

## **Microorganismes recombinés et écosystème bactérien du tube digestif**

Proposition de programme de recherche et utilité des animaux à flore contrôlée pour estimer les risques  
par R. Ducluzeau Laboratoire d'Ecologie microbienne, INRA - Jouy-en-Josas

Les industries agro-alimentaires utilisatrices de bactéries vivantes et tout particulièrement celles qui utilisent des ferments lactiques vont, dans un avenir désormais proche, proposer sur le marché des bactéries modifiées par les techniques du génie génétique. Les gènes modifiés sont placés soit directement sur le chromosome des bactéries, soit portés sur des molécules d'ADN extra-chromosomiques, le plus souvent des plasmides. Ces bactéries modifiées en vue d'améliorer leur efficacité technologique vont naturellement être ingérées en grande quantité par le consommateur avec le produit fermenté : la consommation d'un pot de yaourt entraîne l'ingestion d'environ 100 milliards de lactobacilles et de streptocoques. Les bactéries vivantes ainsi ingérées vont transiter à travers l'estomac et l'intestin grêle du consommateur, y survivre plus ou moins longtemps, se mêler aux bactéries de la flore autochtone dans le gros intestin et, avec les fèces, être rejetées dans l'environnement.

Le remplacement des ferments traditionnels par des microorganismes à ADN recombiné pose des questions de deux ordres :

- .- impact toxicologique de ces bactéries sur le consommateur, c'est-à-dire le risque de voir apparaître directement un effet pathogène pour l'hôte ;
- .- impact écologique sur l'écosystème de sa flore intestinale, c'est-à-dire le risque de voir apparaître des bouleversements considérables de la flore du tube digestif se traduisant dans un second temps par des effets nocifs pour l'hôte.

Nous allons tenter d'examiner dans les deux cas la nature et l'étendue des risques et de voir comment l'utilisation d'animaux gnotoxéniques (littéralement : associés uniquement à des microorganismes connus), à flore totalement contrôlée et élevés dans des isolateurs clos, peut amener des éléments de réponse.

### **L'impact toxicologique des bactéries à ADN recombiné**

C'est à l'heure actuelle sûrement le moins préoccupant des deux types de risque envisagés dans le cas des ferments utilisés par l'industrie agro-alimentaire. Le risque de transformer ces ferments en bactéries directement pathogènes pour l'homme semble a priori nul puisque ni le génome de ces bactéries, ni le fragment d'ADN qu'on y insère ne porte de déterminant de pathogénicité.

Par ailleurs de nombreuses techniques classiques permettent d'apprécier la pathogénicité d'une souche bactérienne et peuvent être appliquées ici même si cette pathogénicité est hautement improbable : mesure de cytotoxicité in vitro, de dose létale 502 sur des animaux de laboratoire, etc.

L'animal gnotoxénique peut aussi constituer un élément supplémentaire important dans l'appréciation de la toxicité potentielle dans le tube digestif. Il est en effet souvent impossible d'apprécier la toxicité potentielle d'une souche bactérienne en la faisant ingérer à un animal porteur d'une flore microbienne complexe dans son tube digestif (animal holoxénique : c'est-à-dire associé sans contrôle à tous les microorganismes capables de peupler l'écosystème). En effet, la souche ingérée est alors éliminée par la flore autochtone sans atteindre un développement suffisant in situ pour exprimer sa pathogénicité. Par contre, si on l'ensemence seule chez un animal axénique (totalement dépourvu de microorganismes), elle se développe le plus souvent et atteint un niveau élevé et stable où elle peut alors exercer son effet pathogène. C'est ainsi que certaines souches de *Clostridium difficile*, pourtant productrices d'une entérotoxine redoutable pour l'homme, sont inoffensives quand on les fait ingérer à des animaux holoxéniques, mais tuent en 48 heures tous les animaux axéniques chez lesquels elles se multiplient (4).

L'ensemencement d'un microorganisme à ADN recombiné chez des animaux axéniques dont on observera la morbidité et la mortalité constitue donc un élément d'appréciation important de l'innocuité d'une bactérie destinée à être ingérée.

Remarquons enfin qu'une bactérie incapable de s'implanter chez un animal axénique (pour des raisons d'inadéquation des conditions physico-chimiques régnant dans le tube digestif) ne peut guère être soupçonnée d'avoir un effet sur l'hôte.

## **L'impact sur l'écosystème de la flore du tube digestif**

### **Quelques rappels concernant l'écosystème microbien du tube digestif**

La population microbienne qui vit dans les cavités du tube digestif est sûrement une des plus denses qui existe sur terre : environ 1 014 bactéries viables sont présentes dans le tube digestif d'un homme, soit environ 10 bactéries pour une cellule dont est constitué le corps de cet homme. Ces bactéries sont essentiellement localisées dans les segments distaux du tube digestif : iléum, caecum, colon. Au contraire, les segments proximaux de l'intestin grêle sont presque dépourvus de bactéries et la flore stomacale, surtout chez l'homme, est quantitativement faible. On distingue dans la flore du gros intestin une flore dominante, constituée de bactéries anaérobies strictes, souvent tuées par un contact de quelques minutes avec l'oxygène de l'air, et dont les populations atteignent des valeurs de l'ordre de  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de contenu. Seules ces populations de bactéries dominantes peuvent avoir un impact positif ou négatif sur l'hôte. Les populations de bactéries sous-dominantes, réprimées par les précédentes ne dépassent pas  $10^7$  bactéries par gramme de contenu et sont alors incapables d'exercer leur effet sur l'hôte. Par contre à la moindre rupture des barrières qui les répriment elles peuvent apparaître dans la flore dominante et exercer leurs actions sur l'hôte. Enfin, de nombreuses bactéries ingérées par l'hôte, en particulier avec sa nourriture, ne font que transiter dans le tube digestif sans s'y multiplier.

La flore microbienne du tube digestif joue deux rôles importants pour l'hôte qui l'abrite. Tout d'abord cette flore exerce un effet de barrière extrêmement puissant à l'égard de la plupart des bactéries de l'environnement qui pénètrent dans l'écosystème et en particulier à l'égard des espèces potentiellement pathogènes. Par ailleurs, la flore métabolise les fractions indigestibles de l'aliment et les sécrétions digestives de l'hôte et déverse dans la lumière du tube digestif les produits de ce métabolisme : elle est ainsi capable d'agir sur de nombreuses fonctions physiologiques de l'hôte, en particulier celles qui sont liées à la sphère digestive (6)

## **Y a-t-il un risque réel pour l'hôte à modifier l'équilibre de l'écosystème microbien du tube digestif ?**

Souvent les écologistes traditionnels focalisés sur la nature des organismes constituant les écosystèmes, émettent

l'opinion que tout changement important dans la taille des populations ou la structure des communautés d'un écosystème, en relation directe avec l'arrivée d'un matériel étranger, doit a priori et en soi, être considéré comme un effet nuisible (2). Dans le cas de l'écosystème microbien du tube digestif, on peut craindre surtout que les fonctions de l'écosystème soient modifiées par l'arrivée de microorganismes étrangers et que ce déséquilibre se traduise par des effets pathologiques pour l'hôte.

Une situation de déséquilibre particulier de la flore du tube digestif a été très étudiée : celle qui résulte de l'ingestion d'antibiotiques. Sa manifestation la plus spectaculaire est la disparition de nombreux effets de barrière dus à la flore dominante et l'apparition dans celle-ci de bactéries pathogènes jusque là réprimées, dont l'effet peut aller du déclenchement de diarrhées bénignes à la mort due à une entérocolite nécrosante. Mais d'autres effets indésirables peuvent aussi être observés au niveau physiologique : action sur le transit digestif, sécrétion de molécules potentiellement carcinogènes, transformation de substances inoffensives venant de l'aliment en substances ayant un effet néfaste sur l'hôte, modification d'activité de certains médicaments, ...

A la question de savoir si des modifications de l'équilibre de l'écosystème sont susceptibles d'avoir un effet nocif sur l'hôte, on peut donc objectivement répondre oui.

## **L'écosystème peut-il être modifié par l'ingestion de bactéries exogènes ?**

Les effets de barrière rendent difficile l'établissement en nombre élevé de bactéries exogènes dans le tube digestif. Cependant, ces effets peuvent parfois disparaître soit spontanément, soit plus souvent à la suite de perturbations extérieures comme l'ingestion d'antibiotiques ou de modifications importantes du régime alimentaire : c'est ainsi par exemple que l'on explique la survenue des diarrhées du voyageur dans des pays où la probabilité d'ingérer des entérobactéries pathogènes est très élevée et les habitudes alimentaires des voyageurs très perturbées.

Enfin, il faut bien dire que l'on ignore tout des caractéristiques génétiques susceptibles de donner "un avantage écologique" à une souche bactérienne donnée et de lui permettre ainsi de s'installer dans la flore dominante. on peut toujours craindre de voir des gènes codant pour de tels caractères, présents dans une souche ingérée sans qu'on ait pu les mettre en évidence auparavant.

Il existe une autre possibilité pour les bactéries ingérées, même si elles ne s'établissent pas, de modifier l'écosystème microbien du tube digestif : c'est le transfert de caractères génétiques aux souches résidentes par les souches exogènes en transit. Une telle possibilité a déjà été démontrée "in vivo" pour les bactéries porteuses de plasmides codant pour des caractères de résistance aux antibiotiques (7). Même si il semble que souvent, en l'absence de pression de sélection par les antibiotiques, les souches porteuses de plasmides restent, dans le tube digestif, réprimées par les souches qui en sont dépourvues, ce n'est pas général ; d'autres facteurs écologiques entrent en compte pour modeler l'équilibre.

Par ailleurs et sur le plan expérimental, on constate que les équilibres obtenus "in vitro", même en culture continue, avec les mêmes souches ne reflètent pas toujours l'équilibre qu'on observe "in vivo".

Les expériences faites dans ce domaine à l'aide d'animaux à flore contrôlée sont encore peu nombreuses et ne permettent pas, en particulier, de savoir si la nature des vecteurs génétiques portés par les bactéries joue un grand rôle dans le transfert d'un caractère "in vivo" : un caractère porté par un plasmide conjugatif (c'est-à-dire intervenant dans le mécanisme de conjugaison interindividuel, à la base d'échanges de matériel génétique entre bactéries) se transmet-il plus facilement dans l'écosystème digestif ? Peut-on avoir des passages "in vivo" des bactéries à Gram positif aux bactéries à Gram négatif (a) ? Autant de questions dont la réponse nécessite des expérimentations.

- (a) Bactéries Gram+ : groupe de germes bactériens possédant une paroi dont la structure chimique permet de fixer le colorant bleu de Gram. Bactéries Gram- : groupe de bactéries dont la paroi a une structure différente ne fixant pas le colorant de Gram.

## **Quelles réponses à ces questions peut-on attendre de l'utilisation d'animaux gnotoxéniques ?**

La nécessité d'expérimenter "in vivo" pour déterminer l'impact sur l'écosystème microbien du tube digestif d'une souche bactérienne à ADN recombiné est évidente.

Tout d'abord, il existe des bactéries de l'écosystème que l'on ne sait pas cultiver "in vitro", mais que l'on détecte "in vivo" par leurs fonctions.

Comme pour tous les écosystèmes bactériens, les équilibres que l'on obtient en cultivant des souches de l'écosystème "in vitro" ne reproduisent généralement pas les équilibres existant "in vivo" : ainsi, on a pu observer qu'entre deux bactéries isogéniques, ne différant que par la présence chez l'une d'un plasmide codant pour la résistance à la tétracycline (un antibiotique), l'équilibre s'établit en culture continue en faveur de la souche sans plasmides alors que l'on observe l'inverse "in vivo" chez des animaux gnotoxéniques (3).

Un autre exemple illustre la difficulté de prévoir le comportement "in vivo" de bactéries exogènes. on utilise pour obtenir un "confinement biologique", des souches d'E. coli réceptrices d'ADN étranger qui sont exigeantes en acide diaminopimélique (DAP), substance uniquement d'origine bactérienne et peu répandue dans l'environnement. on a pu montrer à l'aide de modèles gnotoxéniques que les parois de certaines bactéries de la flore du tube digestif pouvaient servir de source de DAP aux mutants exigeants et permettre leur croissance "in vivo". En revanche, le DAP présent dans les parois d'autres bactéries n'est pas utilisé comme substrat par ces mutants (5).

L'outil de choix pour les études d'impact sur l'écosystème bactérien est donc l'animal gnotoxénique c'est-à-dire l'animal axénique associé à une flore contrôlée et élevée dans une enceinte étanche à l'environnement microbien, appelée isolateur. on constitue ainsi un véritable microcosme, c'est-à-dire une fraction minimale d'écosystème complètement isolée de l'environnement extérieur et dans lequel on peut expérimenter dans des conditions proches de la réalité. Le recours au microcosme est d'ailleurs recommandé dans le cas des autres écosystèmes bactériens de l'environnement comme l'eau ou le sol (8).

L'intérêt de l'utilisation d'animaux gnotoxéniques vient d'abord des conditions de sécurité dans lesquelles on peut expérimenter. La souche à tester n'est introduite que dans une enceinte dont l'étanchéité par rapport à l'environnement bactérien peut être contrôlée facilement, en vérifiant au départ la stérilité des animaux axéniques qui y sont placés. En cas de danger lié à la souche testée, l'intérieur de l'isolateur peut facilement être stérilisé à tout moment. Notons à ce propos que contrairement au cas où l'on cherche à déterminer la toxicité de molécules chimiques, l'expérimentation à l'échelle pilote est certainement à proscrire pour mesurer les risques liés à l'utilisation d'un organisme autoreproducteur comme une bactérie. En effet, il est impossible d'empêcher une population bactérienne, même répartie sur une surface faible ou dans une population humaine ou animale limitée, de ne pas se répandre dans l'environnement, surtout, précisément, si elle est capable de bouleverser les systèmes régulateurs des écosystèmes. Quand on aura reconnu le danger, il sera alors trop tard pour arrêter l'expansion de la population. L'utilisation de microcosmes complètement hermétiques est donc la seule alternative possible.

Un autre intérêt de l'utilisation des animaux gnotoxéniques est la possibilité d'expérimenter soit dans des situations écologiques artificielles permettant d'apprécier les potentialités maximales de dissémination, soit dans des situations proches de la réalité : ainsi il est possible d'ensemencer chez des souris axéniques des flores fécales humaines et on a démontré que l'équilibre qui s'établissait chez les souris était très proche de celui qui existait chez le donneur. On peut dès lors apprécier sans danger l'impact écologique d'une souche ingérée sur la flore d'un consommateur humain.

Bien entendu, comme dans tous les écosystèmes, l'étude de la diffusion d'une bactérie à ADN recombiné dans la population complexe du tube digestif dépend de la présence de marqueurs phénotypiques plus ou moins facilement identifiables ou de la possibilité de reconnaître le fragment d'ADN intégré (sondes d'ADN, par exemple).

Finalement, on pourrait suggérer pour tester les risques liés à l'ingestion de bactéries à ADN modifié par le consommateur, les étapes suivantes qui pourraient être largement modulées en fonction des caractères portés par l'ADN utilisé, du type de vecteurs et aussi de l'utilisation technologique de la souche :

- .- Etude de la morbidité et de la mortalité chez les animaux axéniques monoassociés à la souche transformée. Etude de sa stabilité génétique de la souche "in vivo" ;
- .- Etude de l'équilibre et du transfert de l'ADN exogène entre la souche modifiée et la souche primitive chez des animaux dixéniques (associés à ces deux souches) ;
- .- Etude de l'équilibre et des possibilités de transfert entre la souche transformée et la souche dominante la plus proche taxonomiquement (même espèce par exemple) présente dans la flore humaine ;
- .- Chez des animaux gnotoxéniques associés à une flore complexe, étude de la survie et du transit de la souche modifiée, étude du transfert d'ADN à la flore dominante, étude de l'équilibre de la flore dominante après ingestion de la souche modifiée.

Ce type d'étude n'ayant jamais été réalisé complètement sur des souches modifiées d'intérêt industriel, il est très probable que l'expérience amènera à modifier et sans doute à simplifier les propositions ci-dessus, pour définir les tests les plus importants réalisables dans la pratique.



## Bibliographie

- (1).Andremont A. , Raibaud P. , Tancrede C. , Duval-Iflah Y. and Ducluzeau R. . The use of germfree mice associated with human fecal flora as an animal model to study enteric bacterial interactions. *Bacterial Diarrheal Diseases*. Takeda Y. , Hivatani eds. , Tokyo, 1985, p. 219-228.
- (2). Cairns J. and Pratt J.R. . Ecological consequence assessment : effects of Bioengineered organisms. *Mater Ressources Bulletin*, 1986, 22, p. 171-182a. [VU]
- (3). Corpet D.E. and Lumeau S. . Antibiotic residues and R-plasmid selection : are in vitro methods good models ? *Zbl Bakt. Hyg.* 1987, A264, p. 178-184. [VU]
- (4).Dabard J. , Dubos F. , Martinet L. and Ducluzeau R. . Experimental reproduction of neonatal diarrhea in young gnotobiotic hares simultaneously associated with *Clostridium difficile* and either *Clostridium* strains. *Infection and Immunity*. 1979, 24, p. 7-11. [VU]
- (5). Ducluzeau R. , Ladire H. , Raibaud P. . Implantation d'un mutant d'*Escherichia coli* exigeant en acide diaminopimélique dans le tube digestif de souris gnotoxéniques. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 1986, 137A, p. 79-87. [VU]
- (6). Ducluzeau R. and Raibaud P. . Ecologie microbienne du tube digestif. *Actualités scientifiques de l'INRA*. Masson ed. , Paris, 1979. [VU]
- (7).Duval-Iflah Y. , Raibaud P. , Tancrede C. and Rousseau H. . R-plasmids transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* in vitro and in vivo in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. *Infect. Immun.* , 1980, 28, p. 981-990. [VU]
- (8). Gillett J.V. . Risk assessment methodologies for biotechnology impact assessment. *Environmental Management*, 1986, 10, p. 515-532. [VU]