plusieurs bâtiments) implantés sur un même site géographique et relevant d'un même exploitant,**
- **qu'ils forment un ensemble cohérent.**

(1) – Classes

Les OGM appartiennent à quatre classes distinctes en fonction des risques qu'ils présentent pour la santé publique ou l'environnement et notamment leur pathogénicité. Une même utilisation peut comporter la mise en œuvre d'OGM relevant de classes de risque différentes. Il convient de consulter les " Principes de classement et guides officiels de la Commission de Génie Génétique " pour une description des classes d'OGM.

Les organismes, en particulier les micro-organismes, génétiquement modifiés font l'objet d'un classement en groupes, en fonction des classes de risque et des critères définis dans le décret 93-774 modifié par les décrets 94-527 du 21.6.94 et 98-18 du 8.1.98.

- **La classe 1** est constituée par des systèmes expérimentaux mettant en œuvre des organismes non pathogènes de classe 1 de risque pour lesquels la nature du vecteur ou de la séquence clonée ne justifie pas une modification de classe de risque.
- **Les classes de risque 2, 3 et 4** sont constituées par des systèmes expérimentaux mettant en œuvre soit des organismes pathogènes, soit des organismes hôtes non pathogènes mais chez lesquels la nature du vecteur et/ou de la séquence clonée peuvent induire une pathogénicité et donc justifier une modification de la classe de risque.

(5) - Exploitant :

On entend par "exploitant", la personne juridique, physique ou morale, responsable des locaux et plus exactement du ou des laboratoires dans lesquels il sera procédé à une ou plusieurs utilisations d'OGM au sens de la loi. L'exploitant peut être une personne morale publique ou privée (CNRS, INSERM, société privée..., représentés par leur directeur, directeur général voire président directeur général) ou une personne physique. Il faut distinguer l'exploitant des locaux qui, en principe, est unique et relativement stable, de la ou des personnes qui dirigent les travaux de recherche plus sujettes à changement.

(6) - Directeur des travaux de recherche :

Le directeur des travaux est le responsable scientifique de l'utilisation. Il est chargé notamment d'encadrer le personnel qui agit sous son autorité scientifique. Les directeurs de travaux peuvent se succéder dans le temps mais un seul est désigné pour une ou plusieurs utilisations agréées en cours. Il peut désigner un ou plusieurs responsables chargés du suivi d'un ou plusieurs projets menés dans le cadre de l'utilisation agréée désignés comme **responsables scientifiques du projet**

(7) - Responsables de la sécurité :

Indiquer le nom et prénoms des personnes responsables du contrôle, de la surveillance et de la sécurité ainsi que leur formation et leurs qualifications.

Pour toutes les unités relevant du CNRS , indiquer l'ingénieur d'Hygiène et de Sécurité de la Délégation Régionale et l'ACMO.

Pour les unités associées, indiquer également l'ingénieur d'Hygiène et de Sécurité de l'organisme contractant.

Pour les unités relevant de l'INSERM, indiquer l'ingénieur d'Hygiène et de Sécurité de l'ADR.

(8) - Locaux et équipements :

Cette description doit permettre d'évaluer l'adéquation des locaux aux prescriptions et doit comporter notamment un plan précis des locaux et la description des éléments techniques (le type des postes de sécurité microbiologique (PSM), l'emplacement des centrifugeuses, congélateurs, autoclaves, les conditions dans lesquelles sont éliminés les déchets et, éventuellement, la présence d'aménagements mobiles). Remplir le(s) tableau(x) 1-1, 1-2, 1-3 selon les cas.(voir la circulaire ministérielle.

(9) - Nature : préciser enseignement, recherche ou développement.

(10) - Modifications :

les modifications par rapport à la déclaration d'utilisation peuvent porter sur :

- le changement du directeur des travaux (directeur d'unité) ou du responsable de projet, dans ce cas le signaler.
- le changement de locaux, dans ce cas le préciser et décrire les nouveaux locaux ;
- des changements d'ordre scientifique. Indiquer l'existence de ces modifications dans le tableau 2 et les détailler de façon claire et précise (au besoin dans un tableau).

exemples :

- *changement de groupes de risque d'OGM dans une même utilisation, que ce changement se produise à la hausse ou à la baisse ;*
- *nouveau projet n'ayant pas de rapport de cohérence avec l'utilisation agréée ; il s'agit alors d'une nouvelle utilisation ;*
- *modification de la structure de l'installation.*

(11) - Durée de l'agrément : sauf cas particulier, demander 5 ans.

(12) - Possibilité de confidentialité :

“La demande d'agrément signale les informations devant, selon le demandeur, rester confidentielles”.

Ainsi l'exploitant du laboratoire, le cas échéant, pourra adresser en un exemplaire unique et sous pli séparé les renseignements dont la diffusion lui apparaîtrait de nature à entraîner la divulgation de secrets en matière commerciale et industrielle et de façon générale, de secrets protégés par la loi..

Pour tout renseignement complémentaire s'adresser au Secrétariat de la Commission de Génie Génétique

Le dossier doit être envoyé, en six exemplaires, dont un original, à l'adresse suivante :

<p>Ministère de la Recherche Direction de la recherche Secrétariat de la Commission de Génie Génétique 1 rue Descartes - 75231 PARIS Cedex 05</p>
