

**EVALUATION DE L'IMPACT ENVIRONNEMENTAL : Evaluation des potentialités de transfert de l'ADN des plantes transgéniques vers les bactéries du sol**

**ENVIRONMENT IMPACT STUDIES: An evaluation of the possibility of transferring DNA from GM crops to soil bacteria**

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 7, Numéro 4, 320-3, Juillet - Août 2000, Dossier : "OGM: expertise et décision publique"

**Auteur(s)** : Pascal SIMONET, Laboratoire d'écologie microbienne du sol, UMR CNRS 5557, Université Claude-Bernard Lyon-I, 43, bd du 11-Novembre-1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

**Résumé** : Les bactéries se caractérisent par leurs stratégies évolutives multiples incluant mutations ponctuelles, remaniements endogènes par déplacements de séquences d'insertion ou de transposons, délétions ou amplifications de larges régions d'ADN et acquisition de nouveaux gènes par transfert horizontal d'informations génétiques. Les récentes et toutes premières analyses conduites sur les données des quelques génomes bactériens totalement séquencés indiquent le rôle tout à fait fondamental qu'ont pu jouer les transferts latéraux de gènes dans l'évolution bactérienne [1-3]. Nombre de travaux sont aujourd'hui conduits afin d'élucider le rôle des trois mécanismes de transfert (conjugaison, transformation et transduction) dans l'évolution et l'adaptation des bactéries aux conditions changeantes de leur environnement. En particulier, l'accroissement inquiétant de la proportion de germes résistants aux antibiotiques serait le fait de la dispersion de plasmides porteurs des gènes de résistance parmi la microflore pathogène ? Dans ces circonstances, la question de savoir si les plantes transgéniques, très souvent pourvues de tels gènes, pourraient constituer un facteur aggravant la dissémination d'éléments menaçant potentiellement la santé humaine est donc totalement justifiée. Tout au long de l'évolution, la nature a cependant établi un certain nombre de filtres moléculaires afin de limiter les flux de gènes, notamment entre organismes phylétiquement très éloignés. La caractéristique des plantes transgéniques tient à ce que certains des gènes des transgènes, et en particulier ceux conférant la résistance aux antibiotiques, ont une origine procaryotique susceptible de leur permettre de contourner les barrières moléculaires. Cependant, d'autres facteurs environnementaux, biotiques et abiotiques vont intervenir pour favoriser ou au contraire limiter les échanges de gènes entre plantes et micro-organismes. Parmi les trois mécanismes précédemment cités, seule la transformation génétique est en mesure d'assurer le transfert d'ADN entre plantes et bactéries [4]. Celle-ci se caractérise par l'acquisition d'ADN extracellulaire par une cellule bactérienne en état de compétence. En conditions naturelles, la réalisation d'un tel processus requiert donc successivement la libération d'ADN par la plante et la persistance de ces molécules dans un environnement hostile jusqu'au contact avec des cellules bactériennes non seulement génétiquement adaptées pour la transformation mais physiologiquement dans un stade de compétence. Enfin, l'ADN ayant pénétré une cellule bactérienne ne s'y maintiendra que si les séquences qu'il porte et les mécanismes de la cellule hôte lui permettent de s'intégrer dans le génome ou, éventuellement, de se répliquer de façon autonome.

**Summary:** According to recent analyses of complete genome sequences horizontal gene transfers have played a fundamental role in bacterial evolution. Nowadays, this is efficiency of bacteria in picking up genes of surrounding organisms that rises concerns about a potential dissemination of genes from transgenic plants to soil bacteria. The only mechanism which could be involved for such gene exchanges is natural transformation which requires the successive occurrence of several steps, including release of plant DNA, persistence of DNA in the environment, presence of transformable bacteria and internalization of the sequences in the new host. The data I present in this paper indicate that transformation-mediated gene transfers could occur in the environment and in the case of transgenic plants are more likely to involve the prokaryotic sequences of the transgene than the remaining of the genome. However, soil bacteria use to exchange genes by conjugation at frequencies several orders of magnitude higher than those resulting from a transfer from plants. One can thus assess that ecological consequences of interkingdom transfers of plant genes, naturally present in soil bacteria and which do not modify the fitness of the recipient microorganism would remain negligible.

**Keywords:** gene transfer, transformation, transgenic plants, antibiotic resistance genes.

ARTICLE

### **Persistence de l'ADN végétal dans le sol**

L'ADN extracellulaire qui peut être détecté en quantités importantes dans de nombreux types de sols [5] provient essentiellement de la lyse des cellules survenant à la mort des organismes qui colonisent cet environnement, plantes, animaux et micro-organismes. Sur la base de différents types d'expérimentations, on sait que la plus grande partie de cet ADN extracellulaire est très rapidement dégradée dès sa libération dans le sol. Les résultats montrent cependant de façon très convergente qu'une fraction significative des molécules échappe à la destruction enzymatique ou chimique et peut persister sur des temps très longs [6]. À titre indicatif, des séquences d'ADN appartenant aux transgènes de plantes transgéniques cultivées en plein champ demeurent détectables sur plusieurs mois [7, 8]. Ces résultats confirmaient des études menées au laboratoire sur des échantillons de sol inoculés avec de l'ADN purifié qu'il était possible de tracer sur des laps de temps identiques [9]. Le sol, principal réservoir de la biodiversité microbienne, est également ainsi un important réservoir de molécules d'ADN, vectrices d'informations génétiques susceptibles de modifier le patrimoine génétique des micro-organismes résidents du sol. La protection de ces macromolécules serait due à leur adsorption sur des matériaux très réactifs comme les particules de sable ou d'argile. Un gramme d'argile, par exemple, adsorbe efficacement plusieurs milligrammes d'ADN [10].

### **Transformabilité des bactéries**

Le nombre de bactéries chez lesquelles a été mis en évidence un système génétique codant pour la transformation naturelle évolue autour de 40 [4]. Cette valeur, très faible en comparaison de l'ampleur de la biodiversité bactérienne, pourrait laisser penser que la transformation *in situ* est tout au plus un phénomène anecdotique sans implications évolutives majeures. On s'accorde toutefois à admettre que le nombre de bactéries équipées de ces gènes est certainement beaucoup plus élevé. La plupart des isolats bactériens n'ont en effet jamais été criblés pour de telles fonctions. Des

résultats récents obtenus au laboratoire montrent que des souches appartenant à des taxons bactériens aussi connus et étudiés que les genres *Pseudomonas* ou *Agrobacterium* pourraient s'insérer dans la liste des bactéries naturellement transformables (Demanèche *et al.*, en préparation). Par ailleurs, la technique actuelle la plus communément utilisée de détection de la transformabilité d'un isolat bactérien consiste à cultiver des cellules bactériennes en présence d'ADN transformant sur milieu sélectionnant les clones recombinants. Or, les bactéries se caractérisent par une grande diversité des mécanismes d'induction de la compétence rendant difficile une analyse exhaustive qui permettrait de statuer sans équivoque sur les potentialités de transformation des isolats étudiés. De surcroît, de telles analyses ne peuvent concerner que les bactéries isolables et cultivables *in vitro* qui ne représentent au mieux que 1 % de la microflore totale [11]. De plus, d'autres mécanismes que ceux codés génétiquement sont susceptibles de permettre la transformation de cellules bactériennes par de l'ADN exogène. Si le génie génétique a eu l'essor qu'on lui connaît c'est en partie sur les propriétés de transformabilité de la bactérie *Escherichia coli* soumise à des stress chimiques ( $\text{CaCl}_2$ ) ou électriques (électroporation). Or, les conditions environnementales exposent régulièrement les bactéries à des situations analogues *in situ*. Des clones recombinants d'*E. coli* ont ainsi été détectés dans les eaux de source [12] et dans les produits alimentaires [13]. Des résultats (en cours de publication), fruits de la collaboration entre le LEM (CNRS-UCBL) et le CEGELY (CNRS-ECL), montrent que, lors de la décharge de foudre dans un sol, les perturbations électriques ainsi générées pourraient être à l'origine de la pénétration passive de l'ADN extracellulaire présent dans l'environnement immédiat des micro-organismes telluriques.

### **Processus de transformation naturelle des bactéries**

Afin d'évaluer le plus rationnellement possible le risque d'acquisition des gènes des plantes transgéniques par les bactéries, il convient de prendre en compte les différentes étapes du processus *per se* de la transformation bactérienne. De par leur efficacité et la spécificité qu'ils manifestent selon l'origine de l'ADN transformant, les mécanismes moléculaires impliqués illustrent parfaitement le concept d'équilibre entre la génération de diversité nécessaire à l'adaptation et la préservation du génome bactérien contre une dérive trop importante et incontrôlée. La première étape consiste en une adsorption plus ou moins spécifique de l'ADN sur la surface cellulaire. Des bactéries comme *Neisseria gonorrhoeae* ou *Haemophilus influenzae* requièrent chez l'ADN transformant la présence de courtes séquences nucléotidiques (9 à 10 paires de bases) sur lesquelles se fera l'adsorption [14, 15]. La présence de telles séquences spécifiques de reconnaissance est généralement considérée comme une stratégie visant à optimiser le transfert de gènes entre cellules appartenant à la même espèce. Dans de telles situations l'acquisition d'ADN issu d'organismes les plus éloignés phylétiquement est totalement exclue. En revanche, d'autres bactéries parmi lesquelles on retrouve un important colonisateur des sols, *Bacillus subtilis*, n'expriment pas de telles spécificités et peuvent adsorber à leur surface tout type d'ADN [16].

Si, quelle que soit la bactérie, l'étape suivante qui est la pénétration de l'ADN adsorbé à l'intérieur de la cellule ne présente aucune spécificité pour un type d'ADN donné, en revanche, l'ADN internalisé dans la cellule devra échapper aux mécanismes de restriction et de modification. Ces mécanismes sont considérés comme de fortes protections contre une contamination par de l'ADN étranger [17].

Enfin, afin de pouvoir être pérennisé dans la cellule hôte et d'y exprimer potentiellement de nouveaux traits, l'ADN transformant devra soit être équipé de la machinerie lui permettant de se

répliquer de façon autonome (plasmide), soit s'intégrer dans le génome hôte. L'intégration se fait par un mécanisme de recombinaison plus ou moins illégitime dans lequel ADN donneur et récepteur forment des hétéroduplexes dont la stabilité dépend du niveau de similarité entre les séquences impliquées. À nouveau, de profondes différences existent entre les bactéries sur la spécificité de la réaction lors de cette étape, fondée sur la longueur de la zone de similarité entre les deux types d'ADN et le taux d'homologie entre ces deux zones. Contrôlé par l'action antagoniste des systèmes SOS et MRS (*Mismatch Repair System*) [18], le niveau d'intégration d'ADN exogène dans un génome bactérien reflète en fait son niveau « d'isolement sexuel ». Toutes les situations intermédiaires entre un isolement strict (acceptation du seul ADN homologue) et une totale permissivité (transformation avec tout type d'ADN) ont été mises en évidence dans le monde procaryotique.

### **Potentialités du transfert d'ADN entre plantes transgéniques et bactéries du sol**

Du fait de ces multiples facteurs régulant la transformation *in situ*, les scientifiques s'accordent à estimer que les transferts de gènes par un tel mécanisme ne se réalisent dans le sol qu'à des fréquences excessivement faibles [16, 19]. Cependant, la prise en compte de leur impact évolutif réel ne peut se faire sans considérer la différence d'échelle spatio-temporelle entre des expérimentations conduites au laboratoire et la nature. Les échantillons de sol utilisés ne dépassent pas quelques grammes alors que, dans les conditions réelles, le nombre des cellules bactérielles dans le seul environnement tellurique est estimé à plus de  $10^{29}$  cellules [20]. Rappelons que l'échelle de temps considérée est de plus de 3 milliards et demi d'années. Il apparaît de plus en plus que, même dans un environnement aussi complexe, hétérogène et enzymatiquement et chimiquement hostile que le sol, l'ADN extracellulaire (en particulier celui issu des plantes) va être régulièrement au contact de bactéries susceptibles de l'internaliser, que l'induction soit codée génétiquement ou induite de manière physico-chimique. La parade à ces « infections » dépendra principalement de la cellule bactérienne susceptible de trier l'information génétique pour assurer une évolution de son génome (nécessaire à toute adaptation) tout en maintenant une certaine stabilité. C'est ainsi que seuls de très rares gènes de plantes ont pu franchir ces filtres au cours des centaines de millions d'années de l'évolution [21, 22] qu'ont eue en parallèle plantes et bactéries, confirmant le très haut niveau d'étanchéité de ces barrières moléculaires.

C'est la stabilité de ces barrières qui pourrait être remise en question dans le cas des séquences « étrangères » véhiculées par les organismes génétiquement modifiés et dont l'origine est procaryotique.

Un premier élément de réponse a été apporté par les travaux publiés simultanément en 1998 par deux équipes allemandes [23, 24]. Les chercheurs ont montré que, si l'on mettait en contact *in vitro* des cellules transformables de la bactérie *Acinetobacter* sp. avec de l'ADN extrait et purifié de plantes transgéniques, des transferts avaient effectivement lieu pour peu qu'il existe une concordance de séquences entre les deux types d'ADN. L'argumentaire que, dans l'environnement, l'ADN issu naturellement des plantes perdrait son pouvoir transformant du fait de son association à des histones ou à d'autres protéines et de la présence contaminante de tous les composés de la cellule ne résiste pas non plus aux résultats expérimentaux. Ces chercheurs ont montré que les expérimentations effectuées avec un broyat de feuilles de ces plantes transgéniques comme solution transformante produisaient également des résultats positifs, même si les fréquences observées étaient plus faibles qu'avec de l'ADN pur.

Ces résultats apportent une confirmation, de type expérimental donc irréfutable, que la transgénèse est susceptible de modifier le niveau naturel des échanges d'informations génétiques entre plantes et bactéries. Cependant, on restait en droit de s'interroger sur l'impact réel *in situ* de ces données si l'on considère que la bactérie réceptrice utilisée, *Acinetobacter* sp., ne semble pas développer un stade de compétence dans le sol et n'y serait donc pas transformable [25]. C'est pour répondre à ces questions que nous avons travaillé au laboratoire d'écologie microbienne à Lyon à partir du modèle bactérien *Ralstonia solanacearum*. Cette bactérie présente la double particularité d'être un pathogène des plantes et d'appartenir à la catégorie des bactéries naturellement transformables. Une étude préliminaire nous a permis de définir les caractéristiques de la transformation génétique chez cette bactérie [26]. Nous avons montré que cette bactérie n'est transformable, que par son propre ADN (isolement sexuel très fort selon le concept explicité préalablement) excluant ainsi toute acquisition d'ADN « naturel » de plantes. Dans une seconde étape nous avons montré que cette bactérie développait un stade de compétence pendant la phase d'infection de l'hôte végétal [27]. Cet état physiologique, rendant la bactérie transformable, était effectivement utilisé par les cellules bactériennes pour échanger entre elles des portions de leur génome. La question alors posée fut de savoir si cette fonction pouvait permettre à la bactérie d'acquérir des gènes de la plante, considérant que la transgénèse permettait de rendre compatibles les séquences de la plante et celles de la bactérie [28]. Différents systèmes modèles plantes transgéniques-bactéries réceptrices ont été développés qui ont permis de valider l'intérêt du modèle. Déjà ces relations intimes de pathogénie entre une plante et une bactérie mettent en contact l'ADN végétal et les cellules bactériennes colonisantes. Nos travaux montrent surtout que les probabilités de transfert sont plus élevées de plusieurs ordres de grandeur *in planta* par rapport au sol. Nous avons déterminé que le seul facteur limitant l'occurrence des transferts serait lié à la forte dilution du transgène parmi le génome végétal (quelques centaines de paires de bases parmi plus de  $10^9$  bp). En tout état de cause, ces résultats indiquent que, dans certains types d'écosystèmes (en l'occurrence ici les tissus végétaux), les facteurs environnementaux biotiques et abiotiques peuvent être beaucoup plus favorables à des événements de transfert que ceux rencontrés dans le sol. Une fois cette étape plante-bactérie franchie, le germe récepteur des séquences pourrait devenir à son tour donneur pour les disséminer par transformation ou par conjugaison à d'autres représentants de la microflore indigène.

## CONCLUSION

Fondées sur des résultats récents, les données exposées dans cet article indiquent que les séquences introduites par génie génétique dans le génome de certains végétaux présentent des probabilités de transferts inter-règnes supérieures aux autres gènes de la plante. On ne peut cependant pas terminer cette brève revue sans émettre quelques commentaires sur les conséquences potentielles que pourraient avoir de tels événements. Tout d'abord, en absence de pression de sélection dans l'environnement, le transfert de séquences de plantes ne confèrera aucun avantage sélectif au micro-organisme récepteur. Ces séquences seront plutôt considérées comme un fardeau génétique [29] comme c'est notamment le cas des gènes de résistance aux antibiotiques. De plus ces gènes de résistance, et en particulier ceux utilisés dans la construction des plantes transgéniques, sont très répandus parmi les micro-organismes telluriques. Plus de 1 % des bactéries isolables du sol (soit plus de 100 000 cellules par gramme de sol) sont ainsi capables de résister à des concentrations élevées d'ampicilline ou de kanamycine. De plus, de nombreux types de sols sont soumis régulièrement à une

inoculation bactérienne massive qui peut être caractérisée de plus ou moins naturelle car résultant des déjections animales ou des pratiques culturales (fumures). L'emploi des antibiotiques en thérapeutique vétérinaire ou comme additif alimentaire contribue à sélectionner des souches présentant un haut niveau de résistance aux antibiotiques. Leur dissémination dans l'environnement va contribuer à augmenter considérablement le pool des gènes de résistance dans les bactéries du sol. Enfin, ces gènes, très souvent localisés sur des éléments transférables comme des plasmides ou des transposons, sont échangés entre bactéries à des fréquences extrêmement élevées en comparaison d'un hypothétique transfert à partir d'une plante. À la lumière de ces données, le débat actuel et passionné autour du gène *bla* (conférant la résistance à l'ampicilline) du maïs transgénique proposé par la société Novartis me paraît devoir être ramené à de plus justes proportions.

## REFERENCES

1. OCHMAN H, LAWRENCE JG, GROISMAN EA (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405 : 299-304.
2. WOESE CR (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 : 8392-6.
3. DOOLITTLE WF (1999). Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*, 284 : 2124-9.
4. BERTOLLA F, KAY E, SIMONET P (2000). Potential dissemination of antibiotic resistance genes from transgenic plants to microorganisms. *Infect Control Hospital Epidemiol*, 21 : 390-3.
5. FROSTEGARD A, COURTOIS S, RAMISSE V, *et al.* (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl Environ Microbiol*, 65 : 5409-20.
6. ROMANOWSKI G, LORENZ MG, SAYLER G, WACKERNAGEL W (1992). Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl Environ Microbiol*, 58 : 3012-9.
7. PAGET E, LEBRUN M, FREYSSINET G, SIMONET P (1998). The fate of recombinant plant DNA in soil. *Eur J Soil Biol*, 34 : 81-8.
8. GEBHARD F, SMALLA K (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol Ecol*, 28 : 261-72.
9. WIDMER F, SEIDLER RJ, WATRUD LS (1996). Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Mol Ecol*, 5 : 603-13.
10. PAGET E, JOCTEUR MONROZIER L, SIMONET P (1992). Adsorption of DNA on clay minerals : protection against DNase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol Lett*, 97 : 31-40.
11. AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFER KH (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59 : 143-69.

12. BAUR B, HANSELMANN K, SCHLIMME W, JENNI B (1996). Genetic transformation in freshwater : *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl Environ Microbiol*, 62 : 3673-8.
13. BAUER F, HERTEL C, HAMMES WP (1999). Transformation of *Escherichia coli* in foodstuffs. *Systematic Appl Microbiol*, 22 : 161-8.
14. ELKINS C, THOMAS CE, SEIFERT HS, SPARLING PF (1991). Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *J Bacteriol*, 173 : 3911-3.
15. SMITH HO, TOMB JF, DOUGHERTY BA, FLEISCHMANN RD, VENTER JC (1995). Frequency and distribution of DNA uptake signal sequences in the *Haemophilus influenzae* Rd genome. *Science*, 269 : 538-40.
16. LORENZ MG, WACKERNAGEL W (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*, 58 : 563-602.
17. DREISEIKELMANN B (1994). Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev*, 58 : 293-316.
18. MATIC I, RAYSSIGUIER C, RADMAN M (1995). Interspecies gene exchange in bacteria : the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell*, 80 : 507-15.
19. PAGET E, SIMONET P (1994). On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 15 : 109-18.
20. WHITMAN WB, COLEMAN DC, WIEBE WJ (1998). Prokaryotes : the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 : 6578-83.
21. SMITH MW, FENG DF, DOOLITTLE RF (1992). Evolution by acquisition : the case for horizontal gene transfers. *Trends Biochem Sci*, 17 : 489-93.
22. BROWN JR, DOOLITTLE WF (1999). Gene descent, duplication, and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases. *J Mol Evol*, 49 : 485-95.
23. GEBHARD F, SMALLA K (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol*, 64 : 1550-4.
24. DE VRIES J, WACKERNAGEL W (1998). Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol Gen Genet*, 257 : 606-13.
25. NIELSEN KM, VAN WEERELT MD, BERG TN, BONES AM, HAGLER AN, VAN ELSAS JD (1997). Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 63 : 1945-52.
26. BERTOLLA F, VAN GIJSEGEM F, NESME X, SIMONET P (1997). Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol*, 63 : 4965-8.

27. BERTOLLA F, FROSTEGARD A, BRITO B, NESME X, SIMONET P (1999). During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Mol Plant-Microbe Interactions*, 12 : 467-72.
28. BERTOLLA F, PEPIN R, PASSELEGUE-ROBE E, PAGET E, SIMKIN A, NESME X, SIMONET P (2000). Plant genome complexity may be a factor limiting *in situ* the transfer of transgenic plant genes to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol*, 66 : 4161-7.
29. GLICK BR (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Advances*, 13 : 247-61.