

## **Commission de Génie Génétique - Commission du génie biomoléculaire**

### **Avis sur la dispersion potentielle des gènes de résistance aux antibiotiques**

#### **Objet de la réflexion**

La Commission du génie biomoléculaire et la Commission du génie génétique ont organisé un séminaire sur la dispersion potentielle des gènes de résistance aux antibiotiques afin d'apporter une contribution scientifique au débat public sur cette question. Des experts de diverses disciplines (médecine humaine et vétérinaire, microbiologie et génétique) ont été associés à ce travail. La question centrale à laquelle les experts se sont attachés à trouver des éléments de réponse est de savoir si les gènes de résistance à des antibiotiques, notamment à l'ampicilline, présents dans le génome d'une plante transgénique sont susceptibles, dans les situations bio-écologiques naturelles, de se retrouver dans des bactéries et de conduire à une extension des résistances aux antibiotiques dommageable à la santé humaine et animale ?

#### **Contexte environnemental**

L'analyse de la flore bactérienne du sol révèle une fréquence relativement importante de gènes de résistance à des antibiotiques dont celle à l'ampicilline. La consommation de produits végétaux frais sur lesquels sont présentes des bactéries épiphytes (notamment des bactéries du sol) conduit déjà à l'ingestion de ces gènes. Il en résulte que des bactéries comportant des gènes de résistance à des antibiotiques sont présentes, au moins de manière transitoire, dans le tractus digestif humain ou animal.

Dans le monde bactérien, les plasmides sont d'importants supports et vecteurs de gènes de résistance à des antibiotiques. Ils sont classés selon leur mode de répllication et leur spectre d'hôte, large ou étroit (capable de se multiplier dans une grande diversité de souches bactériennes ou, au contraire, dans un nombre restreint, en fonction de l'espèce bactérienne).

Les flores bactériennes habituelles sont donc riches en gènes de résistance à des antibiotiques, en particulier à l'ampicilline. Elles constituent des réservoirs naturels importants de ce type de gène.

#### **Echanges génétiques chez les bactéries**

Des échanges de gènes entre différentes espèces bactériennes peuvent se produire suivant différents mécanismes. Dans ce cadre, c'est notamment la recombinaison qui du fait d'homologies plus ou moins importantes entre les séquences d'ADN bactériens permettent des échanges de gènes. La fréquence de ces événements de recombinaison diminue avec l'augmentation de la divergence entre les séquences d'ADN exogènes et endogènes. L'analyse des génomes et en particulier celui d'*Escherichia coli* K12, témoigne de tels transferts.

Cependant, des mutations dans le système de contrôle de l'intégrité des génomes sont connues et l'on ne peut donc pas exclure que dans certaines situations, même en présence de divergences de séquences importantes, des échanges génétiques entre bactéries " éloignées " puissent avoir lieu.

Ces échanges génétiques peuvent également conduire à des remaniements des génomes et ainsi permettre de fournir le promoteur nécessaire à l'expression de gènes qui sans quoi ne s'exprimeraient pas. Cette remarque est d'autant plus importante à considérer que beaucoup de gènes de résistance sont situés sur des " cassettes géniques " dépourvues de promoteur, portées par des intégrons.

On peut considérer qu'au cours de l'évolution, de nombreux échanges génétiques sont intervenus. La spéciation a, cependant, conduit à une réduction considérable des capacités de transferts génétique horizontaux.

#### **Facteurs influençant le succès des échanges génétiques**

Le taux de réussite des échanges de gènes chez les microorganismes est influencé par différents éléments comme la compétence bactérienne à la transformation. Cette compétence correspond à une phase bactérienne d'aptitude accrue à l'intégration stable de structure d'ADN étrangère.

Les éléments mobiles tels que les transposons et les séquences d'insertion associées aux éléments génétiques améliorent les échanges d'informations génétiques entre espèces bactériennes. Ces éléments mobiles peuvent aussi bien se situer sur des chromosomes que sur des plasmides.

Ce qui fait qu'un gène transposable dispose d'une capacité de mobilité en différents points du chromosome, mais aussi d'intégration sur les éléments indépendants et autonomes que sont les plasmides. Dès lors que ce plasmide est de type conjugatif, la capacité de mobilité des éléments génétiques entre bactéries est amplifiée.

Les gènes de résistance aux antibiotiques proviennent donc probablement de bactéries du sol. Ces gènes se sont transférés à d'autres bactéries vraisemblablement à partir du moment où ils se sont insérés sur des plasmides conjugatifs, mobilisables ou cotransférables, ainsi que sur des transposons.

#### **Echanges génétiques entre génomes de plantes et bactéries**

Le retour de séquences d'ADN bactérien (essentiellement plasmidique) intégrées dans le génome d'une plante transgénique, vers le génome d'une bactérie n'a jamais été mis en évidence expérimentalement à ce jour. Les phénomènes de retour de séquences d'ADN bactérien ne peuvent être totalement exclus mais sont fortement limités par des facteurs comme la dégradation de l'ADN et la dormance des bactéries ou la capacité d'autorépllication de l'ADN introduit. Par exemple, le transfert d'un gène d'un génome de plante vers un microorganisme spécifique des bovins, ne peut actuellement être évalué que de manière théorique, les calculs suivants les hypothèses retenues montrent une probabilité extrêmement faible voire nulle (inférieure à la limite de détection de 10<sup>-16</sup> ou inférieure à 10<sup>-20</sup> suivant les modèles retenus).

#### **Capacité d'élargissement du spectre d'action**

L'utilisation de certains gènes de résistance dans les constructions de plantes transgéniques risque-t-il de conduire à un élargissement du

spectre d'action de ces gènes vis-à-vis d'autres antibiotiques du fait de mutations ?

Les premières b-lactamases identifiées en 1947, peu après l'introduction de la pénicilline G, ne détruisaient que celle-ci. On a vu apparaître en 1964 des b-lactamases, à spectre élargi, codées par le gène plasmidique "bla". Il a été possible, de générer par mutation ponctuelle dirigée une soixantaine de variants, dégradant même les céphalosporines de troisième génération. Ainsi, des mécanismes de résistances apparaissent dans les bactéries quelques années seulement après l'introduction d'une nouvelle génération d'antibiotiques.

Les controverses dans le débat public correspondent, en fait, à des événements qui s'étaient déjà produits dans les bactéries. Ces événements se sont produits bien avant la mise sur le marché de plantes transgéniques ou leur expérimentation dans l'environnement.

### Rôle de la pression de sélection

La pression de sélection joue un rôle fondamental dans tous les processus décrits précédemment, particulièrement le maintien dans le nouvel hôte des gènes qui y sont transférés et leur variation par mutation. Cet aspect est essentiel quant au retour possible de gènes intégrés dans les plantes vers des bactéries.

Même si on peut considérer que, dans les sols, la présence d'antibiotiques exerçant une forte pression de sélection est faible, au niveau de micro-niches écologiques la concentration en antibiotiques produits par des microorganismes peut-être suffisamment élevée pour permettre l'apparition et le maintien de gènes de résistance bactériens.

L'utilisation massive d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire a des conséquences importantes sur ce point. Elle conduit à exercer une pression de sélection forte qui favorise l'émergence de gènes de résistance à des antibiotiques, anciens et nouveaux chez des bactéries. Une telle utilisation est à l'origine de l'apparition de multi-résistances et de modifications de spectres d'hôtes bactériens.

L'utilisation d'antibiotiques en tant que facteurs de croissance en alimentation animale conduit également à exercer une pression de sélection sur les flores bactériennes animales. Il convient toutefois de rappeler à ce stade qu'il n'y a pas d'évidence de transfert de gènes de résistance aux antibiotiques chez l'animal vers des bactéries présentes dans les flores bactériennes humaines.

Ainsi, la pression de sélection (l'utilisation d'antibiotique) est un élément déterminant de l'évaluation du risque, car elle amplifie les possibilités d'émergence de nouvelles résistances par transferts de gènes. Toutefois, la probabilité d'une telle émergence dans le cas du transfert de gènes de plante vers des bactéries ne saurait être que très faible et sans comparaison en matière de risque, avec celle liée à l'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire. Les conséquences d'un tel transfert sont d'autant moins importantes que le gène de résistance aux antibiotiques considéré est largement présent dans les flores bactériennes, c'est le cas du "bla" et le gène "nptII".

### Identifier des gènes de moindre valeur médicale

Les gènes de résistance à des antibiotiques les plus fréquents utilisés comme marqueurs de sélection dans les étapes de construction des différents organismes génétiquement modifiés sont nombreux. On peut dès lors essayer de déterminer parmi ces gènes, ceux qui seraient les meilleurs à utiliser dans les biotechnologies végétales.

Le gène codant pour la b-lactamase serait parmi ceux-là si l'on considère qu'il est de loin le gène de résistance le plus répandu dans le monde bactérien. Cependant, le fait que l'antibiotique qui lui correspond appartient à la classe des ampicillines dont l'utilisation reste importante en médecine humaine, engage à limiter les recours à ce gène dans les constructions génétiques.

En revanche pour le gène de résistance à la kanamycine (nptII), antibiotique qui n'est pratiquement plus utilisé en médecine humaine et vétérinaire, rien ne semble s'opposer à son éventuelle utilisation dans les étapes de construction d'un organisme génétiquement modifié.

### Conclusion générale

L'étude des différents modes de transmission de gènes entre les espèces montre que :

- Les échanges de gènes entre bactéries sont fréquents,
- des échanges de gènes d'une bactérie vers une plante pourraient exister,
- des échanges de gènes d'une plante vers une bactérie n'ont jamais été mis en évidence expérimentalement. On peut considérer qu'à l'échelle de l'évolution (l'unité de temps étant le million d'années), un certain nombre d'éléments font penser que de tels transferts horizontaux entre règnes ont eu lieu. Leur fréquence est extrêmement faible.

L'analyse des flores bactériennes montre que les gènes de résistance à des antibiotiques sont présents de manière significative chez les microorganismes dans l'environnement. Ces flores constituent donc des réservoirs naturels de ces gènes. Ainsi un transfert de gène de résistance à un antibiotique à partir des génomes de plantes génétiquement modifiées vers des bactéries, qui pour la plupart les possèdent déjà, serait sans conséquence.

Il est montré que la pression de sélection est fondamentale et déterminante d'une part pour favoriser les transferts de gènes et d'autre part pour favoriser la stabilisation de variants mutationnels à spectre élargi. Une telle pression de sélection est relativement faible dans la nature sauf dans certaines niches écologiques. Par contre, elle est beaucoup plus importante du fait de l'utilisation massive d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire et dans l'alimentation des animaux d'élevage. Ainsi, le risque principal d'émergence et de modification des spectres de résistance est plus à corréler avec ces utilisations qu'avec un transfert de gène à partir des génomes de plantes transgéniques. Ce type de transfert est certes possible, mais de probabilité extrêmement faible.

Cependant, en application du principe de précaution, l'intégration dans le génome d'une plante transgénique d'un gène de résistance à un antibiotique doit être évitée, si cet antibiotique présente un intérêt majeur dans les thérapeutiques humaines ou animales. En revanche, le maintien dans le génome d'une plante transgénique d'un gène pour un antibiotique sans intérêt pour la médecine humaine ou vétérinaire ne présente pas de risque pour la santé et l'environnement. Le gène de résistance (nptII) remplit ces critères. Il est donc utilisable pour la transgénèse végétale.

Pour autant, il doit être considéré que l'utilisation faite jusqu'ici du gène de résistance à l'ampicilline " bla ", lors de la construction de certaines plantes transgéniques, n'est pas à l'origine de la résistance à cet antibiotique. Dans le cas des plantes transgéniques actuellement sur le marché possédant le gène bla, si un transfert de ce gène vers des bactéries se produisait, compte tenu de la très faible fréquence de l'événement, cela apparaît sans conséquence sur la santé publique ni sur l'environnement.

A titre de principe général, le matériel génétique inséré dans les plantes transgéniques doit être limité le plus possible aux séquences d'intérêt (construction propre).

Il convient en outre d'encourager le développement de techniques de sélection alternatives. Ces techniques ne sont pas actuellement disponibles pour toutes les plantes. Il conviendra aussi de considérer les risques qu'elles pourraient constituer pour la santé humaine et animale.

**Adopté par la Commission du Génie génétique :**  
**Le 13 janvier 2000**  
**Pr. Jean Pierre ZALTA**

**Adopté par la Commission du Génie biomoléculaire :**  
**Le 4 janvier 2000**  
**Pr. Marc FELLOUS**

---

## Glossaire

**ADN** : Sigle de l'acide désoxyribonucléique, macromolécule biologique, support de l'information génétique.

**Ampicilline** : Antibiotique semi-synthétique, produit à partir de la pénicilline inhibe la synthèse des parois bactériennes

**Bactéries épiphytes** : Bactéries qui se trouvent à la surface des feuilles des végétaux.

**bla** : Gène qui détermine la structure de la b-lactamase, enzyme qui détruit les antibiotiques de la famille des pénicillines et des céphalosporines, entre autre l'ampicilline.

**Cassettes géniques** : Fragment d'ADN comportant plusieurs gènes, généralement transférés ensembles.

**Céphalosporines** : Antibiotiques produits par certains champignons

**Chromosome** : Structure cellulaire qui contient l'information génétique. Ce peut être une molécule d'ADN seule (ADN nu) ou une molécule d'ADN associée à des protéines.

**Commission du génie biomoléculaire** : Commission consultative sous la tutelle du ministre chargé de l'agriculture et du ministre chargé de l'environnement, composée d'experts scientifiques et de représentants de la société civile. Elle est chargée d'évaluer les risques liés à la dissémination des organismes génétiquement modifiés avant l'autorisation de dissémination pour expérimentation ou mise sur le marché.

**Commission du génie génétique** : Commission consultative sous la tutelle du ministre chargé de la recherche et du ministre chargé de l'environnement, composée d'experts scientifiques. Elle est chargée d'évaluer les risques et de donner un avis de classement des OGM construits quelle que soit leur utilisation ultérieure. Elle propose les mesures de confinement souhaitables pour prévenir les risques liés à la construction et à l'utilisation de ces organismes.

**Divergence de séquences** : L'accumulation, durant l'évolution, de mutations indépendantes les unes des autres, a modifié de façons différentes des séquences identiques à l'origine, ce qui les a rendues de moins en moins homologues.

**Expression du gène** : On dit qu'un gène est exprimé lorsque le produit de ce gène est présent dans la cellule.

**Gène** : Unité structurale et fonctionnelle, porteuse de l'information héréditaire d'une génération à l'autre. Un gène est un segment d'ADN comportant une partie fonctionnelle et une partie régulatrice.

**Génome** : Ensemble des gènes d'un individu.

**Intégrons** : Molécule d'ADN contenant des gènes dont la fonction est d'insérer et d'intégrer ce fragment dans une autre molécule d'ADN.

**Kanamycine** : Antibiotique, inhibe la synthèse des protéines bactériennes.

**Mutations** : Changement accidentel et héréditaire de la séquence d'ADN. Chaque changement, même de petite amplitude, (un seul élément), peut conduire à une modification de la fonction du gène concerné.

**nptII** : Gène qui confère la résistance à l'antibiotique kanamycine.

**Plante transgénique** : Plante qui contient dans son génome un gène qui lui est étranger et qui a été introduit par une recombinaison expérimentale.

**Plasmide** : Molécule d'ADN indépendante du chromosome, et qui se multiplie de façon autonome.

**Plasmide** : conjugatif Plasmide possédant des gènes qui permettent son transfert normal d'une bactérie à une autre bactérie. Ce plasmide peut contenir des gènes appartenant habituellement au chromosome bactérien et donc transporter ces gènes dans une autre bactérie. La conjugaison est un mécanisme naturel d'échange génétique bactérien.

**Promoteur** : Séquence régulatrice localisée au début d'un gène et qui permet de déclencher les processus moléculaires qui aboutiront à exprimer la fonction de ce gène.

**Recombinaison** : Mécanisme moléculaire qui permet les échanges et le brassage des gènes dans une population ; à travers les générations. La recombinaison se produit de façon universelle entre deux fragments d'ADN dont la séquence est homologue. Il existe des recombinaisons entre des séquences d'ADN non homologues, mais elles sont rares et spécifiques de certaines fonctions.

**Remaniement des génomes** : Mutations qui concernent de grands fragments d'ADN et qui touchent la structure du chromosome, par exemple un changement anormal de localisation ou la perte d'un fragment.

**Réplication** : Synthèse d'une nouvelle molécule d'ADN par copie d'un modèle existant.

**Résistance aux antibiotiques** : Capacité génétique, pour une bactérie, de ne pas être tuée par un antibiotique.

**Séquences d'ADN** : Enchaînement des éléments constitutifs de l'ADN (adénine, guanine, thymine, cytosine). Cet enchaînement est unique pour chaque gène et conduit à la spécificité structurale et fonctionnelle de chaque gène.

**Séquences homologues** : Séquences d'ADN, sinon identiques, du moins suffisamment semblables pour permettre la reconnaissance entre les deux fragments, reconnaissance nécessaire à l'échange conduisant à la recombinaison.

**Spéciation** : Séparation définitive, à la suite de modifications génétiques, entre deux espèces voisines.

**Transposon** : Fragment d'ADN ayant intrinsèquement la propriété de changer de localisation dans le chromosome. Un transposon possède à ses extrémités des séquences spécifiques appelées " séquences d'insertion ". Les gènes contenus dans un transposon sont dits " transposables " ou " mobiles ".

**Variante** : Terme qui peut être utilisé à la place de mutant : organisme vivant ayant subi une mutation (variation) dans son génome.

<http://www.recherche.gouv.fr/commis/genetique/antibio/defaultb.htm>