

Les animaleries pour animaux transgéniques : législation et agrément en France

D. DENAIS et A.-D. DEGRYSE

Centre de Recherche Pierre Fabre, Service de Zootechnie, 17, avenue Jean Moulin, F-81106 Castres Cedex

RÉSUMÉ

L'explosion des outils de biologie moléculaire ces dernières années a permis aux scientifiques d'élucider petit à petit la régulation et la fonction des gènes, et ceci aussi bien au niveau moléculaire qu'au niveau de l'organisme entier. En effet, l'avènement de la transgénèse a marqué un tournant majeur dans le domaine de la recherche bio-médicale. Ces expériences ont pour but non seulement une meilleure connaissance des processus physiologiques mais également une meilleure compréhension de certaines pathologies.

Dans cet article, le dispositif législatif et réglementaire mis en place au niveau européen concernant les organismes génétiquement modifiés (OGM) est rappelé ainsi que sa déclinaison au niveau du droit français. Ainsi, en France, dans le cadre de l'expérimentation animale, la création et l'utilisation d'animaux transgéniques fait l'objet de différents agréments. Les étapes à suivre afin d'obtenir ces agréments sont détaillées et justifiées, les principes généraux d'organisation d'une animalerie pour animaux transgéniques sont développés.

MOTS-CLÉS : expérimentation animale - animaux de laboratoire - animal transgénique - OGM - législation.

SUMMARY

Transgenic animal facilities : legislation and required authorisations in France. By D. DENAIS and A.-D. DEGRYSE.

The explosion of molecular biology tools in the last decades has allowed scientists to start elucidating the regulation and the function of genes at the molecular level and also at the level of a living organism. The advent of transgenesis marked a major turning point in the field of biomedical research. These experiments aim not only at a better knowledge of the physiological processes, but also at a better understanding of certain pathologies.

In this article the legal and regulatory dispositions which have been put in place at the European level regarding Genetically Modified Organisms (GMO's) is recalled, as is its transposition into French law. Thus, in France, in animal experimentation, the creation and the use of transgenic animals is subjected to different authorisations. The various steps to follow in order to obtain the required authorisations are detailed and explained and general principles of the organisation of an animal facility housing transgenic animals are developed.

KEY-WORDS : laboratory animal science - transgenic animal - GMO - legislation - authorisation.

Introduction

Les modèles animaux sont essentiels pour comprendre non seulement les mécanismes pathologiques mais aussi l'action thérapeutique d'agents médicamenteux. Les modèles d'animaux mutants spontanés, longtemps utilisés avant que les techniques de transgénèse ne soient disponibles, se sont révélés limités pour différentes raisons telles que le maintien des ces lignées ou leur pertinence. L'avènement de la transgénèse a depuis bouleversé le monde de la pathologie animale en permettant la création de modèles plus pertinents et la transgénèse est en passe de devenir un maillon important de la recherche biomédicale. La souris est le système *in vivo* le

plus utilisé en transgénèse [67] et plusieurs milliers de lignées de souris ont été créées à travers le monde [11].

LA TRANSGÉNÈSE

En 1980, l'équipe de GORDON aux Etats-Unis crée la première souris qualifiée de «transgénique» [30], mais le transgène ne s'avère pas fonctionnel. En 1982, PALMITTER et son équipe obtiennent des souris transgéniques dont le transgène est fonctionnel [63].

Depuis, même si la transgénèse a été appliquée à de nombreuses espèces animales comme le rat [36], le lapin [34], le porc [34], le mouton [34], les poissons [13] et même récem-

ment le singe [12], la souris reste à l'heure actuelle l'espèce la plus utilisée [67]. La souris présente de nombreux avantages par rapport aux autres espèces animales : tout d'abord, certaines techniques de transgénèse ne sont, actuellement, possibles que chez cet animal ; ensuite, la génétique de la souris est bien connue et, finalement, l'entretien et l'élevage des souris s'avèrent relativement peu coûteux [36].

La transgénèse, au sens large, regroupe plusieurs techniques permettant différentes manipulations au niveau du génome : soit l'introduction d'un nouveau gène, soit l'inactivation temporaire ou définitive d'un gène déjà présent [pour revue : 3, 31, 36, 39, 40, 63, 76]. La transgénèse permet ainsi l'étude de gènes particuliers ou encore la création de nouveaux modèles.

Il existe deux termes pour désigner les produits issus de la transgénèse :

- le terme de transgénique est le terme scientifique classique apparu pour la première fois en 1981 [29]. Ce terme désignait alors des souris obtenues suite à une micro-injection de gènes dans le pronucléus d'un zygote [5] ;

- le terme d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) est un terme législatif qui regroupe les organismes obtenus suite à des opérations de recombinaison génétique. Il s'agit d'une dénomination plus globale, regroupant non seulement les animaux transgéniques mais aussi tous les autres types d'organismes obtenus par diverses méthodes de recombinaison génétique [32].

Pour l'obtention d'animaux transgéniques, il existe quatre étapes essentielles quelque soit la technique de transgénèse choisie : l'introduction d'une séquence d'ADN dans un embryon, puis l'implantation de cet embryon dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante, suite à quoi la première génération d'animaux est obtenue (il est alors nécessaire de détecter par diverses méthodes les animaux effectivement transgéniques [56]) et finalement, une lignée transgénique qualifiée de «pure» est obtenue par croisements [36, 40].

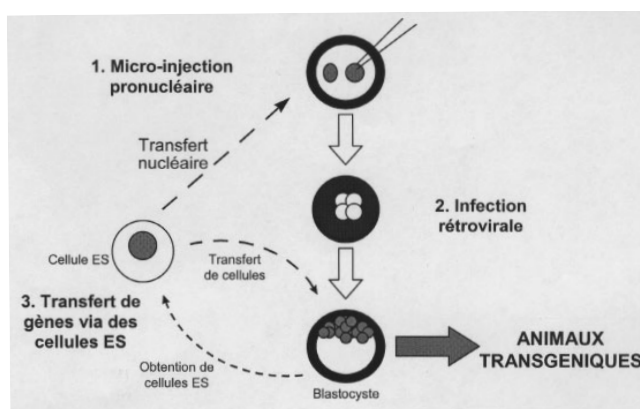


FIGURE 1. — Les 3 principales méthodes de transgénèse [41].

Légende : - Cellule ES = Cellule Embryonnaire Souche ; - Les flèches en pointillé correspondent aux manipulations concernant les cellules ES, les flèches blanches correspondent aux étapes de développement normal d'un zygote en blastocyste ; - Lors du transfert de gènes via des cellules ES, le gène d'intérêt est intégré au génome des cellules ES.

Chez la souris, il existe trois méthodes de transgénèse très largement utilisées (Figure 1) [67] :

- la micro-injection pronucléaire où une solution d'ADN est injectée au niveau d'un des pronucléi du zygote. Il s'agit de la technique utilisée par l'équipe de GORDON en 1981 [29, 30] ;

- l'infection rétro-virale dans laquelle des vecteurs viraux contenant le transgène sont mis en contact avec de jeunes embryons [36, 38, 39, 72] ;

- le transfert de gènes par recombinaison homologue via des cellules ES (cellules embryonnaires souches) [10, 26]. Cette technique peut être améliorée, en matière de ciblage de gènes, par l'utilisation du système Cre-lox, qui est un système de recombinaison homologue très spécifique et très efficace issu d'un phage bactérien particulier [65, 68].

Le rendement en animaux effectivement transgéniques et la pertinence des modèles ainsi créés dépendront de la technique utilisée [9, 10, 36, 40]. Actuellement, la micro-injection pro-nucléaire est la technique la plus communément utilisée [31].

Dans le cadre de la recherche pharmaceutique, les animaux transgéniques sont utilisés principalement soit en tant que modèles de maladies comme l'athérosclérose [27, 47] ou de mécanismes pathologiques comme la douleur [22, 55], soit dans des tests de génotoxicité ou de carcinogénèse [6, 21, 59, 70].

Cependant, leur utilisation est limitée par certains inconvénients tant au niveau pratique qu'au niveau éthique [11, 43]. Au niveau pratique, la standardisation microbiologique et génétique est un gage de réussite, un suivi de ces animaux à ces deux niveaux est essentiel et indispensable [4, 28, 33, 44, 60]. Ainsi, afin d'obtenir des résultats scientifiques valables et exploitables, il est nécessaire de suivre un certain nombre de règles et de recommandations lors de l'utilisation de ces animaux dans des protocoles de recherche [1, 23, 66]. Un suivi sanitaire et génétique doit être mis en place [11, 57, 69], ainsi que des observations régulières des animaux par des personnes compétentes afin de détecter le moindre problème pouvant porter atteinte à leur bien-être [66, 73, 74]. A ces recommandations s'ajoutent également des prescriptions techniques rendues obligatoires par la loi.

LÉGISLATION EUROPÉENNE ET FRANÇAISE EN MATIÈRE D'OGM

Cette législation a comme but la protection de l'homme, de l'environnement et de l'animal [72]. Une distinction entre les termes de «risque» et de «danger» est nécessaire. Le risque est défini comme la probabilité qu'un effet spécifique se réalise dans les conditions expérimentales données. Ce risque correspond à un danger éventuel plus ou moins prévisible. Le danger peut, lui même, revêtir deux aspects : il peut être potentiel ou avéré [14].

Or, les recombinaisons génétiques sont des opérations présentant des dangers et des risques différents plus ou moins connus.

Dans le cadre de l'utilisation des animaux transgéniques, il existe trois types de risques :

- Tout d'abord le risque sanitaire classique d'ordre infectieux [61]. Ce risque découle directement du pouvoir pathogène propre à chaque micro-organisme utilisé pour ces manipulations. Il est directement lié à la pratique de la microbiologie ;

- Le deuxième risque est plus complexe à définir et à prédire, il s'agit du risque découlant de la manipulation génétique [71], par exemple, des recombinaisons non voulues des génomes viraux conduisant à la réactivation d'un virus ;

- Le dernier type de risques concerne spécifiquement les animaux, par exemple le risque encouru si un animal transgénique s'échappe et se multiplie dans l'environnement [37, 58].

Le plus grand problème posé par les OGM est le fait que ces risques sont difficiles à définir et cerner avec précision rendant leur évaluation difficile. Ces différents paramètres doivent donc être pris 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 (risque de dissémination de produits génétiquement modifiés) et bien sûr la protection des animaux au cours des protocoles expérimentaux (souci d'éthique) [7, 35, 64].

Afin de prévenir des accidents possibles, il est nécessaire de mettre en place différentes mesures à la fois pour réduire non seulement les sources de risques (par exemple par le biais de l'utilisation de souches virales défectives) mais aussi l'exposition à ces mêmes sources de risques (ce qui peut être fait par le biais du confinement physique ou du respect des règles d'hygiène et sécurité) [41, 42, 75].

Au niveau de la législation européenne, deux textes concernent spécifiquement les OGM, ce sont deux directives datant de 1990 : la Directive 90/219/CEE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) [19] et la Directive 90/220/CEE relative à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement [20].

Dans le cas des animaux transgéniques utilisés en recherche, seule la Directive 90/219/CEE a cours [19]. Bien que cette Directive ne s'applique qu'aux MGM, elle a servi de base à la rédaction des textes français réglementant l'utilisation des animaux transgéniques. Lors de la transposition de ce texte en droit national, la France, comme d'autres pays de l'Union Européenne, a choisi d'élargir le champ d'application à tous les OGM. Il est également important de noter que ces deux Directives ont été modifiées par d'autres textes afin de s'adapter aux progrès réalisés dans les connaissances des manipulations génétiques et de leurs risques [16, 17, 19].

La Directive 90/219/CEE énonce les principes minimaux que les États membres de la CEE doivent appliquer dans le cadre d'utilisation confinée de MGM. Cette Directive est entrée en vigueur le 23 octobre 1991. Elle a été modifiée par la Directive 98/81/CE [17] et elle est complétée par la Décision du Conseil 2001/204/CE [16]. Il est à noter que la Directive 98/81/CE n'a pas encore été transposée en droit français.

L'objectif de la Directive 90/219/CEE est de limiter les effets négatifs des MGM sur la santé et l'environnement, de

prévenir les accidents et de gérer les déchets. Ces objectifs ne pourront être atteints que par le biais de mesures communes à tous les États membres pour évaluer les risques et les diminuer par des conditions d'utilisation appropriées. Il est donc nécessaire que la législation permette la mise en place de références communes d'évaluation des risques. Cependant, il est important de noter qu'en raison de la jeunesse des techniques de transgénèse et du manque de recul sur les risques encourus, l'évaluation doit être faite parfois au cas par cas.

Ainsi la Directive 90/216/CEE met en exergue trois notions importantes qui seront reprises dans la législation française [32, 48] : l'évaluation du risque, la notification de l'utilisation d'OGM et le respect de mesures de confinement.

Le but de l'évaluation est de classer les opérations dans lesquelles des OGM interviennent en fonction des dangers et risques encourus. Il en résulte une classification des opérations en 4 classes de risque, la classe 1 correspondant aux opérations dénuées de tout danger et la classe 4 aux opérations présentant un danger avec un risque élevé.

Un autre point important de la législation concerne la notification de l'utilisation d'OGM : elle est obligatoire et préalable à toute utilisation d'OGM. Elle correspond à la présentation aux autorités compétentes (organismes désignés par les États membres et en charge de la mise en œuvre des mesures prévues par la Directive) d'un certain nombre d'informations. La nature de ces informations sera fonction de la classe de risque de l'OGM en question telle que l'utilisateur l'aura déterminé. Ces informations doivent permettre à l'autorité compétente de valider ou non cette classification.

Une fois la classification effectuée, il convient de mettre en place les différentes mesures de confinement exposées en annexe de la Directive et reprises dans la législation française. Les mesures de confinement sont évidemment plus ou moins strictes selon la classe de risque. Une inspection et un contrôle des installations doivent être organisés par les autorités compétentes afin de vérifier leur conformité.

Au niveau français, l'utilisation des animaux transgéniques en recherche biomédicale et pharmaceutique n'est donc pas régie par une seule législation spécifique, elle répond à deux législations : celle concernant les OGM et celle concernant l'expérimentation animale.

- Tout d'abord en ce qui concerne la législation de l'expérimentation animale, les textes français, et notamment le décret 87-848 du 19 octobre 1987 [52] modifié par le décret 2001-464 du 29 mai 2001 [51], correspondent à la transposition de la Directive 86/609/CEE [18]. Cette Directive est fondée sur la Convention Européenne ETS 123, texte émanant du Conseil de l'Europe [15] ;

- Dans la législation concernant les OGM, les grands principes énoncés auparavant dans la législation européenne sont repris : évaluation et classement, mesures de confinement et notification. Il est important de noter que d'autres textes seront également utiles dans ces démarches: le guide de classement de la Commission de Génie Génétique (CGG) [14] ainsi que différents textes normatifs édités par l'AFNOR (Agence Française de Normalisation) [2]. Le guide de la CGG permet à l'utilisateur de réaliser l'évaluation des

risques, il reprend donc les principes présents dans la Directive 90/219/CEE en les adaptant aux choix de classement faits par la France [19].

La Loi n° 92-654 du 13/07/92 correspond à la transposition en droit français des Directives 90/219/CEE et 90/220/CEE [32]. Elle comporte différentes dispositions. Tout d'abord, des dispositions générales dans lesquelles sont reprises les différentes définitions déjà présentes dans les textes européens et la désignation des autorités compétentes (Ministère de la Recherche dans le cadre de l'utilisation confinée, Ministère de l'Environnement dans le cadre de la dissémination volontaire). La loi désigne également les deux Commissions consultatives que sont la Commission de Génie Génétique (CGG) et la Commission d'Étude de la Dissémination des produits issus du Génie Biomoléculaire (CGB). Ensuite, sont présentées des dispositions plus spécifiques concernant l'utilisation confinée des OGM. Elles reprennent les principes de classement en deux groupes (groupe I regroupant ceux ne présentant aucun risque c'est-à-dire les OGM de classe 1 et groupe II tous les autres c'est-à-dire les OGM de classes 2, 3 et 4). Cette classification en deux groupes correspond à la classification telle que la Directive 90/219/CEE la proposait initialement avant sa modification par la Directive 98/81/CE [17, 19]. Des dispositions spécifiques concernant la dissémination volontaire et la mise sur le marché d'OGM sont également énoncées.

Deux Décrets 93/773 et 93/774 ont été édités en application de cette loi. Le Décret 93/773 concerne les applications des dispositions civiles. Il s'agit des détails concernant les agréments (demande, examen, délivrance) mais également les contrôles, les sanctions et les dispositions transitoires [48]. Le Décret 93/774 expose la liste des techniques de modifications génétiques et les critères de classement des OGM [49]. Ce dernier Décret a été modifié en 1994 par le Décret 94/527 [53].

A cela s'ajoute un Arrêté, daté du 27/12/94, qui énonce les différents renseignements que le dossier de demande d'agrément doit contenir [54].

L'ensemble de ce corpus législatif est explicité dans la circulaire du Ministère chargé de la Recherche datée du 16 Avril 1996 [50] (Figure 2). L'utilisation confinée d'OGM est subordonnée au respect par l'exploitant et l'utilisateur de 4 obligations (Figure 3) :

- obligation de déclaration auprès du Ministère chargé de la Recherche préalable à toute utilisation: l'agrément ;
- obligation d'information non seulement vis-à-vis du public lors de la première demande d'agrément pour utilisation d'OGM de classes de risques 3 ou 4 mais également vis-à-vis du Ministère de la Recherche dans différents cas, comme le changement d'exploitant ou de directeur des travaux de recherche ;
- obligation de consultation de la Commission de Génie Génétique afin de s'assurer que la classification proposée par l'utilisateur est adéquate par rapport aux manipulations entreprises ;

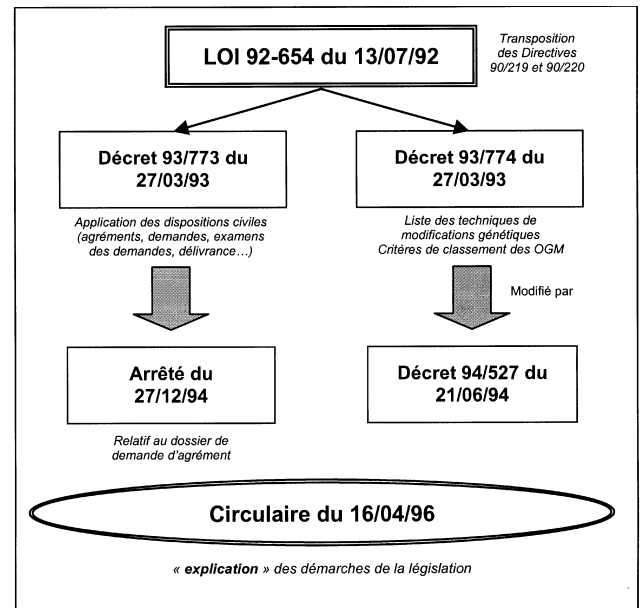


FIGURE 2. — Schéma explicatif des différents textes législatifs français en matière d'utilisation confinée d'animaux transgénétiques.

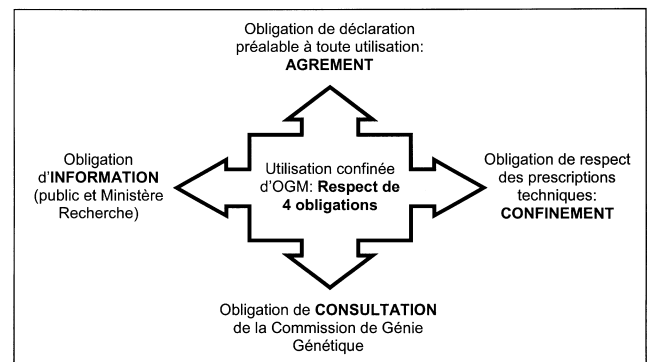


FIGURE 3. — Les Obligations de l'utilisation confinée d'OGM. Dans le cadre d'une utilisation confinée d'OGM, l'utilisateur est soumis au respect de 4 obligations.

- obligation de confinement avec respect de certaines prescriptions techniques, les prescriptions techniques étant fonction du groupe de risque de l'OGM utilisé.

LA MISE EN PLACE D'UNE ANIMALERIE POUR ANIMAUX TRANSGÉNIQUES

En France, lors de l'utilisation d'animaux transgénétiques à des fins de recherche, de développement ou d'enseignement, deux législations sont donc à prendre en compte. Chacune de ces législations édicte des principes auxquels le laboratoire doit se conformer [24, 25]. A cela s'ajoute également pour chacune la demande obligatoire par le laboratoire d'un agrément particulier. Ainsi une animalerie pour animaux transgénétiques doit répondre aux principes généraux d'une animalerie standard tout en incluant les particularités des animaleries pour animaux transgénétiques au niveau des prescriptions techniques et notamment le confinement [14].

Selon la nature des modifications génétiques réalisées (utilisation de vecteurs viraux, micro-injection, manipulation de cellules ES...), les animaux doivent être hébergés dans des

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

TABLEAU I. — Classement des animaux transgéniques [14].

Remarques : Le classement des particules virales en différentes classes est basé sur la liste arrêtée par le Ministère du Travail (Arrêté du 18 juillet 1994, JO du 30 juillet 1994, modifié par l'Arrêté du 30 juin 1998, JO du 22 juillet 1998).

Le transfert de gènes peut, selon la méthode utilisée, s'accompagner d'un relargage transitoire ou non de particules virales. Les animaux doivent alors être maintenus dans des conditions de confinement correspondant à la classe du vecteur viral mis en jeu. Pendant la période d'élevage qui suit, les animaux transgéniques ne pouvant plus relarguer de particules virales peuvent dès lors être déclassés et maintenus dans des conditions de confinement moins contraignantes. Cependant lors des prélèvements d'organes, ils sont susceptibles de relarguer de nouveau des particules virales, ces manipulations doivent alors être effectuées dans les conditions de confinement initiales.

conditions de confinement différentes. Les animaux transgéniques sont donc classés en 4 classes (1 à 4) en fonction des risques qu'ils présentent et selon la nature des modifications génétiques (Tableau I). Comme la grande majorité des souris transgéniques utilisées dans des protocoles expérimentaux sont obtenues par micro-injection, elles sont considérées comme appartenant à la classe 1 [35, 40, 42, 45].

A chaque classe d'animaux correspond un type d'animalerie avec des prescriptions techniques de confinement précises et de plus en plus strictes selon la classe [14] (Tableau II).

Les animaleries A1 correspondent à des animaleries dites «conventionnelles» avec des dispositifs particuliers empêchant la fuite des animaux. A cela s'ajoute également le fait que les animaux transgéniques avérés ou non doivent être séparés des animaux non transgéniques et que les animaux utilisés devront être éliminés à la fin des expériences [45].

Les animaleries A2 à A4 ont en plus des caractéristiques des animaleries A1 des dispositifs spécifiques détaillés dans les textes législatifs et dans le guide de la Commission de Génie Génétique [14].

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 [32, 48]. Un agrément correspond à une combinaison précise d'éléments : OGM utilisé, installation, utilisateur. Il est donné pour un lieu précis (site géographique unique) avec une ou plusieurs installations possibles. Il désigne également des étapes, des méthodes, des responsables et des opérateurs. Il est également accordé pour une durée limitée. Ce document doit permettre, par le biais du dossier technique, le classement des manipulations selon les 4 classes de risque. Il est délivré par le Ministre chargé de la Recherche après accord tacite du Ministre chargé de l'Environnement. Avant de débiter toute demande d'agrément, il est nécessaire d'établir

avec précision son projet et notamment de déterminer quel groupe (I ou II) d'OGM sera utilisé.

Une première demande d'agrément doit être faite lorsque aucune utilisation d'OGM du groupe demandé n'a été entreprise ou lorsque aucun agrément n'a déjà été 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.

Toutes ces modalités sont décrites dans le décret 93-773 [48]. Il existe deux types de formulaire de type Cerfa selon le groupe d'OGM en question (document Cerfa n° 11674*01 pour le groupe I et document Cerfa n° 11675*01 pour le groupe II). Cependant, ces deux formulaires diffèrent peu, leur seul point de différence étant la nécessité de fournir, dans le cas d'une utilisation d'OGM de classe 3 ou 4, une description des sources potentielles de risque dues à l'emplacement du laboratoire ainsi que les conditions météorologique prédominantes.

Ces deux formulaires rassemblent l'ensemble des renseignements pouvant être nécessaires à l'examen des dossiers par la Commission de Génie Génétique (CGG). Toutes les rubriques doivent être renseignées et notamment les nombreux tableaux qui facilitent l'évaluation synthétique de la conformité des locaux.

Une fois le dossier rempli, le demandeur envoie au Ministère chargé de la Recherche l'original ainsi que le nombre de copies requises. 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 le refus de l'agrément (Figure 4).

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

TABLEAU II. — Les différents types de confinement [14].

Les types L2, L3 et L4 de locaux mentionnés ci-dessus sont basés sur un arrêté définissant les niveaux de confinement minimum à mettre en oeuvre dans les laboratoires de recherche, de développement et d'enseignement où sont utilisés des agents biologiques pathogènes des groupes 2, 3 ou 4. Cependant, compte tenu des risques particuliers des OGM, la définition des niveaux de confinement L1, L2, L3 et L4 est plus contraignante.

Cette classification concerne l'agencement du laboratoire, les équipements et les bonnes pratiques de travail. (L2 : animaux maintenus dans des enceintes ne permettant pas la diffusion de particules virales, inactivation par autoclavage des déchets et des animaux, etc. ; L3 : local sous pression négative et muni d'un sas, air sortant à travers des filtres HEPA, inactivation des déchets et des animaux par autoclavage dans le local, etc. ; L4 : local sous pression négative et muni d'un sas, air entrant et sortant à travers des filtres HEPA, systèmes de ventilation et électrique de secours, inactivation des déchets et des animaux par autoclavage dans le local, accès protégé des agents biologiques stockés, etc.)

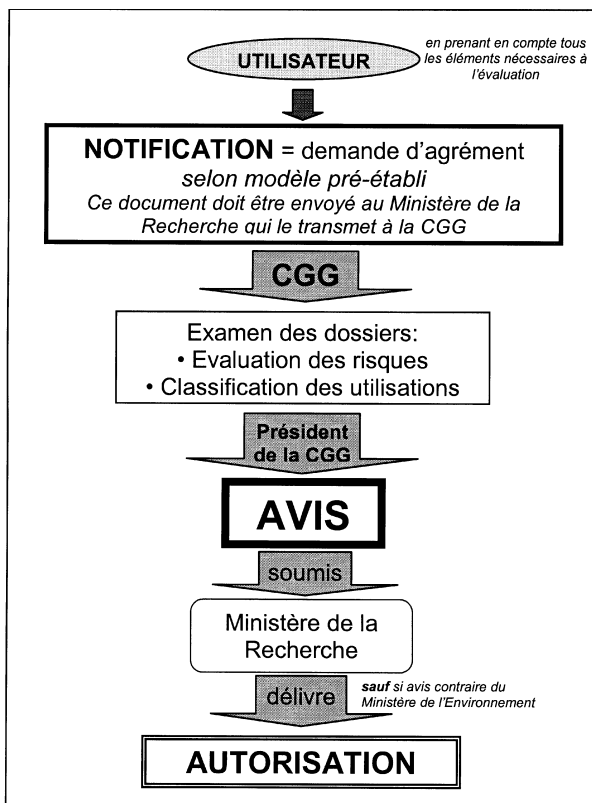


FIGURE 4. — Déroulement de l'obtention de l'agrément (CGG = Commission de Génie Génétique).

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

Une fois le dossier enregistré et 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. La CGG a pour rôle d'expertiser le dossier (qui lui est envoyé dans ce but par le Ministère chargé de la Recherche) et elle dispose d'un délai de 60 jours à partir de la date d'enregistrement pour faire connaître son avis. Le but de cette expertise est de vérifier non seulement si le classement de l'OGM est correct mais également si les locaux sont bien adaptés aux risques présentés par l'OGM. Pour mener à bien l'expertise, la CGG 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. D'autre part, la CGG se doit de garder confidentielles toutes les informations du dossier.

Suite à cette expertise, la CGG 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.

Le niveau de confinement peut être différent du classement de l'OGM 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 s'il est fait mention d'un confinement L2, cela ne signifie pas que l'agrément est valable pour des OGM de groupe II.

La CGG émet son 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.

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. En cas de réponse positive, l'exploitant reçoit une décision portant agrément pour une durée de validité indiquée (en général 5 ans). En cas de refus, le Ministre doit expliquer sa décision. En effet, l'agrément n'est accordé que si l'installation est en conformité avec le classement proposé par la CGG.

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

En cas de modification d'un projet déjà agréé, deux cas sont à prendre en compte. Dans le cas de projet mettant en jeu des OGM de groupe I, l'exploitant du laboratoire se doit de tenir un ou plusieurs registres chronologiques dans lesquels seront consignés toute modification ou tout incident concernant l'utilisation. Dans le cas de projet mettant en jeu des OGM de groupe II, plusieurs cas sont à prendre en considération. Avant toute modification du projet (comme par exemple un changement de technique), l'exploitant doit en informer par lettre le Ministère de la Recherche. Selon l'impact que les modifications entreprises pourront avoir sur les conditions d'utilisation des OGM, il pourra être nécessaire de refaire une demande d'agrément, comme c'est par exemple le cas lors d'une modification de la structure des locaux.

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 : par exemple durée de l'agrément arrivant à expiration, interruption de l'utilisation agréée pendant au moins deux ans ...

Pour un renouvellement d'agrément, le dossier de demande est le même, mais les délais d'instruction diffèrent : le délai de décision est raccourci de 90 jours à 60 jours. La CGG 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, la décision doit être motivée.

Conclusion

Les animaux transgéniques sont en passe de devenir des outils performants pour 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 de l'animal.

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, de développement ou d'enseignement est subordonnée au respect d'une législation relativement récente au niveau européen et français.

En fournissant un cadre juridique à ces nouvelles techniques à grand 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, plus 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) qui ont choisi de transposer et d'étendre la Directive européenne à tous les organismes (et non pas seulement aux micro-organismes).

Bibliographie

1. — AALAS (The American Association for Laboratory Animal Science) : Health Care of Genetically Altered Animals, *Comparative Medicine*, 2000, **50** (5), 482.
2. — AFNOR : Biotechnologies - Liste des espèces microbiennes communément reconnues comme pathogènes pour l'homme, Norme NF X 42-040, Paris, La Défense, 1990.
3. — BABINET C. and COHEN-TANNOUDI M. : Vingt ans d'interventions délibérées sur le génome de la souris, *Médecine/sciences*, 2000, **16** (1), 31-42.
4. — BAKER D.G. : Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats and Rabbits and their Effects on Research. *Clinical Microbiological Review*, 1998, **11** (2), 231-236.
5. — BEARDMORE J.A. : Transgenics, autotransgenics, and allotransgenics : *Transgenic Research*, 1997, **6**, 107-108.
6. — 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., HOUEBINE L.M., VAN KREIJL C.F., VAN DER MEER M., REINHARDT C.A., WOLFE E. and 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.
7. — BONNOD J. : Ethique en expérimentation animale. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1992, **17**, 201-205.
8. — BRINSTER R.L., ALLEN J.M., BEHRINGER R.R., GELINAS R.E. and PALMITER R.D. : Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 836-840.

9. — BRINSTER R.L., CHEN H.Y., TRUMBAUER M.E. and 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.
10. — CAPECCHI M.R. : Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, **244**, 1288-1292.
11. — CARVALLO D., CANARD G. and TUCKER D. : Standardization of Transgenic Lines : from Founder to an Established Animal Model. In : HOUEBINE L.M., *Transgenic Animals. Generation and Use*, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 403-409.
12. — CHAN A.W.S. and CHONG K.Y., MARTINOVITCH C. *et al* : Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 2001, **29**, 309-312.
13. — CHEN T.T. and POWERS D.A. : Transgenic fish. *Trends in Biotechnology*, 1990, **8**, 209-215.
14. — 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/>
15. — 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>
16. — 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.
17. — 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.
18. — CONSEIL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES : Directive 86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États 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.
19. — 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.
20. — 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.
21. — CONTRERA J.F. : Transgenic Animals : Refining the Two-Year Rodent Carcinogenicity Study. *Lab Animal*, 1998, **27** (2), 30-33.
22. — 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. and HUNT S.P. : Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, 1998, **392**, 394-397.
23. — DETOLLA L.J., STUM, K.C. and ALLEN E.D. : Transgenic Animal Care and Treatment. *Lab Animal*, 1994, 24-25.
24. — DONAS, B. : Conception et réalisation d'animaleries d'expérimentation animale en accord avec les législations et réglementations actuellement en vigueur. Thèse de doctorat vétérinaire, 180 pages, École Nationale Vétérinaire de Lyon, 1992.
25. — ELOIT M. : Principes de la réglementation française en matière d'expérimentation animale. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 1992, **17**, 151-154.
26. — EVANS M.J. and KAUFMAN M.H. : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**, 154-156.
27. — FAZIO S. and LINTON M.R. : Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience*, 2001, **6**, 515-525.
28. — FELASA Working Group on Animal Health : FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea-pig and rabbit experimental units. *Laboratory Animals*, 1996, **30**, 193-208.
29. — GORDON J.W. and RUDDLE F.H. : Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 1981, **214**, 1244-1246.
30. — GORDON J.W., SCANGOS G.A., PLOTKIN D.J., BARBOSA J.A. and RUDDLE F.H. : Genetic transformation of mouse embryos by micro-injection of purified DNA. *PNAS USA*, 1980, **77**, 7380-84.
31. — GORDON J.W. : Transgenic Technology and Laboratory Animal Science. *ILAR Journal*, 1997, **38** (1), 32-41.
32. — 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.
33. — 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.
34. — HAMMER R.E., PURSEL V.G., REXROAD C.E., WALL R.J., BOLT D.J., EBERT K.M., PALMITER R.D. and BRINSTER R.L. : Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by micro-injection. *Nature*, 1985, **315**, 680-3.
35. — HOUEBINE L.M. : Ethical implications of knock-out and transgenic techniques for animal research. In : CRUSIO W.E., GERLAI R.T. (éd.) : *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences, vol. 13)*, Elsevier Science BV, 1999, 936-948.
36. — HOUEBINE L.M. : Les animaux transgéniques (1ère édition), 181 pages, Tec&Doc Lavoisier, Paris, 1998.
37. — HOUEBINE L.M. : The Biosafety Problems of Transgenic Animals. In : HOUEBINE L.M. : *Transgenic Animals. Generation and Use*, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 559-562.
38. — JAENISCH R. : Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney Leukemia virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, **73** (4), 1260-1264.
39. — JAENISCH R. : Transgenic Animals. *Science*, 1988, **240**, 1468-1474.
40. — JALLAT S. : Les souris transgéniques. *Biofutur*, Juin 1991, **45**, 3-11.
41. — JANNE J. and 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, 1996, 41-44.
42. — LAINE J. and SIMONS J. : Expérimentation et animaux transgéniques : état actuel de la réglementation française. *Sci Tech Anim Lab*, 1996, **21**, 53-60.
43. — LAKE J.P., HAINES D., LINDER C. and DAVISSON M. : Dollars and Sense : Time and Cost factors critical to establishing genetically engineered mouse colonies. *Lab. Animal*, 1999, **28** (8), 24-31.
44. — 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.
45. — MARTI S. : Hébergement des animaux transgéniques de classe A1. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 2001, **24**, 81-83.
46. — MC CREATH K.J., HOWCROFT J., CAMPBELL K.H.S., COLMAN A., SCHNIEKE A.E. and KIND A.J. : Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, **405**, 1066-1069.
47. — MILLER M.W. and RUBIN E.M. : Transgenic Animals in Atherosclerosis Research. In : HOUEBINE L.M., *Transgenic Animals. Generation and Use*, Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997, 445-448.
48. — 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.
49. — 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.
50. — 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.
51. — 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.
52. — 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

53. — MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR 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.
54. — MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR 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.
55. — MOGIL J.S. and GRISEL J.E. : Transgenic studies of pain. *Pain*, 1998, **77**, 107-128.
56. — 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.
57. — MONASTERCKY G.M. and GEISTFELD J.G. : The Production and Verification of Transgenic Mouse Strain. *Lab Animal*, 1997, 36-40.
58. — MUIR W.M. and 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.
59. — 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.
60. — NATIONAL RESEARCH COUNCIL : Infectious Disease of Mice and Rats, 397 pages, National Academy Press, Washington D.C., U.S.A., 1991.
61. — NATIONAL RESEARCH COUNCIL : Occupational Health and Safety in the Care and Use of Research Animals, 154 pages, National Academy Press, Washington D.C., USA, 1997
62. — PINKERT C.A. : The History and Theory of Transgenic Animals. *Lab Animal*, 1997, 29-34.
63. — PALMITER R.D., BRINSTER R.L., HAMMER R.E., TRUMBBAUER M.E., ROSENFELD M.G., BIRNBERG N.C. and EVANS, R.M. : Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, **300**, 611-615.
64. — POOLE T.B. : Welfare considerations with regard to transgenic animals. *Animal Welfare*, 1995, **4**, 81-85.
65. — RAMIREZ-SOLIS R., LUI P. and BRADLEY A. : Chromosome engineering in mice. *Nature*, 1995, **378**, 720-724.
66. — ROSEWALL I. : Introduction to Using Transgenic Mice in Research. *LASA Good Practice Guidelines*, 2001, **2** (1), 1-4.
67. — ROTH S.J.B., FOXWORTH W.B., MCARTHUR M.J., MONTGOMERY C.A. and 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.
68. — SAUER B. and 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.
69. — SEBESTENY A., MILITE G. and MARTELOSSI P. : Microbiologically monitored fumigation of a new built SPF laboratory rodent facility. *Laboratory Animals*, 1992, **26**, 132-139.
70. — SILLS R.C., FRENCH J.E. and CUNNINGHAM M.L. : New models for assessing carcinogenesis : an ongoing process. *Toxicol. Lett.*, 2001, **120** (1-3), 187-9.
71. — SMITH M.W. : Genetically modified (transgenic) animals. *In* : WOOD M., SMITH M.W. : Health and Safety in Laboratory Animal Facilities, Laboratory Animals Ltd, London, 1999, 93-106.
72. — STUHLMANN H., CONE R., MULLIGAN R.C. and 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
73. — VAN DER MEER M., BAUMANS V. and 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.
74. — VAN DER MEER M., ROLLS A., BAUMANS V., OLIVIER B. and VAN ZUPHTEN L.F.M. : Use of score sheets for welfare assessment of transgenic mice. *Laboratory Animals*, 2001, **35** (4), 379-389.
75. — VIDAL D.R., PAUCOUD J-C., THIBAUT F. and ISOARD P. : Biosécurité au laboratoire - Risque biologique, normalisation et pratique. *Ann. Pharmaceutiques Françaises*, 1993, **51** (3), 154-166.
76. — WIGH, D.C. and WAGNER T.E. : Transgenic mice : a decade of progress in technology and research. *Mutation Research*, 1994, **307**, 429-440.