

**Résumé de l'Évaluation des Risques effectuée conformément au
Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles de la
Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999
Essais Expérimentaux faits avec *Pseudomonas putida* CR30RNSLL(pADPTel)
DSN 10642**

Ce document vise à expliquer la décision réglementaire prise en vertu de la Partie 6 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999* (LCPE 1999) concernant les essais au champ faits avec *Pseudomonas putida* CR30RNSLL (pADPTel) par des chercheurs de l'Université de la Saskatchewan, de l'Université Carleton et du Conseil National de Recherches.

La souche *P. putida* CR30RNSLL (pADPTel) a fait l'objet d'une déclaration conformément au paragraphe 29.11 (4) du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (Règlement sur les RSN) de la LCPE (1999). La Direction des Substances Nouvelles d'Environnement Canada et le Bureau de l'Évaluation et du Contrôle des Substances Nouvelles de Santé Canada ont évalué les renseignements présentés par les personnes citées ci-dessous et d'autres données scientifiques disponibles en vue de déterminer si *P. putida* CR30RNSLL (pADPTel) est une *substance toxique*^[1] ou pourrait devenir une substance *toxique*^[1] au sens de l'article 64 de la LCPE 1999.

Décision Réglementaire

En tenant compte des questions de danger et d'exposition et d'après leur évaluation conjointe des risques, Environnement Canada et Santé Canada ont conclu que *P. putida* CR30RNSLL (pADPTel) n'est pas considérée comme *toxique* pour l'environnement ou pour la santé humaine au Canada au sens de l'article 64 de la LCPE (1999).

L'organisme peut être introduit après le 8 juillet 2001 dans les trois sites d'essais, c'est-à-dire i) l'Université Carleton, à Ottawa (Ontario); ii) Le Centre de recherche agricole Eugene Lods, Campus MacDonald, Université McGill, à Sainte-Anne-de-Bellevue (Québec) et iii) La station de recherche sur le blé de Saskatchewan (Saskatchewan Wheat Pool Research Station), à Saskatoon (Saskatchewan).

La présente évaluation ne comprend pas d'évaluation des risques pour la santé humaine dans un environnement professionnel ni de l'exposition possible et des risques pour la santé humaine associés à l'utilisation de l'organisme dans un produit ou en tant qu'élément d'un produit assujetti à la *Loi sur les Aliments et les Drogues*.

Annexe RSN : XVII (Introduction dans le cadre d'une étude expérimentale sur le terrain)
Identification de l'organisme : *Pseudomonas putida* CR30RNSLL (pADPTel)
Type d'organisme : Bactérie
Déclarant (s) J.J. Germida, Université de la Saskatchewan, C.W. Greer, Conseil National de Recherches et R.C. Wyndham, Université Carleton
Date de la décision : Le 8 juillet 2001
Utilisation proposée : Production en laboratoire et utilisation de l'organisme *P. putida* CR30RNSLL (pADPTel) dans des essais au champ à trois sites différents afin d'étudier, pendant une période de trois ans, le devenir de l'organisme et du plasmide qu'il contient dans le sol.

[1] Aux termes de l'article 64 de la LCPE 1999, est toxique toute substance qui pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou une concentration ou dans des conditions de nature à :

- 1) avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique;
- 2) mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie; 3) constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines.

Historique de la Souche / Modifications Génétiques

La souche parentale *P. putida* CR30 est un microorganisme naturel qui a été isolé de la rhizosphère de *Brassica napus* (canola) au site d'essai de l'Université Carleton, à Ottawa. Cette souche a été isolée sur une gélose tryptone-extrait de levure (TYE) contenant de l'acide cyanurique (métabolite de l'atrazine et source d'azote). Elle a été formellement identifiée d'après BIOLOG, FAME et l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S. La souche CR30 possède une résistance intrinsèque à des concentrations élevées de chloramphénicol et d'ampicilline, à des concentrations modérées de tétracycline et à des concentrations faibles de rifampicine, d'acide nalidixique et de streptomycine.

Les modifications génétiques effectuées sur la souche *P. putida* CR30 permettent de suivre simultanément le devenir de la souche faisant l'objet de la déclaration (à l'aide des gènes rapporteurs *lac* [propriétés colorimétriques] et *lux* [propriétés de bioluminescence]), et le devenir des gènes portés par son plasmide (*atz* [gènes de dégradation de l'herbicide] et *kilAtelAB* [gènes de résistance au tellurite]) dans le sol. Les gènes *atz* et *kilAtelAB* agissent comme marqueurs de sélection. La souche *P. putida* CR30RNSLL(pADPTel) a été obtenue comme suit :

1. *P. putida* CR30RNS, possédant une résistance élevée à la rifampicine (R), à l'acide nalidixique (N) et à la streptomycine (S), a été obtenue en exerçant une pression sélective sur la souche CR30. Pour ce faire, l'organisme parental a été cultivé en milieu TYE contenant des concentrations de plus en plus élevées de chacun des antibiotiques de manière à obtenir CR30R, puis CR30RN et finalement CR30RNS.
2. Pour transformer CR30RNS en CR30RNSLL, la cassette de gènes *lacZY-luxAB* provenant du plasmide pLLM1 (construit avec la méthode de Masson *et al.* 1993) a été insérée dans le chromosome de la souche CR30RNS. La cassette de gènes *lacZY-luxAB* comprend le gène de la bêta-galactosidase (Z) et le gène de la lactose perméase (Y) d'*Escherichia coli* (*lacZY*) (Barry, 1988) ainsi que le gène de la luciférase (*luxAB*) de *Vibrio harveyi* souche B392 (Miyamoto *et al.*, 1985). La cassette *lac-lux* a été insérée dans le chromosome de la souche CR30RNS par transposition avec le Tn7. Des analyses par transfert Southern et par cartographie de restriction ont montré que l'intégration des gènes insérés dans la souche CR30RNSLL est stable.
3. Le plasmide pADP-1 provient de la souche ADP de *Pseudomonas sp.* isolée d'un échantillon de sol prélevé dans un centre de distribution de l'herbicide atrazine au Minnesota (Mandelbaum *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1998). Le plasmide contient les gènes *atz* nécessaires pour dégrader l'atrazine en acide cyanurique. Les autres gènes portés par le plasmide pADP-1 sont indiqués dans le tableau 1. Pour obtenir le plasmide pADPTel, on a ajouté au plasmide pADP-1 l'opéron de la résistance au tellurite (*kilAtelAB*) provenant du plasmide pDT1558 (Walter et Taylor, 1989). L'opéron provenait à l'origine d'une souche de *Klebsiella aerogenes* isolée chez un patient de Birmingham, au R.-U. (Walter et Taylor, 1992). Parallèlement à l'étape 2, une deuxième aliquote de la souche CR30RNS a été transformée avec le plasmide pADPTel générant ainsi la souche CR30RNS(pADPTel). La présence de l'opéron *kilAtelAB* dans le plasmide pADPTel a été confirmée par transfert Southern.
4. La souche CR30RNSLL(pADPTel) faisant l'objet de la déclaration a été obtenue par transfert conjugationnel du plasmide pADPTel de la souche CR30RNS(pADPTel) à la souche CR30RNSLL. Les transconjugants ont été cultivés sur un milieu sélectif contenant du glucose, de l'atrazine (comme seule source d'azote), de la tellurite, de la rifampicine et de l'acide nalidixique. Ils ont été identifiés par la production d'un pigment noir sur le milieu de sélection ainsi que par leur capacité de bioluminescence en présence de n-decanal.

Examen des dangers

Pathogénicité / Toxicité

En plus d'examiner les renseignements soumis par les déclarants, on a procédé à un examen du matériel de référence interne et à une recherche exhaustive des ouvrages scientifiques afin de réunir l'information concernant les effets potentiellement nuisibles pour la santé humaine et pour l'environnement attribuables à *P. putida* et aux souches suivantes qui ont été reclassifiées comme suit : *P. putida*: *P. ovalis*, *P. convexa*, *P. rugosa*, *P. striata*, *P. schuyllkilliensis*, *P. eisenbergii*, *P. incognita* et *Arthrobacter siderocapsulatus*.

P. putida est très courante dans les sols et les rhizosphères des plantes et peut être aussi isolée de l'eau, des plantes et de sources animales, du milieu hospitalier et de spécimens cliniques d'origine humaine (OCDE, 1997). Le Bureau de la Sécurité des Laboratoires de l'Agence de Santé Publique du Canada a désigné *P. putida* comme un organisme du Groupe de risque 1. En effet, *P. putida* est rarement infectieux et il est considéré comme non pathogène pour les humains. Dans quelques rares cas, *P. putida* a été identifiée comme source d'infections secondaires telles que la septicémie, l'arthrite septique et la bactériémie chez des personnes immunodéprimées (Anaisie *et al.*, 1987; Romney *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1996). Malgré une présence fort répandue de cet organisme dans l'environnement et son utilisation généralisée en recherche et dans des applications environnementales, les cas d'infection primaire et de réactions allergiques attribués à *P. putida* sont rares dans la littérature scientifique.

P. putida peut infecter une grande variété d'animaux, dont les chèvres, les koalas, les dindons, les oies, les poissons, les tortues, les bovins, les chevaux, les écrevisses, les escargots et les mouches de l'olivier (OCDE, 1997). Dans certains cas signalés, la maladie a été attribuée à d'autres agents étiologiques (Nishimori *et al.*, 2000) ou concomitants à la présence de *P. putida* (Ladds *et al.*, 1990; Cheng, 1986). *P. putida* est aussi un pathogène pouvant présenter des risques pour les poissons d'élevage et les poissons sauvages (OCDE, 1997; Egusa, 1992), dont la sérieole, au Japon (Kusuda et Toyoshima, 1976). *P. putida* n'est pas considéré comme un agent étiologique chez les poissons à nageoires au Canada (Communication personnelle, Nathalie Bruneau, Ministères des pêches et des Océans, mai 2001). La température optimale de croissance pour la souche faisant l'objet de la déclaration est de 35°C, mais elle peut croître à des températures atteignant les 41°C. Comme la plupart des souches de *Pseudomonas putida* ne peuvent croître à des températures élevées, l'organisme ne présente qu'un faible risque d'infection opportuniste chez les animaux à sang chaud (OCDE, 1997). Dans une étude *in vivo* réalisée par George *et al.* (1999), deux jours après l'administration, par voie intranasale, de $1,17 \times 10^7$ cfu de *P. putida* à des souris mâles résistantes à l'endotoxine, la bactérie avait été éliminée des poumons et du tractus intestinal des animaux. En outre, dans cette étude, aucune mortalité n'a été observée chez les animaux qui avaient reçu un seul traitement pouvant compter jusqu'à $1,2 \times 10^9$ cfu de *P. putida*.

P. putida n'est pas considéré comme pathogène pour les végétaux (Bradbury, 1986). On sait toutefois que quelques souches produisent de la pectate lyase, une enzyme intervenant dans la pourriture molle des racines (Zolobowska et Pospieszny, 1999; Park *et al.*, 1997). La multiplication de *P. putida* dans la rhizosphère de plantes de riz paddy a été associée à la maladie dite de « suffocation » (Bradbury, 1986). Dans les essais à l'aide de sondes d'ADN réalisés par les déclarants, le gène de la pectate lyase n'a pas été détecté dans la souche faisant l'objet de la déclaration.

Construction Génétique

Les risques associés au matériel génétique inséré ont été examinés à chaque étape du processus de clonage. .Tel qu'indiqué dans le tableau 1, certains des gènes insérés ne peuvent être répliqués et/ou exprimés dans la construction finale. Les gènes présents dans la construction finale, dont les marqueurs de sélection (résistance aux antibiotiques et résistance au tellurite, dégradation de l'atrazine ainsi que les propriétés conférées par les gènes *lac-lux*) ne présentent qu'un risque intrinsèque faible, voire nul pour l'environnement. Aucun de ces éléments génétiques n'a de pouvoir pathogène, toxique ou toxicogénique pour l'humain.

Tableau 1a. Examen des dangers associés à la construction génétique de la souche déclarée - Construction finale du pADPTel

Élément de la construction	Danger
gènes <i>mer</i> dans le pADPTel	Faible. Les gènes <i>mer</i> confèrent la résistance aux ions mercure, qui autrement seraient toxiques pour l'organisme. Les organomercurels ne sont plus utilisés en thérapeutique. Naturellement présents sur le pADP-1.
éléments mobiles (opérons <i>tra</i> et <i>trb</i>) dans le pADPTel	Aucun danger intrinsèque. Permettent au plasmide d'être transmis à une vaste gamme d'organismes par le biais de la conjugaison, transférant ainsi tous les gènes du plasmide. Naturellement présents sur le pADP-1.
<i>oriV</i> dans le pADPTel	Aucun danger intrinsèque. Cette origine de répllication permet au plasmide de se répliquer dans une vaste gamme d'hôtes. Le plasmide IncP est viable dans la plupart des protéobactéries. Naturellement présent sur le pADP-1.
L'opéron <i>ki/AtelAB</i> dans le pADPTel (~3 Kb, confirmé exempt d'ADN étranger)	Faible. Confère la résistance au tellurite. Existe dans la nature. L'utilisation commerciale du tellurite est limitée à une épreuve d'identification de bactéries coliformes. Si la résistance au tellurite était répandue, l'emploi du tellurite dans l'épreuve d'identification serait moins utile.
gènes <i>atz</i> dans le pADPTel	Faible. Permettent aux bactéries de dégrader l'atrazine et de croître lorsque l'atrazine est la seule source d'azote. Existents dans la nature. Naturellement présents sur le pADP-1.
3 x IS1071 (courtes séquences répétées inversées de la famille des éléments transposables tn3)	Aucun danger intrinsèque. Courtes séquences répétées inversées reconnues par <i>tnpA</i> et <i>tnpR</i> , qui permettent la transposition de l'ADN situé entre ces séquences. Naturellement présentes sur le pADP-1.
Gènes inconnus supplémentaires sur le pADPTel, provenant du précurseur pADP-1	Danger inconnu. Selon une analyse BLAST, les séquences géniques sont homologues à celles des transposases, des gènes des transporteurs ABC, des gènes métaboliques et à celles d'autres gènes dont la fonction demeure inconnue. Pourraient jouer un rôle dans le transfert de gènes.

Tableau 1b. Examen des dangers associés à la construction génétique de la souche déclarée - Construction finale du CR30RNSLL

Élément de la construction	Danger
ADN étranger dans la cassette d'insertion <i>luxAB</i>	Faible. Vérification effectuée à l'aide d'une recherche BLAST de la séquence de l'insert Tn7.
ADN étranger dans la cassette d'insertion Tn7- <i>lacZY</i>	Faible. Vérification effectuée à l'aide d'une recherche BLAST de la séquence de l'insert Tn7.
Résistance à 100 µg/mL de rifampicine, d'acide nalidixique et de streptomycine	Faible. Confère une résistance aux antibiotiques indiqués, obtenue par une pression sélective. Résistances chromosomiques, probablement dues à des mutations ponctuelles (moins facilement transférables) plutôt qu'à des gènes de résistance portés par des plasmides (plus facilement transférables). La rifampicine est utilisée à l'occasion chez les animaux; l'acide nalidixique est un composé apparenté à des antibiotiques de la classe des fluoroquinolones utilisés dans les traitements thérapeutiques; l'utilisation thérapeutique de la streptomycine est restreinte. Type de résistances existant dans la nature.
fusion de promoteur <i>trp-lac-iucA</i>	Faible. Il s'agit d'un promoteur constitutif. La séquence a été analysée au moyen d'une recherche BLAST et aucun danger connu n'a été relevé.
gènes <i>lacZY</i> dans le chromosome	Faible. Permettent la dégradation du lactose et d'analogues du lactose. Existents dans la nature. Insertion dans le chromosome confirmée par transfert Southern.
gènes <i>luxAB</i> dans le chromosome	Aucun danger intrinsèque. Rendent les bactéries bioluminescentes. Insertion dans le chromosome confirmée par transfert Southern.
bras Tn7	Aucun danger intrinsèque. Situés de part et d'autre du segment <i>lacZYluxAB</i> . Non mobiles à moins que les gènes de la transposase Tn7 ne soient présents.

Les Marqueurs

Même si en 1989 le Comité consultatif en matière de biotechnologie de l'EPA, aux É.-U., considérait que l'ampicilline, la tétracycline et le chloramphénicol présentaient un danger modéré, on ne considère pas que l'utilisation thérapeutique de ces antibiotiques sera compromise par les essais au champ prévus avec l'organisme déclaré. On signale, dans la nature, des taux appréciables d'acquisition de résistance par le biais de plasmides pour ces trois antibiotiques, ce qui a limité leur utilité ou leur efficacité en médecine vétérinaire (Prescott, 2000). Étant donné l'absence de pression sélective à l'égard du transfert de ces gènes de résistance et étant donné que la souche parentale présentait les mêmes taux élevés de résistance pour les trois antibiotiques et que l'on s'attend à ce que l'exposition environnementale de la souche faisant l'objet de la déclaration soit limitée aux trois sites d'essai, l'utilisation thérapeutique de ces antibiotiques en médecine vétérinaire et humaine ne risquerait pas d'être compromise par la présente étude expérimentale sur le terrain.

Il semble que la résistance à l'acide nalidixique, à la streptomycine et à la rifampicine chez *P. putida* CR30RNS provienne soit de mutations ponctuelles dans les gènes codant pour des enzymes qui métabolisent ces antibiotiques (Prescott, 2000; Walker, 2000; Glandorf *et al.*,

1992), soit de changements dans la perméabilité de la paroi cellulaire. Par conséquent, il s'agit probablement de résistances d'ordre chromosomique. De telles résistances sont plus stables que celles portées par plasmides (Compeau *et al.*, 1988). On sait que la résistance à ces antibiotiques existe dans la nature et qu'elle s'établit facilement (Safronova *et al.*, 1991; Adesiyun et Downes, 1999; Endtz *et al.*, 1991; Hosoda *et al.*, 1990). Tel qu'il est conçu, l'essai n'offre aucun avantage sélectif aux microorganismes résistants à ces antibiotiques. L'utilisation thérapeutique de ces antibiotiques chez les animaux ou les humains risquerait donc peu d'être compromise par leur utilisation comme marqueurs de sélection.

L'utilisation de marqueurs de résistance aux métaux lourds est préférable à l'utilisation de marqueurs de résistance aux antibiotiques. L'opéron *kiAtelAB* de *K. aerogenes* confère la résistance au tellurite et donne à l'organisme déclaré des propriétés colorimétriques lors de la dégradation de tellurite dans le milieu de culture. Le gène de résistance au tellurite existe dans la nature. Comme les gènes *atz*, le gène *kiAtelAB* est porté par un plasmide et on s'attend à ce qu'il soit transféré aux bactéries environnantes dans les sites d'essai. On s'attend néanmoins que la présence de ce gène ne présente qu'un faible risque.

L'atrazine est un herbicide largement utilisé en Amérique du Nord. On trouve de l'atrazine dans de nombreux habitats aquatiques (eaux de surface et souterraine) et terrestres. La présence de l'atrazine à ces endroits est attribuable aux pratiques agricoles de lutte antiparasitaire. Les sous-produits habituels de la dégradation de l'atrazine peuvent être toxiques; Cependant, la souche déclarée a été modifiée génétiquement de manière à dégrader l'atrazine en des sous-produits non toxiques. Si la dégradation est incomplète, certains des sous-produits toxiques pourraient être métabolisés par d'autres bactéries du sol (De Souza *et al.*, 1998) tandis que d'autres sous-produits pourraient s'accumuler comme dans le cas des sols contaminés par l'atrazine décrits dans la littérature (Costa *et al.*, 2000; Topp *et al.*, 2000; Lerch *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1982).

Les deux gènes marqueurs *lacZY* et *luxAB* ont été incorporés de façon stable dans le chromosome de la souche CR30RNSLL (pADPTel) par un événement d'intégration unique. Leur intégration chromosomique a été confirmée par transfert Southern. Les gènes *lacZY* permettent la dégradation du lactose et des analogues du lactose. Dans des milieux de culture contenant entre autres du lactose ou des analogues du lactose comme seule source de glucides, les gènes *lacZY* servent de marqueurs phénotypiques pour donner à l'organisme déclaré une couleur caractéristique. L'opéron lactose est un système métabolique qui existe naturellement chez les bactéries. Godbout *et al.* (1995) ont trouvé que le système de marqueur chromosomique *lac-lux* est stable dans d'autres bactéries et qu'il ne modifie ni la croissance ni la physiologie de l'organisme hôte. Le système de marqueur *lac-lux* ne confère aucun avantage sélectif, et on ne s'attend pas à ce qu'il soit transféré à d'autres bactéries en raison de la rareté des mécanismes de transfert telles la recombinaison homologue ou la transposition. On s'attend aussi à ce que l'introduction de ces gènes ne présente qu'un risque faible. Les gènes *luxAB* rendent les bactéries bioluminescentes; et servent donc comme des marqueurs. Aucun danger intrinsèque n'est associé à ces gènes.

Examen des Dangers d'Exposition

En général, on s'attend à ce que les populations de microorganismes introduits dans des sols non stériles diminuent avec le temps (Van Veen *et al.*, 1997; Winstanely *et al.*, 1993). La survie de *P. putida* est meilleure dans la rhizosphère des plantes que dans le sol, sans doute parce que la plante fournit des exsudats aux bactéries (OCDE, 1997).

La solution aqueuse (inoculum) contenant *P. putida* CR30RNSLL(pADPTel) sera préparée dans des installations étanches à l'Université Carleton, à l'Université de la Saskatchewan et à l'Institut de recherche en biotechnologie du Conseil national de recherches, à Montréal. Le niveau de biosécurité de ces installations excède les exigences du niveau de biosécurité 1 des Lignes Directrices de Santé Canada en matière de Biosécurité en Laboratoire (1996). Bien que

P. putida soit considéré comme un organisme du groupe de risque 1, les laboratoires dans lesquels il sera cultivé et les pratiques adoptées dans ces laboratoires satisfont aux exigences des lignes directrices des laboratoires de niveau de biosécurité 2. Les cellules seront cultivées en milieu liquide, recueillies, lavées et remises en suspension dans de l'eau, à une concentration de 10^8 CFU/mL. Elles seront utilisées dans les quelques heures suivant leur préparation. L'inoculum sera conservé dans des bouteilles fermées en polycarbonate, qui seront placées dans une glacière pour être transportées jusqu'aux sites d'essai.

Selon les Lignes Directrices de Santé Canada en matière de Biosécurité en Laboratoire (1996), les procédures recommandées pour la manipulation, l'entreposage et le transport sécuritaires des agents du groupe de risque 1 sont les suivantes : le port de vêtements protecteurs appropriés, notamment le sarrau, des chaussures fermées et des gants. Ce niveau ne requiert aucune caractéristique spéciale de conception autre que celles qui conviennent à un laboratoire fonctionnel et bien conçu, régi par de bonnes pratiques de microbiologie. On recommande l'entreposage et le transport de l'organisme dans un contenant dûment étiqueté, conçu, fabriqué, rempli, fermé, scellé et bien entretenu de façon à ce que, dans des conditions normales de transport et de manutention, il n'y ait pas de déversement accidentel.

Chaque année, pendant une période trois ans, environ $1,25 \times 10^{11}$ cellules viables seront transportées et appliquées sur le sol de chacun des sites d'essai au moyen d'un arrosoir. Les déclarants prévoient libérer le microorganisme faisant l'objet de la déclaration à trois sites d'essai qui seront étroitement surveillés : un à l'Université Carleton, à Ottawa (10 m x 4,7 m), un à la Station de recherche agricole Eugene Lods du Campus Macdonald de l'Université McGill, à Sainte-Anne-de-Bellevue, au Québec (12 m x 8 m), et un à la Saskatchewan Wheat Pool Research Station située près de la municipalité de Watrous, en Saskatchewan (15 m x 10 m). Chaque site d'essai sera divisé en huit parcelles d'un mètre carré sur lesquelles on appliquera la culture liquide.

Les sites d'essai de l'Université Carleton et de l'Université McGill sont situés sur le campus, près de zones à forte densité de population, mais ils sont clôturés pour en limiter l'accès. Le site d'essai de l'Université Carleton est situé dans le périmètre d'inondation susceptible d'être envahi par les eaux de crue de la rivière Rideau une fois par 100 ans, en moyenne, à environ 35 m du niveau élevé de la rivière au cours du printemps et à environ 50 m du niveau normal de la rivière pendant l'été. Le site d'essai de l'Université McGill est considéré comme une terre agricole consacrée à la recherche. Le terrain est presque plat et le site est à deux kilomètres du plan d'eau le plus proche, le fleuve Saint-Laurent. Le troisième site d'essai est situé dans une zone non peuplée près de Watrous, en Saskatchewan, à 0,5 kilomètre de la Saskatchewan Wheat Pool Research Station. La zone est considérée comme une région de terres agricoles commerciales et de terres agricoles vouées à la recherche. Le site est plat et n'est pas directement adjacent à un plan d'eau. On ne connaît aucune espèce menacée ou en péril qui vive sur les sites prévus pour l'expérience. La diversité biologique aux trois sites est surtout constituée d'arbres, de graminées, de mauvaises herbes et d'arbustes de même que d'insectes et de petits mammifères typiques d'un écosystème semi-urbain.

P. putida n'est pas considéré comme pathogène pour les humains et rien n'indique qu'il n'en soit pas de même pour la souche modifiée. Les essais au champ à petite échelle seront réalisés dans des conditions contrôlées où l'exposition des humains se limitera au personnel qui appliquera l'inoculum et qui prélèvera des échantillons *in situ*. Par conséquent, le microorganisme faisant l'objet de la déclaration est considéré comme ne présentant qu'un risque faible pour la population générale.

Survie et Persistance

P. putida ne produit pas de spores. De nombreux facteurs biotiques et abiotiques tels que l'humidité, les prédateurs, la composition du sol, la croissance des racines, la disponibilité des

éléments nutritifs et la température influencent la survie des bactéries dans le sol (van Veen *et al.*, 1997; OCDE, 1997).

Les déclarants ont présenté les données d'une étude antérieure portant sur la validation d'un microcosme (Gagliardi *et al.*, 2001), provenant d'échantillons de sol prélevés de chacun des trois sites d'essai prévus où les souches *P. putida* CR30 et CR30RNSLL(pADPTel) avaient été appliquées. Les déclarants signalent que la population de la souche déclarée a survécu pendant 28 jours d'incubation en sol stérile, mais que la densité de la population a diminué de deux ordres de grandeur. Lorsque le microorganisme a été inoculé dans la rhizosphère du canola, la densité de la population a d'abord diminué d'un ordre de grandeur au cours des 28 premiers jours, puis elle est demeurée stable au cours des 42 jours suivants. Ces données montrent que dans les sols non stériles, la survie est bien meilleure dans la rhizosphère des cultures de canola que dans des sols non cultivés.

La récupération de la souche déclarée a pu être stimulée par l'ajout d'atrazine et d'éléments nutritifs à du sol sec qui était associé aux racines du canola récolté. En l'absence de sélection pour la dégradation de l'atrazine dans le sol, le nombre de cellules de la souche déclarée a diminué jusqu'à ce que l'organisme ne soit plus décelable ni dans le sol ni dans la rhizosphère au bout de 165 jours (c.-à-d. environ moins de 100 cellules viables par gramme de sol). Cette donnée concorde avec ce qu'ont observé Glandorf *et al.* (1998), van Veen *et al.* (1997) et Winstanely *et al.* (1993), soit une diminution des populations de *P. putida* à des niveaux sous la limite de détection (10^2 CFU/g de racine) au cours d'une période de 105 jours.

Le devenir du microorganisme faisant l'objet de la déclaration, y compris sa survie à l'hiver, et sa capacité de transférer les gènes liés à la dégradation de l'atrazine et à la résistance au tellurite à des bactéries indigènes du sol, seront déterminés au cours de cet essai au champ. On s'attend à ce que la population de *P. putida* CR30RNSLL (pADPTel) dans la rhizosphère de plantes de canola diminue jusqu'à un seuil indétectable au fur et à mesure que l'atrazine sera dégradée ou lessivée du sol, mais qu'au cours des premières années, sa croissance puisse être stimulée par l'application d'atrazine. On s'attend également à ce qu'avec le temps, la souche introduite soit supplantée par les microorganismes indigènes du sol. En effet, cette étude vise d'abord à prévoir la survie de l'organisme dans le sol au champ et d'évaluer la validité de l'étude du microcosme faite en laboratoire.

Dispersion

La souche sera appliquée sur les parcelles après le mois de mai pour réduire la dispersion associée avec le ruissellement printanier. Des bordures en plastique de six pouces de hauteur seront placées autour de chaque parcelle de 1 m² pour empêcher l'écoulement de surface. Ces bordures en plastique seront insérées de manière à ce que trois pouces de bordure dépassent la surface du sol. Ce type de bordure a été jugé efficace pour prévenir la dispersion de *P. putida* (Molina *et al.*, 1998). Dans une expérience précédente concernant la libération d'un microorganisme différent à ces trois sites d'essai, le déclarant n'a détecté aucune dispersion du microorganisme à l'extérieur des parcelles. Comme les trois sites expérimentaux sont plats ou presque plats, la possibilité de dispersion par ruissellement de la souche faisant l'objet de la déclaration dans la zone environnante est considérée comme faible. En cas de dispersion à l'extérieur du site expérimental, les déclarants prévoient excaver les sites en question jusqu'à une profondeur de 15 cm et transporter le sol au laboratoire pour l'autoclaver.

Les parcelles d'essai et les zones environnantes seront surveillées de près afin de détecter tout effet nuisible sur l'environnement. Tous les mois, la zone entourant les parcelles d'essai va être vérifiée pour voir s'il y a eu dispersion. La surveillance à cet effet portera sur les quatre points cardinaux situés à une distance de quatre mètres des parcelles. À l'Université Carleton, un cinquième point sera vérifié du côté le plus près de la rivière Rideau. Des plans d'urgence ont été élaborés en cas de déversement accidentel. Ainsi l'exposition de l'environnement à la

souche faisant l'objet de la déclaration à l'extérieur des trois sites d'essai sera probablement faible.

La capacité de déplacement latéral par percolation ou le transport bactérien actif se limitent à quelques centimètres selon le type de sol (OCDE, 1997; Smit *et al.*, 1992). Toutefois, dans la rhizosphère, la croissance des racines contribue à la distribution latérale des bactéries dans le sol. Des bactéries peuvent être dispersées du site d'application par le vent, par la faune de l'endroit ou par le ruissellement superficiel des eaux (Gillespie *et al.*, 1995). Dans cet essai, l'utilisation d'un arrosoir permet de limiter la production d'aérosol et la dispersion par le vent. Par conséquent, on ne s'attend à aucune dispersion importante de la souche faisant l'objet de la déclaration à l'extérieur des sites d'essai.

Transfert de Gènes

Chez *P. putida*, le transfert des gènes peut se faire par transformation, par transduction et par conjugaison. La conjugaison entre *Pseudomonas* a été détectée dans des milieux aquatiques et dans le sol (OCDE, 1997). On a remarqué que l'humidité du sol, la température et la présence de substrats physiques influencent la survie du microorganisme et/ou le transfert des gènes (OCDE, 1997).

On s'attend à ce que les bactéries indigènes du sol et de la rhizosphère capables d'accepter et d'exprimer le plasmide recombinant pADPTel acquièrent la tolérance au tellurite et la capacité de dégrader l'atrazine. En présence d'atrazine, on s'attend à ce qu'il y ait transfert de gènes aux trois sites d'essai, mais la fréquence du transfert devrait diminuer à mesure que l'atrazine sera dégradé ou lessivé du sol. La pression sélective exercée par l'addition de petites quantités d'atrazine risque cependant d'être transitoire et limitée aux parcelles d'essai. Le deuxième objectif de cette étude est justement d'évaluer la fréquence de transfert de ces gènes ainsi que leur persistance afin d'élaborer une méthode permettant de prévoir le potentiel et la fréquence de transfert génique entre d'autres microorganismes du sol dans les champs et dans des microcosmes.

Les gènes de résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol et à la tétracycline ont été transférés à la souche déclarée de la souche parentale isolée du milieu naturel. Ces gènes de résistance pourraient être codés par un plasmide; ils ne fournissent toutefois aucun avantage sélectif dans l'essai au champ tel qu'il a été conçu. On ne s'attend donc pas à ce qu'il y ait transfert de ces gènes aux sites d'essai. Étant donné que les gènes de résistance à l'acide nalidixique, à la streptomycine et à la rifampicine sont fort probablement des gènes chromosomiques, on ne s'attend pas à ce que le transfert horizontal de ces gènes de résistance soit important.

La probabilité de transfert horizontal du plasmide pADPTel aux végétaux et aux animaux est faible. Pour qu'un transfert de gène réussisse, plusieurs événements successifs doivent se produire, et la probabilité de ces événements varie selon la disponibilité du plasmide et la capacité de l'organisme hôte d'accepter et de transformer l'ADN procaryote étranger. La transformation au moyen d'*Agrobacterium* serait possible, mais il s'agirait d'un événement excessivement rare dans ce cas. Le matériel génétique inséré ne présenterait sans doute pas de risque pour les végétaux et les animaux aux sites d'essai et dans les zones avoisinantes.

Références

- Adesiyun, A. et Downes, M. 1999. Prevalence of antimicrobial resistance and enteropathogenic serogroups in *Escherichia coli* isolates from wildlife in Trinidad and Tobago. *Veterinarski Arhiv*. 69(6): 335-337.
- Anaissie, E., Fainstein, V., Miller, P., Kassamali, H., Pitlik, S., Bodey, G.P. et Rolston, K. 1987. *Pseudomonas putida*. Newly recognized pathogen in patients with cancer. *Am J Med*. 82(6): 1191-4.
- Barry, G.F. 1988. A broad-host-range shuttle system for gene insertion into the chromosomes of Gram-negative bacteria. *Gene* 71: 75-84.
- Bradbury, J.F. 1986. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Farnham Royal, UK. CAB International Mycological Institute. 149.
- Cheng, T.C. 1986. Biological control studies: Bacteria associated with moribund *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) in the Laboratory. *J Invert Pathol*. 47: 219-224.
- Compeau, G., Al-Achi, B. J., Platsouka, E. et Levy, S.B. 1988. Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl Environ Microbiol*. 54: 2432-2438.
- Costa, R.M., Camper, N.D. et Riley, M.B. 2000. Atrazine degradation in a containerized rhizosphere system. *J Environ Sci Health B*. 35(6): 677-87.
- De Souza, M.L., Wackett, L.P. et Sadowsky, M.J. 1998. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl Environ Microbiol*. 64(6): 2323-2326.
- Egusa, S. 1992. Chapitre 2.13: *Pseudomonas* Disease in *Seriola quinqueradiata*, Sea Breems and Other Fish. In *Infectious Diseases of Fish*. Brookfield, VT: Balkema Publishers. 242.
- Endtz, H.P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden, T. et Mouton, R.P. 1991. Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemoth*. 27(2): 199-208.
- Gagliardi, J.V., Angle, J.S., Germida, J.J., Wyndham, R.C., Chanway, C.P., Watson, R.J., Greer, C.W., McIntyre, T., Yu, H.H., Russek-Cohen, E., Rosolen, S., Nairn, J., Seib, A., Martin-Heller, T. et Wisse, G. 2001. Intact soil-core microcosms compared with multi-site field releases for pre-release testing of microbes in diverse soils and climates. *Revue canadienne de microbiologie* 47(3): 237-52.
- George, S.E., Nelson, G.M., Kohan, M.J., Brooks, L.R. et Boyd, C. 1999. Colonization and clearance of environmental microbial agents upon intranasal exposure of strain C3H/HeJ mice. *J Toxicol Environ Health*. 56(Part A): 419-431.
- Gillespie, K., Angle, J.S. et Hill, R.L. 1995. Runoff losses *Pseudomonas aureofaciens* (*lacZY*) from soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 17: 239-246.
- Glandorf, D.C.M., Verheggen, P., Jansen, T., ThomasHow, L.S., Smit, E., Wernars, K., Bakker, P.A.H.M. et Vanloon, L.C. 1998. Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* wcs358r on the indigenous soil microflora. In: de Vries, G. Ed. *Past, Present and Future Considerations in Risk Assessments when using GMO's. Proceedings Second International CCRO Workshop, the Netherlands, March 5-6, 1998*.
- Godbout, J.G., Y. Comeau et C.W. Greer. 1995. Soil characteristics effects on introduced bacterial survival and activity. Dans: *Bioaugmentation for Site Remediation*, Hinchee, R.E., Fredrickson, J. et Alleman, B.C. Eds. Ohio: Bartelle Press. pp 115-120.
- Hosoda, N., Ito, H., Sameshima, T., Hamaoka, T. et Terakado, N. 1990. Drug resistance and R plasmids of *Escherichia coli* isolated from diseased calves and pigs. *J Japan Vet Med Assoc*. 43(1): 25-28.
- Jones, T.W., Kemp, W.M., Stevenson, J.C., et Means, J.C. 1982. Degradation of atrazine in estuarine water/sediment systems and soils. *J Environ Qual*. 11:632-638.
- Kusuda, R. et Toyoshima, T. 1976. Characteristics of a pathogenic *Pseudomonas* isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathol*. 11(3): 133-139.
- Ladds, P.W., Thomas, A.D., Speare, R. et Brown, A.S. 1990. Melioidosis in a koala. *Aust Vet J*. 67(8): 304-305

- Lerch, R.N., Thurman, E.M., and Blanchard, P.E. 1999. Hydroxyatrazine in soils and sediments. *Environ Toxicol Chem.* 18: 2161-2168.
- Mandelbaum, R.T., Allan, D.L. et Wackett, L.P. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Env. Microbiol.* 61(4): 1451-1457.
- Masson, L., Y. Comeau, R. Brousseau, R. Samson, et C. Greer. (1993). Construction and application of chromosomally integrated *lac-lux* gene markers to monitor the fate of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacterium in contaminated soils. *Microb. Releases* 1(4): 209-216.
- Molina, L., Ramos, C., Ronchel, M.C., Molin, S. et Ramos, J.L. 1998. Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. *Appl Environ Microbiol.* 64(6): 2072-2078.
- Miyamoto, C.M., Graham, A.D., Boylan, M., Evans, J.F., Hasel, K.W., Meighan, E.A. et Graham, A.F. 1985. Polycistronic mRNAs code for polypeptides of the *Vibrio harveyi* luminescence system. *J. Bact.* 161(3): 995-1001.
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. et Wakabayashi, H. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp.nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50(1): 83-89.
- Organisation de coopération et de développment économiques (OCDE). 1997. Consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving *Pseudomonas*. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology.
- Park, W.M., Pyun, C.W. et Kim, J.H. 1997. Bacterial rot of soyabean sprouts caused by saprophytic *Pseudomonas putida* biovar. A and control by acidity of water. *Korean J Plant Pathol.* 13(5): 304-310.
- Prescott, J.F. 2000. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 3^{ème} Ed. Prescott, J.F., Baggot J.D., and Walker, R.D., Eds. Iowa: Iowa State University Press. 796 pp.
- Romney, M., Sherlock, C., Stephens, G. et Clarke, A. 2000. Pseudo-éclosion de *Pseudomonas putida* dans un service de consultation externes causée par un agent Anti-buée commercial contaminé – Vancouver (Colombie-Britannique).
Relevé des maladies transmissibles au Canada. 26(21): 183-184.
- Santé Canada. 1996. Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire. 2^{ième} éd. Kennedy, M.E. Ed. Ministre des Approvisionnements et Services Canada.
- Safronova, L.A. Kudryavtsev, V.A. et Osadchaya, A.I. 1991. Characteristics of microbial flora isolated from cases of endometritis in cows. *Mikrobiologicheskii-Zhurnal.* 53(6):71-77.
- Smit, E., van Elsas, J.D., et van Veen, J.A. 1992. Risks associated with the application of genetically modified microorganisms in terrestrial ecosystems. *FEMS Microbiol Lett.* 88: 263-278.
- Topp, E., Zhu, H., Nour, S.M., Houot, S., Lewis, M. et Cuppels, D. 2000. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl Environ Microbiol.* 66(7): 2773-82.
- van Veen, J.A., van Overbeek, L.S. et van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(2): 121-35.
- Wakabayashi, H., Sawada, K., Ninomiya, K. et Nishimori, E. 1996. Bacterial hemorrhagic ascites of ayu caused by *Pseudomonas* sp. *Fish Pathol.* 31(4): 239-240.
- Walker, R.D. (2000). Fluoroquinolones. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* 3rd Ed. J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker (Eds.) Iowa State University Press.
- Walter, E.G. et Taylor, D.E. 1989. Comparison of tellurite resistance determinants from the IncP alpha plasmid RT4Te' and the IncIII plasmid pHH1508a. *J. Bact.* 171:2160-2165.
- Walter, E.G. et Taylor, D.E. 1992. Plasmid-mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic. *Plasmid* 27:52-64.
- Winstanley, C., Carter, J.P., Seasman, M., Morgan, J.A.W., Pickup, R.W. et Saunders, J.R. 1993. A comparison of the survival of stable and unstable chromosomally located *xylE*

- marker cassettes as an indicator of cell division within populations of *Pseudomonas putida* released into lake water and soil. *Microbial Releases*. 2: 97-107.
- Yang, C.H., Young, T., Peng, M.Y. et Weng, M.C. 1996. Clinical spectrum of *Pseudomonas putida* infection. *J Formos Med Assoc*. 95(10): 754-61.
- Zolobowska, L. et Pospieszny, H. 1999. *Pseudomonas* species associated with soft rot of plants dans Poland. *Progress in Plant Protection*. 39(1): 148-153.