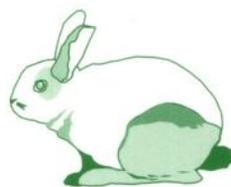
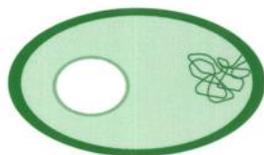
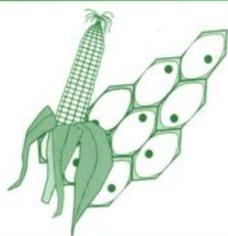


GÈNES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET PLANTES TRANSGÉNIQUES

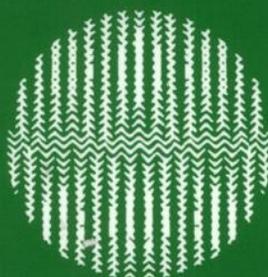


Travaux de la Commission
du génie biomoléculaire

Éditeurs

L. CLAVILIER, F. HERVIEU, O. LETODÉ

SCIENCE UPDATE



INRA
EDITIONS

**GÈNES DE RÉSISTANCE
AUX ANTIBIOTIQUES
ET
PLANTES TRANSGÉNIQUES**

L. CLAVILIER
F. HERVIEU
O. LETODÉ, éditeurs

Éditeurs

Léa CLAVILIER
Secrétariat de la Commission
du Génie génétique
Ministère de la Recherche
1, rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

François HERVIEU et Olivier LETODÉ
Secrétariat de la Commission
du Génie biomoléculaire
Ministère de l'Agriculture, DGAL
251, rue de Vaugirard
75732 Paris Cedex 15

En vente

INRA Éditions, RD 10
78026 Versailles Cedex, France
email : INRA-Editions@versailles.inra.fr

Ouvrage publié avec la contribution du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (Direction générale de l'alimentation, 251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15) et du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (Direction de la prévention des pollutions et des risques, 20 avenue de Ségur 75302 PARIS Cedex 07)

© INRA, Paris, 2001 ISBN : 2-7380-0967-0 ISSN : 1159-554X

© Le code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Le non respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique. Toute reproduction, partielle ou totale, du présent ouvrage est interdite sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC), 20, rue des Grands-Augustins, Paris 6^{ème}.

Introduction

Marc FELLOUS et Jean-Pierre ZALTA

Les commissions du génie biomoléculaire et du génie génétique, présidées respectivement par Marc FELLOUS et Jean-Pierre ZALTA ont organisé conjointement un séminaire de recherche intitulé « Gènes de résistance aux antibiotiques et plantes transgéniques ».

L'origine des gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que leur maintien dans l'environnement, le transfert de ces gènes entre organismes, leur utilisation et la sélection de résistances et enfin, les risques liés à leur utilisation comme marqueurs de sélection dans les OGM, constituent les quatre grands thèmes qui ont été tour à tour abordés au cours de ce séminaire. Bien que le quatrième thème, traitant de l'impact de l'utilisation des gènes de résistance aux antibiotiques dans les OGM en matière de santé publique, concerne plus particulièrement les deux commissions organisatrices, le choix des thématiques avait pour objectif la rédaction d'un document scientifique de référence, pouvant être utilisé à la fois par les deux commissions, mais aussi par toutes personnes intéressées, par les pouvoirs publics et même les médias. En effet, beaucoup trop de choses sont dites qui ne sont pas scientifiquement montrées, même de façon contradictoire, et la plupart des rumeurs propagées par les médias ne sont généralement que des opinions.

Sommaire

Session 1 - État des connaissances sur l'origine des gènes de résistance aux antibiotiques et leur maintien dans l'environnement	9
Compte rendu de la session 1	11
<i>B. Chevassus-Au-Louis</i>	
Prévalence naturelle des différents systèmes de résistance aux antibiotiques sur les végétaux, notamment les feuilles. Estimation des quantités consommées par l'homme ou les animaux	15
<i>C. Morris, P. Simonet</i>	
État des connaissances sur l'origine et le maintien de ces gènes dans l'environnement. Origine de la biodiversité des flores bactériennes et dynamique des échanges des gènes de résistance aux antibiotiques	21
<i>F. Taddei</i>	
Diversité des mutations conduisant à la résistance aux antibiotiques	31
<i>W. Sougakoff</i>	
Session 2 - État des connaissances sur le transfert des gènes de résistance aux antibiotiques	41
Compte rendu de la session 2	43
<i>J.P. Zalta</i>	
Mécanismes de réplication des plasmides de type ColE1 et RK2 et mécanismes de restriction dans les bactéries du sol	49
<i>F. Casse</i>	
Compétence bactérienne à la transformation	61
<i>J.P. Claverys</i>	

Passages de transposons ou séquences d'insertion entre espèces bactériennes	73
<i>P. Trieu-Cuot</i>	
État des connaissances sur les transferts de gènes de résistance aux antibiotiques dans le tractus intestinal de l'homme et de l'animal	81
<i>R. Ducluzeau, Y. Duval-Iflah</i>	
État des connaissances sur les transferts de gènes végétaux vers les micro-organismes – <i>in vivo</i> , limite des méthodes d'analyses – <i>in vitro</i> , conditions expérimentales, limite des protocoles et des méthodes d'analyses	91
<i>P. Simonet</i>	
Apport de l'analyse des génomes complets ou non	97
<i>A. Danchin</i>	
Filiation entre les gènes de résistance aux antibiotiques isolés dans des bactéries prélevées chez l'homme, chez l'animal et dans le sol	105
<i>J.P. Lafont</i>	

Session 3 - État des connaissances sur l'utilisation des antibiotiques et la sélection des résistances..... 111

Compte rendu de la session 3	113
<i>M. Fellous</i>	
Bilan de l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine (milieu hospitalier et médecine généraliste)	117
<i>V. Jarlier</i>	
Bilan de l'utilisation des antibiotiques comme additifs pour l'alimentation animale	123
<i>G. Bories</i>	
Bilan de l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire	127
<i>J.P. Lafont</i>	

Session 4 - État des connaissances sur le risque présenté par l'utilisation des gènes de résistance aux antibiotiques comme marqueurs de sélection dans les OGM..... 137

Compte rendu de la session 4	139
<i>Y. Chupeau</i>	

Gènes de résistance et plantes génétiquement modifiées utilisées à des fins industrielles et commerciales	143
<i>F. Casse</i>	
Gènes de résistance et micro-organismes génétiquement modifiés utilisés à des fins industrielles et commerciales	151
<i>J.L. Pernodet</i>	
Importance respective, pour les usages thérapeutiques, des antibiotiques correspondant aux gènes de résistance utilisés	157
<i>L. Gutmann</i>	
Possibilité d'émergence de nouvelles résistances et estimation des possibilités de transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques utilisés dans les plantes transgéniques	163
<i>P. Berche</i>	
Discussion générale	179
Annexes	185
Entretien avec Julian Davies sur l'utilisation des gènes de résistance aux antibiotiques dans le génie génétique (Paris, 4 février 1999).....	187
Avis de la Commission du Génie biomoléculaire et de la Commission du Génie génétique	191
Glossaire	197
Liste des participants	201
Liste des orateurs	205

Session I

**État des connaissances sur l'origine des gènes
de résistance aux antibiotiques
et leur maintien dans l'environnement**

Y. CHUPEAU, président de session
B. CHEVASSUS-Au-Louis, rapporteur

Compte rendu de la session 1

B. CHEVASSUS-AU-LOUIS

La première session a été consacrée à l'examen des connaissances concernant la fréquence des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement, leur circulation intra et interspécifique et les facteurs favorisant leur apparition et leur maintien.

L'analyse récente d'un sol agricole, cultivé en maïs conventionnel et qui contient de l'ordre de 10^7 bactéries par gramme, a révélé qu'environ 1 % de ces bactéries présente une résistance à l'ampicilline. Dans ce cas, environ la moitié de ces bactéries porterait un gène de résistance de type *bla*. Il n'est pas encore possible de dire si cette fréquence relativement élevée est spécifique d'un sol cultivé. Ces sols sont en effet susceptibles de recevoir des épandages d'engrais d'origine animale pouvant contenir des bactéries ayant été en contact avec les antibiotiques utilisés pour l'élevage des animaux.

De nombreuses espèces de bactéries du sol sont aussi présentes sur les végétaux. Ainsi, les légumes frais hébergent des populations bactériennes très denses. Après un jour de stockage, un gramme de salade contient entre 10^4 et 10^9 bactéries, ce qui conduirait à une ingestion quotidienne moyenne, par la consommation de légumes frais, d'environ 30 millions de bactéries. Le cortège microbien de ces légumes est très riche, et se compose d'une centaine d'espèces de bactéries. Ces bactéries, provenant en majorité du sol, peuvent porter diverses résistances aux antibiotiques. De nombreuses études ont montré que l'environnement sur les plantes est propice aux échanges génétiques entre bactéries. Ceci suggère que les gènes impliqués dans les résistances aux antibiotiques, naturellement présents chez les bactéries associées aux plantes, se trouvent dans des conditions environnementales favorables à leur dissémination.

La fréquence d'échange de gènes de résistance diminue avec l'augmentation de la divergence des génomes. L'échange de gènes chromosomiques suppose, en effet, la possibilité de recombinaison homologue, et donc une certaine homologie des séquences. Cependant, des mutants présents dans la nature à une fréquence d'environ 1 % et pour lesquels la reconnaissance et l'élimination des mésappariements sont diminuées, ont des taux d'échange 1 000 fois plus élevé. Le devenir de ces recombinants interspécifiques va ensuite dépendre des pressions de sélection exercées par l'environnement. Ils apparaissent souvent défavorisés dans des milieux standards, alors que des milieux sélectifs particuliers peuvent les favoriser. En outre, les gènes favorisant la recombinaison peuvent eux-mêmes être sélectionnés favorablement dans certains milieux, ce qui accroît la fréquence et la diversité des recombinants soumis à sélection. Enfin, il semble que certains facteurs de « stress » induisent des taux de mutation plus élevés. Le phénomène d'échange génétique entre espèces bactériennes apparaît donc suffisamment fréquent pour jouer un rôle notable dans l'acquisition de facteurs de résistance aux antibiotiques.

La question du transfert de gènes entre eucaryotes et procaryotes est plus complexe. S'il peut être observé au laboratoire, notamment en insérant préalablement les gènes eucaryotes sur des plasmides, l'existence de tels transferts dans la nature est surtout soupçonnée à partir d'exemples de forte homologie de certains gènes entre plantes et bactéries phytopathogènes. Ces phénomènes ont donc pu advenir à l'échelle de l'évolution des espèces, mais leur mise en évidence directe reste à réaliser.

Les β -lactamines constituent un bon exemple pour illustrer les phénomènes d'apparition de résistance aux antibiotiques. La résistance à ces antibiotiques peut résulter de divers mécanismes, basés sur la réduction de leur pénétration, la modification de leur cible, ou encore l'apparition d'enzymes de dégradation (β -lactamases). La résistance par le biais d'enzymes de dégradation de l'antibiotique ainsi que son évolution ont été bien décrites depuis l'apparition en 1947 des résistances à la pénicilline G. Les premières β -lactamases ne détruisaient que la pénicilline G. De nouvelles β -lactamases à spectre élargi, codées par le gène *bla*, à support plasmidique sont apparues en 1964. Enfin, en 1983 sont apparues d'autres β -lactamases présentant un spectre d'action encore plus étendu, et capables de dégrader les céphalosporines de troisième génération. Tous ces variants dont une soixantaine sont connus aujourd'hui, diffèrent par des mutations ponctuelles et apparaissent quelques années seulement après l'introduction d'une nouvelle génération d'antibiotiques. D'autres mutants peuvent affecter le promoteur des β -lactamases et conduire à une résistance par surexpression de l'enzyme. Si beaucoup de ces variants sont plasmidiques, il apparaît que certains facteurs de résistance, connus pour être chromosomiques, peuvent passer sur des plasmides et se disséminer ainsi plus largement entre espèces. L'origine précise de ces facteurs et les mécanismes favorisant leur diffusion rapide est encore en partie inconnue. L'hypothèse d'une sélection liée à d'autres fonctions des β -lactamases a été avancée. La circulation entre espèces de ces

facteurs de résistance est sans doute une composante importante de leur apparition rapide et quasi-systématique.

Il apparaît que des gènes de résistance aux antibiotiques existent avec des fréquences variables mais non négligeables dans les écosystèmes agricoles des pays industrialisés pour lesquels des études ont été réalisées. Ces gènes peuvent donc être ingérés lors de la consommation de produits végétaux frais et être présents, au moins de manière transitoire dans le tractus digestif de l'homme et des animaux.

Ils peuvent circuler assez aisément entre espèces bactériennes et permettre, dès lors qu'ils subissent une pression de sélection les favorisant, l'apparition de résistances chez une espèce sensible, beaucoup plus rapidement que par le processus de mutation.

Si la présence d'antibiotiques dans le milieu constitue un facteur sélectif puissant pour favoriser la diffusion de ces gènes, il est possible que d'autres facteurs, liés à d'autres fonctions de ces gènes, puissent également intervenir.

Si de tels gènes sont insérés dans le génome des plantes, leur possibilité de transfert en retour à des bactéries du sol est sans doute considérablement plus faible, mais ne peut être totalement exclue.

Si un tel transfert intervenait, il est vraisemblable que l'information ainsi transférée serait le plus souvent transcrite, compte tenu de l'organisation des génomes bactériens.

Prévalence naturelle des différents systèmes de résistance aux antibiotiques sur les végétaux, notamment les feuilles. Estimation des quantités consommées par l'homme ou les animaux.

Cindy MORRIS, Pascal SIMONET

La problématique de la prévalence naturelle des résistances aux antibiotiques chez les bactéries présentes sur les légumes, peut être définie à travers les trois questions suivantes :

- Combien de bactéries d'origine végétale le Français moyen consomme-t-il par jour ?
- Quelle est la fréquence de résistance aux antibiotiques chez les bactéries épiphytes (bactéries présentes sur les plantes) ?
- Quelle est la possibilité de transfert des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries épiphytes ?

Les légumes frais et dits « nouveaux frais » (les salades de 4^e gamme par exemple) hébergent des populations bactériennes denses et diverses au niveau taxonomique. Des études de la microflore associée aux produits de 4^e gamme (laitues, chicorées, mâches, choux, épinards, choux-fleurs, brocolis, céleris, poivrons, etc.) révèlent une microflore présente sur ces légumes de l'ordre de 10^4 à 10^9 bactéries/g de produit (Nguyen-The et Carlin, 1994). Sur cette base, on peut estimer le taux de bactéries consommées en même temps que ces végétaux par une population donnée. En 1993, 600 000 tonnes de salades fraîches ont été consommées en France soit environ 30 g/jour/personne. Sachant que la quantité moyenne de bactéries de 10^6 bactéries par gramme de salade, l'estimation que l'on peut faire donne une consommation moyenne de l'ordre de 3×10^7 bactéries/jour/Français.

Tableau 1. Nombre de micro-organismes présents dans les légumes frais prélevés directement sur le site industriel ou sur les rayons des unités de commercialisation (temps de conservation du produit \leq 1 jour). (D'après Nguyen-The et Carlin, 1994)

Produits	log CFU/g microflore mésophile
Assortiment de légumes (laitue, chou, oignon, poivre, cresson, celeri, maïs)	8 - 9
Chou râpé	4 - 7
Chou fleur	5 - 6
Epinards	5 - 6
Salades prêtes à la consommation (laitue, salades vertes mélangées)	5 - 7
Assortiment de légumes pour les traiteurs	4 - 8
Packs de légumes coupés ou râpés (carotte, chicorée, roquette)	7 - 9

Le cortège microbien des légumes frais est constitué d'au moins une centaine d'espèces de bactéries (Jacques, 1994). Certaines de ces bactéries sont résistantes à de nombreux antibiotiques comme *Pseudomonas fluorescens*, un composant majeur du cortège bactérien des salades fraîches (Jacques et Morris, 1995 ; Morris et Nguyen-The, 1996) qui résiste à une gamme étendue d'antibiotiques tels que les β -lactamines, les sulfamides, la novobiocine, les macrolides, etc. (Digat et Gardan, 1987) ou encore des *Klebsiella* spp., bactéries épiphytes, qui résistent à une large gamme de β -lactamines. Les mécanismes impliqués dans ces résistances sont encore inconnus. Des recherches sont en cours pour tenter de caractériser les gènes qui sont impliqués notamment chez des souches de bactéries résistantes d'origine médicale comme *Klebsiella* spp. (Liu *et al.* 1997). Les informations sur la fréquence de bactéries résistantes dans la microflore associée aux légumes sont très fragmentaires. Des travaux réalisés à l'INRA d'Avignon ont montré que 3 à 10 % des bactéries isolées sur de la scarole, du persil, de la laitue ou des épinards sont résistantes à la kanamycine et que 0,5 à 1 % d'entre elles sont résistantes à la gentamycine (Morris, données non-publiées). Il en découle que l'on a probablement affaire à plusieurs mécanismes de résistance. On peut penser qu'ils peuvent être basés, soit sur la non-pénétration de l'antibiotique dans la cellule bactérienne, (et dans ce cas on aura plutôt un phénomène *a priori* spécifique et non transférable), soit être liés à l'activité d'un gène spécifique (destruction de l'antibiotique ou modification de la cible) et dans ce cas le mécanisme de résistance est susceptible d'être aisément transférable. Il n'est pas possible de déterminer actuellement la part respective de ces deux types de mécanismes chez les bactéries « résistantes ». Suivant l'estimation de Van Elsas (commun. pers.) seulement 1 % des bactéries résistantes à la kanamycine dans des tests sur milieu sélectif révèlent la présence du gène *nptII*.

La consommation de végétaux frais est donc une source possible d'introduction de bactéries résistantes dans le tube digestif. Les Français consommant de l'ordre de 3×10^7 bactéries par jour dont 10 % révèlent une résistance sur milieu sélectif, ils doivent donc

Tableau 2. Transfert de gènes impliquant des bactéries épiphytes (exemples)

Donneur	Receveur	Site	Transfert	Fréquence
<i>X. campestris</i> pv. <i>corylina</i>	lui-même	plante (noisette)	RP4	ca. 1 / 100
<i>Erwinia</i> <i>herbicola</i>	<i>X. c.</i> pv. <i>corylina</i>	plante (noisette)	RP4	ca. 1 / 100
<i>P. marginalis</i>	<i>P. aureofaciens</i>	plante (betterave)	pQBR11	ca. 1 / 1000
<i>P. syringae</i>	5 genres	plante (haricots)	RP1	
<i>E. herbicola</i>	lui-même	insectes (<i>Bombyx mori</i>)	pBPw1:Tn7	1/10 - 1/1000
<i>E. herbicola</i>	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	insectes (<i>Bombyx mori</i>)	?	

ingérer, sur la base de l'estimation de Van Elsas environ 3×10^4 bactéries portant le gène *nptII* par jour.

L'environnement d'une plante, ou phyllosphère, est un micro-environnement propice aux échanges génétiques entre les bactéries. De nombreuses études ont montré qu'il y avait des échanges de plasmides entre et au sein des espèces bactériennes (inter et intra spécifiques) dans la phyllosphère de diverses plantes (Bailey *et al.*, 1996). Des échanges génétiques entre les bactéries de la microflore des plantes et du tube digestif des insectes qui se nourrissent sur ces plantes sont possibles (Watanabe *et al.*, 1998 ; Watanabe et Sato, 1998). On estime que le taux de bactéries transformées du fait de ces échanges génétiques est de l'ordre de 0,1 à 10 % de la population bactérienne totale.

Ces échanges peuvent aussi impliquer d'autres bactéries également présentes dans le tube digestif de l'insecte. Ces observations suggèrent que les gènes impliqués dans les résistances aux antibiotiques de bactéries provenant de légumes se trouvent dans des conditions environnementales favorables à leur dissémination.

L'étude de la prévalence naturelle des gènes de résistance aux antibiotiques nécessite de déterminer la fréquence de ces gènes dans l'environnement et leur capacité à être transférés dans les populations bactériennes.

Une étude a été engagée récemment, dans la région lyonnaise, sur des parcelles semées avec du maïs transgénique, et non-transgénique pour déterminer s'il peut y avoir des transferts de gènes de résistance lors de la culture de ces maïs génétiquement modifiés. Elle vise aussi à déterminer s'il est possible de détecter des modifications, spécifiquement liées à la culture du maïs transgénique, au niveau des populations bactériennes du sol. La première étape de ce travail a consisté à analyser le sol témoin de façon à connaître le nombre de bactéries naturellement résistantes à l'ampicilline qui y sont présentes. Le nombre de bactéries présentes dans ce sol est de l'ordre de 10^7 CFU par gramme de sol ce qui correspond à ce

qui est couramment observé. L'analyse du comportement des bactéries sur un milieu contenant un antibiotique montre que 1/100 de ces bactéries (soit environ 10^5) survivent à des concentrations de 200 µg/ml d'ampicilline. Une centaine de ces clones a été sélectionnée au hasard, leur ADN extrait puis analysé par PCR en utilisant des amorces permettant l'amplification du gène *bla* (828 paires de bases sur 858). Ces expériences préliminaires ont permis de révéler une forte amplification par PCR pour environ 50 % de ces clones. Ces produits d'amplification par PCR ont été ensuite digérés par des enzymes à quatre bases. Les profils de digestion ainsi obtenus étaient similaires à celui du gène *bla*. Ces résultats sont encore partiels. Il doivent être confirmés et considérés avec prudence. La seule certitude à ce jour concerne le nombre de bactéries du sol résistantes à l'ampicilline (105 par gramme de sol) ainsi que leur proportion parmi la microflore cultivable (1/100).

Discussion

M. Danchin - Vous parlez du gène *bla*, mais il existe un grand nombre de gènes différents. Lequel est-ce ? Pour quelle raison n'y en a-t-il qu'un ?

M. Simonet - Il s'agit du gène cloné dans le maïs NOVARTIS.

M. Danchin - Le gène *bla* du maïs NOVARTIS se serait déjà répandu dans la nature ?

M. Simonet - Non. Les bactéries posséderaient la résistance à l'ampicilline avant la culture de ces plantes. L'étude n'a pour l'instant été conduite que pour les bactéries présentes dans la parcelle plantée avec les maïs non transgéniques.

M. Danchin - Ces gènes sont-ils identiques ?

M. Simonet - Ils ne le sont pas à la base près.

M. Danchin - Les résultats obtenus en utilisant des enzymes à quatre bases sont étonnants, car même dans les laboratoires, beaucoup de places vides n'ont pas été comblées, et la variété est assez importante. Cela m'intrigue.

M. Pechere - Dans le cas des bactéries du sol, qui sont associées aux végétaux, a-t-on une idée de la part de bactéries qui pourrait provenir de l'épandage d'engrais d'origine animale ?

M. Simonet - Nos travaux ne permettent pas de répondre à la question sur la prévalence naturelle des gènes de résistance dans des sols non cultivés. Notre étude porte sur des sols cultivés.

M. Pechere - C'est donc un sol ayant reçu des engrais d'origine animale. On peut tout de même imaginer que des bactéries résistantes provenant des animaux traités par les antibiotiques puissent réensemencer ces végétaux que nous allons manger ?

M. Simonet - Oui. Pour reprendre la question d'Antoine Danchin, nous ne sommes pas allés plus loin dans l'analyse de la séquence totale du gène. Les résultats obtenus en utilisant des