

Les marqueurs de résistance aux antibiotiques dans les plantes génétiquement modifiées

- *Quels sont-ils et dans quel but sont-ils utilisés ?*
- *Cadre juridique en vigueur pour l'évaluation de la sécurité des cultures génétiquement modifiées*
- *Evaluation des risques entraînés par des gènes de résistance aux antibiotiques dans les cultures génétiquement modifiées*
- *Existe-t-il des alternatives ? Ces marqueurs peuvent-ils être retirés ?*

L'utilisation de gènes marqueurs de la résistance à certains antibiotiques, au cours du développement de cultures génétiquement modifiées, a suscité de vives inquiétudes auprès du public. Ce document examine la nature de ces gènes marqueurs et leurs différents usages, la réglementation de la sécurité des cultures génétiquement modifiées et les alternatives possibles à l'utilisation de ces marqueurs.

L'objectif principal de ce document est de fournir des informations mesurées et de faire avancer le débat public. Des scientifiques, des industriels, des organisations gouvernementales et d'intérêt public européens ont travaillé ensemble à l'élaboration de ce document. Celui-ci a un but informatif et ne se veut donc pas l'écho des opinions ou de la politique de la Fédération Européenne de Biotechnologie ou de tout autre organisme.

Introduction

L'association de gènes de résistance aux antibiotiques à des antibiotiques constitue un outil important pour le génie génétique en général, et pour la biotechnologie végétale, en particulier. Une tâche-clé du génie génétique est l'identification et la sélection de cellules dans lesquelles un nouveau gène a été introduit. Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent inactiver, de façon sélective, certains antibiotiques et protéger ainsi les cellules contre ces antibiotiques. Un gène de résistance aux antibiotiques peut ainsi être utilisé afin de marquer un gène présentant un trait ou un caractère d'intérêt. En pratique, le gène de résistance à l'antibiotique est lié à un gène présentant le caractère d'intérêt avant son introduction dans les cellules destinataires, qui peuvent provenir d'une bactérie, d'une levure, d'un végétal et d'un animal. Ces cellules sont ensuite incubées en présence de l'antibiotique. Les seules cellules qui se multiplient dans ces conditions sont celles qui ont incorporé le gène de résistance à l'antibiotique en même temps que le caractère d'intérêt.

L'identification de cellules «transgéniques» serait extrêmement difficile, voire impossible, si ce processus de sélection n'était pas mis en œuvre puisqu'une toute petite fraction seulement de la population cellulaire incorpore les gènes introduits (une cellule parmi plusieurs milliers). Un processus de sélection est une nécessité dans le domaine du génie génétique ; et c'est la raison pour laquelle les gènes de résistance aux

antibiotiques ont été aussi largement utilisés dans de nombreux et différents domaines de la biotechnologie pendant plusieurs années.

De récentes autorisations délivrées pour la commercialisation de cultures génétiquement modifiées contenant des marqueurs de résistance aux antibiotiques ont suscité des inquiétudes en Europe ; ces inquiétudes portent sur le risque de propagation de gènes de résistance aux antibiotiques à des micro-organismes qui n'étaient pas susceptibles jusqu'alors et qui deviendraient, de ce fait, résistants aux antibiotiques utilisés. Ces craintes gagnent du terrain dans l'opinion et sont régulièrement mises en avant dans les médias. Par conséquent, les gouvernements de l'Union européenne ont recommandé le retrait progressif des cultures génétiquement modifiées contenant des marqueurs de résistance aux antibiotiques. Cette décision allait à l'encontre des avis émis par plusieurs comités scientifiques nationaux et européens.

Quels sont-ils et pourquoi sont-ils utilisés ?

Antibiotiques et résistance aux antibiotiques dans la nature

Les bactéries sont des microbes omniprésents dans l'environnement, dans la flore et la faune. Nous sommes exposés en permanence à ces bactéries, en ingérant des aliments par exemple. Les microbes qui occupent le même habitat se disputent la nourriture ; pour leur propre survie, certains ont, au cours de leur évolution, produit naturellement des antibiotiques afin d'éliminer leurs concurrents. Les antibiotiques inhibent la croissance d'une cellule en bloquant certains de ses processus essentiels à son métabolisme. Les souches bactériennes qui produisent un antibiotique donné doivent donc porter une résistance qui permet d'inactiver l'antibiotique correspondant tout en empêchant que cette propriété entraîne leur propre destruction. Dans la course à l'évolution entre les microbes, la production de nouveaux antibiotiques est, en général, contrée par le développement de mécanismes de résistance à la fois par l'organisme producteur et par l'organisme cible. Dans la nature, il existe une grande variété d'antibiotiques et de gènes correspondant à ces antibiotiques. Cependant, plutôt que de développer leur propre résistance, les bactéries visées acquerront en général des gènes de résistance aux antibiotiques qui sont déjà présents dans le pool de bactéries qui les entourent. Ce phénomène est facilité par le fait que les bactéries échangent sans problème du matériel génétique entre elles. La présence d'un

FÉDÉRATION
EUROPÉENNE
de
BIOTECHNOLOGIE

GRUPE DE TRAVAIL
SUR LA PERCEPTION
DES BIOTECHNOLOGIES
PAR LE PUBLIC



RENSEIGNEMENTS

Pour toute information complémentaire, s'adresser à la European Federation of Biotechnology, Task Group on Public Perceptions of Biotechnology.

Prof Dr Richard Braun (*président*)

Bio-Link

Enggisteinstraße 19

CH-3076 Worb

Tél & fax: +41 31 8320000

Email: rdbraun@bluewin.ch

Dr David J Bennett (*secrétaire*)

Secrétariat, EFB, Task Group on Public

Perceptions of Biotechnology

Oude Delft 60

NL 2611 CD Delft

Tél: +31 15 2127800

Fax: +31 15 2127111

E-mail: efb.cbc@tnw.tudelft.nl

<http://efbweb.org/ppb>

© copyright EFB Task Group on Public Perception of Biotechnology, 2001.

Ce bulletin est destiné à l'information et ne représente pas les opinions de la Fédération européenne de Biotechnologie ni d'aucune autre personne. La reproduction de ce texte n'est autorisée qu'à des fins de recherche et d'étude, à condition que soit mentionné le détenteur du copyright dans une notice semblable à la présente. En dehors de ce cas, toute reproduction, même partielle, est interdite sans l'autorisation du détenteur du copyright.

Le Groupe de travail sur la perception des biotechnologies par le public est très reconnaissant envers la Commission européenne, Direction générale de la Recherche, pour son soutien et son appui financier prolongés dans la publication de cette série de bulletins.



Mise au point

10

Septembre 2001

traduction du texte original
en anglais faite par C Hagnéré

antibiotique confère un avantage à une bactérie résistante et, dans ces conditions, le développement et la propagation de la résistance vont s'accroître.

La découverte de l'action des antibiotiques contre des agents provoquant des maladies au début du 20^{ème} siècle a eu une influence profonde sur la médecine. Cependant, leur utilisation n'a pas été suffisamment limitée. L'utilisation des antibiotiques par l'homme a entraîné une consommation telle à travers le monde qu'elle a favorisé la propagation de microbes résistants. L'utilisation accrue d'antibiotiques par la médecine clinique et animale est la cause principale de la résistance grandissante des bactéries à ceux-ci. De plus, l'usage extensif des antibiotiques comme additifs dans l'alimentation animale a provoqué une sélection de bactéries résistantes chez les animaux sains. Les antibiotiques sont également largement pulvérisés sur les plants de cultures, dans les vergers, les vignes etc. afin de lutter contre des agents pathogènes.

De nos jours, la résistance aux antibiotiques est si courante que certains des antibiotiques de première génération ne sont plus efficaces. La résistance à de nombreux antibiotiques des souches pathogènes de *Staphylococcus* et *Mycobacterium tuberculosis*, en particulier dans les hôpitaux, suscite de vives inquiétudes au sein de la communauté médicale. Des craintes portant sur l'utilisation des marqueurs de résistance aux antibiotiques dans le cadre de la gestion des antibiotiques en général ont été exprimées, comme par exemple dans cette citation provenant du site Internet belge sur la biosécurité : «*Un tel scénario déforme la vision générale des utilisations à mauvais escient en attirant l'attention sur un très petit aspect de l'ensemble de la problématique de la gestion des antibiotiques. De plus, ce type de scénario à la mode constitue, à terme, un danger pour la prise en charge de la Santé Publique, car il met en avant l'arbre cachant la forêt, au sein de l'opinion tout au moins. D'un autre côté, il est plutôt plus facile politiquement et techniquement d'interdire l'utilisation de ces marqueurs de résistance aux antibiotiques dans les plantes transgéniques en s'appuyant sur le principe de précaution que de réglementer le marché alimentaire et de contrôler ses pratiques agricoles en amont*». (http://biosafety.ihe.be/ARGMO/GMO_Plants.html)

Les marqueurs de résistance aux antibiotiques comme outils dans la biotechnologie végétale

Depuis le milieu des années 80, les méthodes de la biotechnologie moderne ont été développées afin d'améliorer les cultures agricoles grâce à l'introduction de matériel génétique qui apporte d'intéressantes caractéristiques.

Deux types de gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques sont utilisés dans les plantes transgéniques :

1 les gènes véhiculés par des promoteurs bactériens. Ces gènes ont été utilisés au cours des premières étapes de l'assemblage des fragments d'ADN destinés à être transférés dans les cellules végétales. L'utilisation de ces gènes servait à trier, avant amplification, les fragments d'ADN chimères dans les bactéries destinataires. Le gène conférant une résistance à l'ampicilline appartient à cette catégorie. Les plantes génétiquement modifiées contenant ces gènes appartiennent à la toute première génération technologique ; les technologies

actuelles ne permettent que le retrait de ces gènes avant d'entamer le processus de transformation de la plante.

2 les gènes permettant la sélection de cellules végétales qui ont intégré le fragment d'ADN présentant le trait ou la caractéristique d'intérêt. L'insertion d'un gène dans une cellule végétale par transformation est un processus très peu efficace puisque seules quelques milliers de cellules parmi plusieurs millions intègrent le gène souhaité. Le transfert à la fois d'un gène marqueur de résistance aux antibiotiques et du gène présentant le caractère d'intérêt permet à ce très petit nombre de cellules d'être sélectionnées puisque seules les cellules qui ont intégré les deux gènes survivront et se multiplieront en présence de l'antibiotique mis dans le milieu de croissance. Une plante génétiquement modifiée se développe à partir de ces cellules modifiées et le marqueur n'est alors plus nécessaire.

En général, il faut plus de dix ans pour développer une plante génétiquement modifiée présentant un nouveau trait. Les divers aspects de la sécurité sont examinés à chaque étape du développement de la plante. Cela commence par la sélection de protéines et de gènes appropriés à insérer dans les plantes. Viennent ensuite des expériences destinées à évaluer les impacts possibles sur la santé humaine suite à la consommation d'une culture génétiquement modifiée, et enfin des essais de culture dans les champs de la plante génétiquement modifiée sur plusieurs années afin d'évaluer les impacts potentiels sur la sécurité de l'environnement.

Les marqueurs de résistance aux antibiotiques utilisés pour le développement de cultures génétiquement modifiées ont été sélectionnés par des scientifiques qui ont pris en compte différents critères de sécurité. Entre autres, ces marqueurs doivent donc être présents de façon fréquente dans les populations microbiennes naturelles (la plupart d'entre eux ont été isolés à partir de bactéries courantes dans l'intestin de l'homme) et ils doivent conférer une résistance à un nombre restreint d'antibiotiques spécifiques dont les applications en médecine humaine et animale sont limitées.

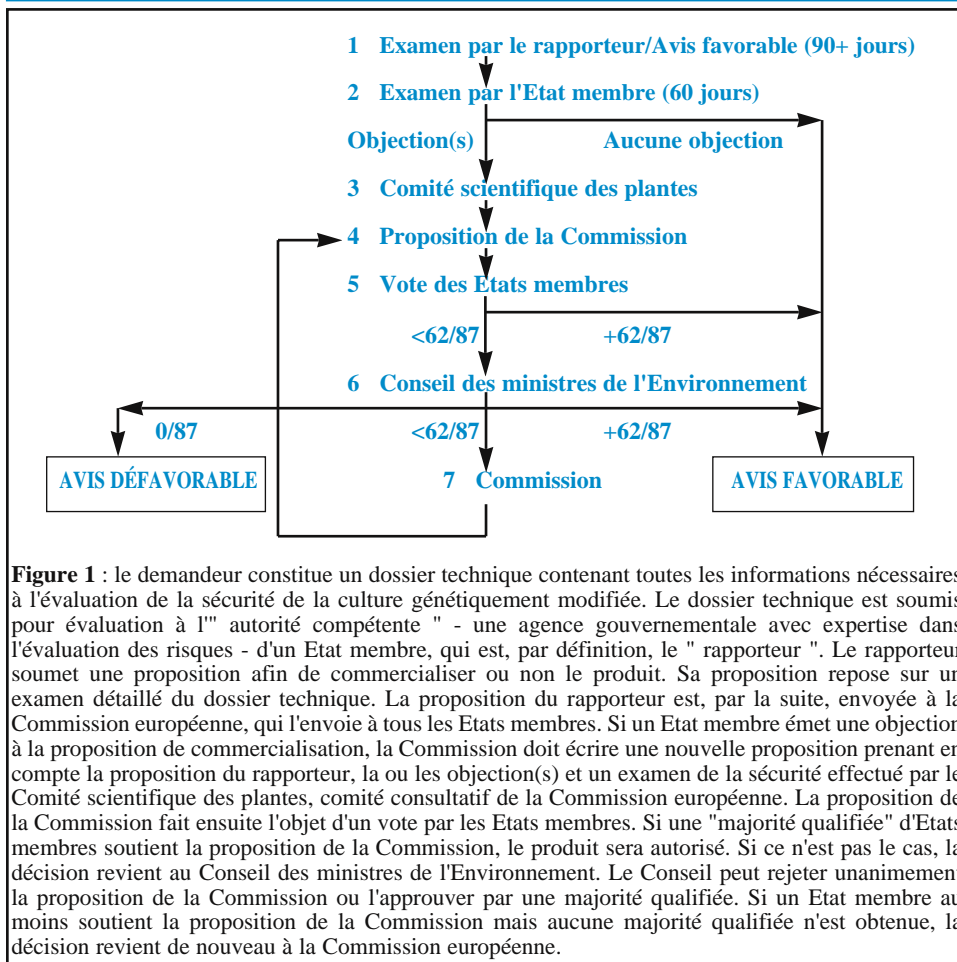
Le marqueur de résistance aux antibiotiques le plus largement transformé pour la sélection de cellules végétales transformées est le gène *nptII*, encore appelé *aph(3')-II*. Ce gène confère une résistance aux antibiotiques suivants : la néomycine et la kanamycine. Il est présent dans 10 des 14 cultures génétiquement modifiées contenant des gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques et soumises à la mise sur le marché dans l'Union européenne. Il a été, par exemple, utilisé pour développer une tomate à maturation retardée, du maïs insecticide résistant aux herbicides ainsi que des variétés de coton. Le choix d'utiliser ce gène marqueur de résistance aux antibiotiques a été favorisé par le fait que, d'une part, la néomycine et la kanamycine sont deux antibiotiques sans grande importance dans le traitement médical et que, d'autre part, en moyenne 20 à 40% des bactéries présentes naturellement dans le tractus digestif de l'homme et de l'animal sont déjà résistantes à la kanamycine. Les bactéries résistantes à la néomycine et à la kanamycine sont omniprésentes dans la nature ; leur prévalence dépend de la source de bactéries isolées, le taux le plus élevé se trouvant dans l'engrais pour cochons.

Le cadre juridique et les décisions réglementaires aux Etats-Unis et dans l'Union européenne

Avant de commercialiser une culture génétiquement modifiée sur le marché de l'Union européenne, plusieurs autorisations doivent être obtenues aux niveaux national et européen. Les deux lois les plus importantes concernant la commercialisation de ces cultures sont la directive 90/220/CEE sur la dissémination et la mise sur le marché des OGM et le règlement 258/97 sur les Nouveaux Aliments et Ingrédients Alimentaires. Les principales étapes avant la prise de décision dans ces deux types de lois sont très similaires. Le schéma 1 vise à expliquer le processus de décision pour les cultures génétiquement modifiées avant l'adoption de la directive 90/220/CEE.

Le débat sur la sécurité des marqueurs de résistance aux antibiotiques en Europe a commencé en 1996, lorsque le maïs CG176 de la firme Novartis contenant un gène de résistance à l'ampicilline était en cours d'autorisation. Le Comité Consultatif Britannique sur les Nouveaux Aliments et les Nouveaux Procédés (*UK Advisory Committee on Novel Foods and Processes* ou *ACNFP*) a joué un rôle majeur en soutenant des arguments allant à l'encontre de l'autorisation de ce produit. En effet, le gène, lorsqu'il est exprimé dans la bactérie, confère une résistance à l'ampicilline, antibiotique important sur le plan clinique. Etant donné les inquiétudes exprimées au Royaume-Uni, la proposition de la Commission visant à commercialiser ce produit n'a obtenu de majorité qualifiée ni au niveau des Etats membres ni au niveau du Conseil des ministres de l'Environnement. Comme les Etats membres n'ont pas réussi à prendre de décision, la Commission a autorisé la mise sur le marché de ce produit après des examens supplémentaires effectués par trois comités scientifiques de la Commission. Les trois comités ont, chacun, conclu que la mise sur le marché de ce produit n'entraînait aucun problème majeur sur les plans de l'alimentation, de la nourriture ou de l'environnement. Le gouvernement français a autorisé la culture de ce produit, à condition que l'augmentation de sa résistance aux insectes et le transfert potentiel du gène de résistance à l'ampicilline aux micro-organismes soient surveillés. Les tentatives de surveillance ont échoué jusqu'à présent puisque jusqu'à plus de 10% des bactéries présentes dans l'environnement sont résistantes à l'ampicilline et il est impossible de faire la différence entre un gène qui pourrait être transféré du maïs génétiquement modifié à une bactérie environnementale et le gène qui est déjà largement présent dans la population bactérienne. Comme les cultures génétiquement modifiées sont peu acceptées sur le marché, 500 hectares de maïs génétiquement modifié, tout au plus, ont été cultivés en France.

Des décisions réglementaires reposant sur la directive 90/220/CEE amenée à être remplacée par la directive 2001/18/CEE en octobre 2002 ont autorisé la mise sur le marché de cultures de maïs génétiquement modifié qui contiennent le marqueur de résistance aux antibiotiques *nptII*. Quatre autres propositions récentes contenant aussi le gène *nptII* n'ont pas obtenu le soutien nécessaire de la majorité qualifiée et depuis lors trois demandes ont été suspendues. Les Etats membres et la Commission doivent veiller à ceci : les OGM contenant des gènes exprimant une résistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement médical et vétérinaire doivent faire l'objet d'une attention particulière au cours des



évaluations de risque, dans le but d'identifier et de retirer progressivement les marqueurs de résistance aux antibiotiques dans les OGM qui peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine et sur l'environnement. Les gènes marqueurs revêtant une importance sur le plan clinique seront retirés progressivement avant 2005, date-butoir.

Evaluation de la sécurité de la résistance aux antibiotiques dans les cultures génétiquement modifiées

L'évaluation de la sécurité des cultures contenant des marqueurs de résistance aux antibiotiques a été examinée de manière approfondie par des experts appartenant à des organismes scientifiques reconnus au niveau international et à des comités scientifiques européens ainsi que par des experts gouvernementaux canadiens, japonais, suisses, et américains entre autres. Les experts ont évalué la sécurité des cultures contenant le gène marqueur *nptII* qui confère à la kanamycine et la néomycine, le gène *aad* qui confère une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine et le gène *bla* qui confère une résistance à l'ampicilline. Ces experts ont conclu que le risque de transfert de gènes de cultures transgéniques contenant ces gènes à la population microbienne était négligeable, et que si c'était le cas, il n'y aurait aucun impact sur la forte prévalence actuelle de la résistance aux antibiotiques dans les populations microbiennes. Le Comité scientifique des plantes de la Commission européenne a émis une opinion sur la sécurité d'un maïs Bt insecticide qui contient le gène *nptII*.

Ses conclusions reposent sur les observations suivantes :

- 1 Les marqueurs de résistance aux antibiotiques utilisés dans la biotechnologie végétale proviennent de bactéries présentes naturellement. Le gène *nptII* en particulier a été isolé à partir de bactéries présentes dans l'intestin de l'homme. Les marqueurs sont déjà largement présents dans des produits autorisés parce que des mécanismes efficaces de transfert naturel existent ; ils permettent de propulser directement les gènes entre les cellules bactériennes. Ce processus confère des avantages aux bactéries. Certaines populations microbiennes peuvent, par conséquent, servir de réservoirs pour certains gènes de résistance aux antibiotiques qui se répandent alors rapidement suite à des pressions de sélection.
- 2 La kanamycine et la néomycine, antibiotiques inactivés par le gène *nptII*, sont rarement utilisées dans la thérapie humaine puisqu'elles ont été remplacées par des antibiotiques de toxicité moindre et d'efficacité plus grande.
- 3 Il n'existe aucun mécanisme connu pour le transfert de gènes de cellules végétales vers des bactéries. Le transfert de gènes à des micro-organismes vivant dans le sol pourrait, en théorie, se produire dans des champs où sont cultivés les produits agricoles génétiquement modifiés. Cependant, ce type de transfert n'a encore été observé nulle part. L'ADN à la fois bactérien et végétal reste dans le sol, cela a été démontré, pendant des semaines ou des mois en se liant aux surfaces des particules présentes dans le sol. Il est donc plus probable que la présence permanente d'ADN végétal, facteur important dans la détermination des chances de transfert de gènes, soit plus grande dans le sol que dans l'intestin. Cependant, alors que certaines

bactéries ont la capacité d'intégrer spontanément de l'ADN nu, de nombreuses barrières devraient être franchies avant que les gènes intacts d'une plante ne puissent être intégrés à partir d'un environnement naturel, et ne soient fonctionnels et maintenus dans les bactéries. Un tel phénomène n'a jamais été démontré dans des conditions normales. Même si un tel transfert se produisait de façon exceptionnelle, le nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques qui existent déjà dans la nature n'augmenterait pas de beaucoup.

- 4 Dans la nature, le taux de transfert d'ADN entre bactéries dans des conditions optimales varie entre 10^{-2} et 10^{-5} . La fréquence d'intégration du gène marqueur *nptII* de plantes transgéniques à des bactéries est estimée à 10^{-17} et est donc considérée comme négligeable. Le gène *nptII* représente seulement 0,00004% du génome du maïs et serait en compétition avec le reste de l'ADN pour être intégré par la bactérie. La disponibilité d'ADN libre provenant de plantes génétiquement modifiées dans le rumen ou dans le tractus gastro-intestinal est de plus limitée du fait de sa digestion rapide par les liquides pancréatiques et la salive acide. La participation du gène *nptII* provenant de plantes transgéniques à l'ensemble du pool des bactéries résistantes à la kanamycine est encore plus négligeable quand on la compare au grand pool des gènes de résistance à la kanamycine déjà présents dans les bactéries et au taux élevé de transfert de gènes s'effectuant constamment dans les populations bactériennes. C'est pourquoi une bactérie a beaucoup plus de chances d'acquiescer un gène de résistance d'une autre bactérie que de l'ADN d'une culture génétiquement modifiée.
- 5 Les marqueurs de résistance aux antibiotiques ne confèrent une résistance qu'à des antibiotiques spécifiques. Ils ne produisent donc pas d'antibiotiques. C'est pourquoi aucun antibiotique présent dans la nourriture ne provient de plantes développées grâce à la biotechnologie.

Existe-t-il des alternatives aux marqueurs de résistance aux antibiotiques et ces marqueurs peuvent-ils être retirés ?

Alternatives aux marqueurs de résistance aux antibiotiques

Il existe deux catégories de marqueurs de substitution pour les plantes susceptibles d'être sélectionnés. Certains marqueurs confèrent une résistance à des produits chimiques autres que les antibiotiques. Ces produits chimiques, tels que les herbicides et les concentrations létales de lysine et de thréonine (acides aminés) tuent les cellules végétales. L'enzyme qui confère une résistance à de grandes concentrations de lysine et de thréonine, peut entraver la biosynthèse des acides aminés et, si elle est exprimée en grande quantité, provoquer un développement anormal de la plante. De tels gènes ne conviennent donc pas comme systèmes de marqueurs. La présence de marqueurs de tolérance ou de résistance aux herbicides peut ne pas être souhaitable. Le glyphosate est l'herbicide le plus efficace pour protéger les semis de pommes de terre des années précédentes dans les régions tempérées aux hivers doux ; c'est pourquoi les pommes de terre résistant au glyphosate ne seraient pas adaptées à ces régions. De plus, les plantes contenant des gènes marqueurs de résistance aux herbicides qui ne sont pas enregistrés comme tels pourraient encourager l'usage abusif de ceux-ci.

D'autres systèmes de marqueurs de substitution reposent sur la croissance de cellules végétales en présence de nutriments inhabituels, y compris la cytokinine, les glucuronides, le xylose ou le mannose, nutriments qui ne permettent pas la croissance de cellules végétales non transformées. Par exemple, les cellules végétales n'utilisent pas, en général, le mannose comme source de sucre. Le transfert d'un gène permettant au mannose d'être métabolisé dans les cellules végétales et la culture, par la suite, de ces cellules dans un milieu contenant du mannose comme seule source de sucre permettraient aux seules cellules qui ont intégré le gène de croître.

Lorsque ces systèmes, qui sont encore dans leur phase de développement, fonctionneront de manière fiable à grande échelle dans de nombreux environnements différents, des évaluations de risque devront être effectuées. Elles auront pour but d'évaluer les impacts écologiques potentiels des plantes ayant la capacité de pousser sur un nouveau substrat, l'impact sur l'ensemble du métabolisme de la plante et les conséquences sur le régime humain et animal suite à l'augmentation du taux de métabolites dans ces cultures, métabolites qui ne sont peut-être pas présents chez leurs équivalents traditionnels.

Le retrait des marqueurs

Il est impossible de retirer les gènes marqueurs après leur intégration dans le génome d'une plante, à moins qu'un mécanisme particulier d'extraction ne soit incorporé en même temps que le gène marqueur et le gène présentant un caractère d'intérêt au moment de la transformation. Comme cela a été précisé plus haut, il est possible d'éviter l'introduction dans les cellules végétales de gènes marqueurs résistant aux antibiotiques qui ne sont utilisés que pour l'assemblage et l'amplification d'ADN chimère dans les bactéries, et ne sont, par conséquent, pas nécessaires dans l'étape de transformation de la plante.

Le retrait avant la commercialisation de gènes marqueurs qui sont véhiculés par des promoteurs végétaux et qui sont utilisés pour la sélection de plantes végétales est devenu le but à la fois des consommateurs et des industriels. Des recherches approfondies dans ce domaine sont menées par l'industrie et les institutions universitaires. Les nouvelles technologies qui sont en cours d'évaluation sont les suivantes :

- 1 L'utilisation de méganucléases (par exemple, le système Cre/lox). Il s'agit d'enzymes qui reconnaissent de façon spécifique de longues séquences d'ADN. Ces séquences de reconnaissance sont introduites des deux côtés du gène marqueur résistant à l'antibiotique. Une fois que les cellules transformées ont été sélectionnées par rapport à l'antibiotique correspondant, la méganucléase est insérée dans la cellule végétale et permettra l'excision du gène marqueur résistant aux antibiotiques. Il a été prouvé que cette technologie était très efficace pour certaines plantes, mais difficile à appliquer pour d'autres ; ceci est peut-être dû au fait que la méganucléase reconnaît des sites propres au génome de la plante.
- 2 La présence de séquences homologues d'ADN sur les deux côtés du gène marqueur de résistance aux antibiotiques peut permettre la recombinaison aléatoire et l'élimination du gène. Ce processus de recombinaison homologue se produit rarement ; il est peut-être spécifique à la plante.

3 Il est possible d'introduire le caractère d'intérêt et le marqueur résistant aux antibiotiques sur différents ADN chimères. Suite à la transformation, chaque molécule est intégrée à un chromosome différent. Dans ce cas, il est possible de séparer le caractère d'intérêt du gène marqueur à la génération suivante. La fréquence d'intégration dans des chromosomes différents peut être très faible, si on la compare à l'intégration au même locus. Les facteurs qui jouent un rôle dans la régulation de cette fréquence n'ont pas encore été élucidés.

Les chercheurs s'acharnent à développer ces technologies. Certains produits utilisant l'une ou l'autre de ces stratégies sont déjà en cours de développement. Mais, actuellement, aucune de ces approches ne peut être mise en application de façon usuelle pour chaque culture. Le développement de ces technologies sera probablement limité, dans un premier temps, aux laboratoires dotés d'une infrastructure solide. Financièrement, ces laboratoires devront pouvoir se permettre le développement d'un nombre plus élevé de lignées de plantes transgéniques contenant le gène marqueur de l'antibiotique qui sera ensuite nécessaire afin d'identifier le gène marqueur qui va être éliminé.

Modifications des éléments juridiques des gènes marqueurs

Les craintes concernant les gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques portent principalement sur leur transfert et leur expression dans les cellules bactériennes ; une technologie qui empêcherait une telle expression devrait être envisagée. Les gènes utilisés pour la sélection végétale sont déjà contrôlés par des séquences de promoteurs végétaux qui rendent peu probable leur expression dans les bactéries. L'introduction d'une séquence d'introns dans le gène marqueur limiterait son expression aux cellules végétales et empêcherait toute expression dans les bactéries. Les introns sont des séquences d'ADN qui interrompent naturellement le codage dans les cellules animales et végétales. Celles-ci sont armées de mécanismes permettant leur retrait au cours de la phase de transcription contrairement aux bactéries qui ne pourraient donc pas lire un gène contenant des introns.

Les gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques, tels le gène *nptII*, qui fournit une résistance à la kanamycine font l'objet de recherches approfondies sur les aspects suivants : fonctionnement, propriétés chimiques et prévalence dans la communauté bactérienne. Leur sécurité a été bien examinée et évaluée. Dans ces

conditions, il est probable que cela soit encore long et difficile avant que ne soit établie une confiance égale à celle pour le gène *nptII* pour un autre système de sélection. Les inquiétudes qui subsisteraient au sujet de tels gènes pourraient être levées par l'ajout d'un intron.

Conclusions

Les experts scientifiques s'accordent à dire que la cause principale de propagation de la résistance aux antibiotiques est l'usage abusif de ces derniers en médecine humaine et animale. Les inquiétudes du public au sujet de l'utilisation des cultures génétiquement modifiées avec des marqueurs de résistance aux antibiotiques sont grandes, d'autant plus que ces problèmes ont été soulevés, à plusieurs reprises, par les médias. Plusieurs gouvernements de l'Union européenne ont recommandé le retrait progressif des cultures génétiquement modifiées contenant des marqueurs de résistance aux antibiotiques. Cependant, le risque de compromettre l'efficacité des antibiotiques est considéré comme extrêmement faible. La plupart des alternatives sont encore en phase de développement, ne sont pas facilement disponibles, et seront plus difficiles à mettre en œuvre dans un pays en voie de développement.

Même s'il n'est pas démontré que les marqueurs de résistance aux antibiotiques ou autres marqueurs sont néfastes, comme c'est le cas en général, il serait préférable, à long terme, que les cultures transgéniques ne portent que les gènes nécessaires à leur rendement et non les marqueurs sélectifs.

Les marqueurs de substitution et les systèmes de retrait de marqueurs font actuellement l'objet d'études suite aux inquiétudes du public. Ces études visent également à augmenter le nombre d'outils disponibles en biologie moléculaire végétale. Puisque le temps nécessaire au développement de nouvelles méthodes de substitution varie en fonction des différents produits agricoles, il sera nécessaire de donner du temps pour assurer une transition progressive vers de telles technologies. L'évaluation de la sécurité de nouveaux systèmes s'avère également cruciale, avant que ces systèmes ne soient utilisés dans des produits destinés à la commercialisation. Le remplacement de la technologie qui utilise des gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques comme le gène *nptII* sera souhaitable lorsque les nouvelles technologies bénéficieront, au moins, du même degré de connaissances scientifiques et de confiance quant à leur utilisation, comme c'est le cas pour le gène *ntpII* et les produits le contenant.

Références

- Opinion of the scientific committee on plants regarding the submission for placing on the market of genetically modified insect resistant lines notified by the Pioneer Genetic SARL Company, 1998. (http://Europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out10_en.html)
- Zentral Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS, Germany), Stellungnahme der ZKBS zur Biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen <http://yellow-fever.rki.de/GENTEC/ZKBS/ZKBS.HTM/ALLGSTELL/99/ANTIBIOTIKA.HTM&1>
- WHO Food Safety Unit. *Health aspects of marker genes in genetically modified plants*, 1993. Report of a WHO Workshop.
- OECD, Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on chemicals. *Working group on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, Draft response to the G8*. 2000
- FAO/WHO *Safety aspects of genetically modified food of plant origin*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. 2000.
- Nordic Working Group on Food Toxicology and Risk Assessment. S. Kärenlampi. *Health effects of marker genes in genetically engineered food plants*. 1996. TemaNord 1996: 530. Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Kuopio, P.O. Box 1627, FIN-70211 Kuopio, Finland