

## METHODOLOGIES A APPLIQUER POUR ETUDIER L'IMPACT DE PLANTES TRANSGENIQUES SUR LES INSECTES POLLINISATEURS

**M.H. Pham-Delègue<sup>1</sup>, J. Pierre<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés (LNCl)  
INRA, La Guyonnerie, BP23, 91440 Bures-sur Yvette, France.

<sup>2</sup> UMR INRA/ENSAR, Bio 3P, BP 35327, 35653 Le Rheu Cédex, France

### RESUME

Nous avons développé un ensemble de méthodologies, depuis le laboratoire jusqu'au plein champ, permettant d'évaluer les effets de plantes génétiquement modifiées, ou de produits de gènes, sur la survie, le comportement et la physiologie de l'abeille. Les études ont porté essentiellement sur des colzas exprimant une résistance à des insectes, à des maladies ou à des herbicides. D'une part les effets directs liés à une exposition aux produits de gènes par le biais du nectar ou du pollen prélevé par les abeilles, ont été pris en compte. La survie et le comportement des abeilles ne sont affectés que pour des concentrations de protéines 10 à 100 fois supérieures à celles exprimées dans des tissus végétaux. D'autre part, des effets indirects de la transformation génétique ont été étudiés, sur les sécrétions de nectar et les émissions volatiles qui déterminent l'attraction des abeilles vers la plante. Des différences sont notées dans la composition de ces sécrétions, mais le comportement des abeilles n'apparaît pas perturbé par ces modifications. Des méthodologies sont désormais disponibles dans le cas de plantes qui pourraient présenter un risque pour l'abeille.

### INTRODUCTION

Pour aborder l'étude de l'impact de plantes génétiquement modifiées sur l'entomofaune pollinisatrice et plus particulièrement sur l'abeille domestique, il faut tenir compte des facteurs suivants :

- La spécificité des relations abeilles-plantes. Le comportement de butinage repose sur l'association d'un processus individuel au cours duquel une butineuse mémorise les caractéristiques visuelles et olfactives de la plante, associées à la présence d'une nourriture favorable (nectar, pollen), et d'un processus collectif basé sur la communication par les danses dans la ruche et le recrutement de nouvelles butineuses sur la ressource florale. Il en résulte un bénéfice réciproque pour les deux partenaires, l'abeille trouvant une source de nourriture pour la colonie, et la plante étant fécondée grâce au pollen disséminé par les abeilles. Dans cette interaction, les capacités d'apprentissage des butineuses jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et la fidélité à une source florale, et divers auteurs ont montré que les odeurs florales étaient le signal le mieux appris (e.g. Menzel et al, 1993).
- Les différents types d'effets potentiels de plantes génétiquement modifiées sur les abeilles. Il existe d'une part, des effets directs liés à la présence de produits de gènes dans le nectar ou le pollen consommés par les abeilles, d'autre part, des effets indirects résultant de modifications des signaux de reconnaissance de la plante par l'abeille à la suite de l'introduction du gène d'intérêt (effets pléiotropiques).
- L'exposition aux produits de gènes. L'abeille étant un insecte social, les butineuses récoltent la nourriture pour l'ensemble de leurs congénères. Dès lors, non seulement les butineuses visitant la plante, mais également les jeunes ouvrières présentes dans la ruche ainsi que les larves, peuvent être exposées aux produits de gènes. De plus la durée de l'exposition peut être variable, les butineuses étant exposées brièvement lors du butinage tandis que les larves pourraient être nourries de façon chronique avec une nourriture contaminée.

Depuis plusieurs années, nous conduisons des études permettant de prendre en compte tout ou partie des paramètres mentionnés ci-dessous en associant des études de laboratoire et de terrain (pour une revue, voir Malone et Pham-Delègue, 2001). Notre objectif est

d'évaluer les effets de plantes transgéniques et/ou des produits de transgènes, sur la survie, le comportement et la physiologie des abeilles.

#### MATERIEL EVALUE

Plantes transgéniques :

- colzas exprimant des résistances à des insectes déprédateurs, à des maladies, à des herbicides
- maïs exprimant une endotoxine de *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Protéines :

Inhibiteurs de protéases à cystéine et à sérine, lectines, chitinases, protéines PAT, endotoxines de Bt. Ces différentes protéines ont été testés à des doses réalistes par rapport à celles potentiellement exprimées dans les tissus des plantes transformées.

*Remarque* : en préalable à la présentation des travaux, il faut rappeler que pour le matériel végétal évalué jusqu'ici, les produits de gènes n'ont jamais été détectés dans le nectar floral. Toutefois, même s'ils n'ont pas non plus été détectés dans le pollen de ces plantes, ce qui était attendu dans le cas des colzas utilisant le promoteur 35 S, l'absence d'expression dans le pollen avec ce promoteur n'est pas garantie, et d'autres événements de transformation peuvent amener une expression dans le pollen. De plus, quelque soit le type de transformation, des modifications secondaires d'autres signaux intervenants dans la relation abeille-plante peuvent se produire, et leurs effets doivent être examinés. Les travaux présentés ont donc valeur de schéma méthodologique pouvant être appliqué si le type de transformation présente un risque potentiel pour les abeilles.

#### ETUDES DES EFFETS DIRECTS

Au début de nos études, aucun protocole validé n'était disponible pour évaluer les effets de plantes transgéniques ou de produits de gènes sur les abeilles. Les seules méthodes d'évaluation en écotoxicologie de l'abeille concernaient des produits phytosanitaires conventionnels. Nous avons donc calqué notre approche globale sur celle utilisée dans le cadre de l'homologation de produits phytosanitaires pour l'obtention d'un label abeille (EPPO, 1993), à savoir l'établissement d'une toxicité au laboratoire, suivi d'études des effets en conditions plus réalistes. De plus, nous avons pris en compte le fait que les produits de gènes sont présents, le cas échéant, à très faible dose et pendant des périodes relativement longue au cours de la phénologie végétale.

##### 1. Etudes au laboratoire

En référence à l'évaluation de la toxicité aiguë de pesticides chimique, nous avons d'abord testé les effets de protéines sur la mortalité à court terme. Les expérimentations consistent à proposer à des lots d'abeilles de tous âges prélevées à l'intérieur d'une ruche, différentes doses de protéines dans un substrat alimentaire. La mortalité induite est relevée 24 ou 48 h plus tard. Pour les produits testés (inhibiteurs de protéases, chitinases, glucanase) aucune toxicité aiguë n'a été décelée (Picard-Nizou et al, 1997).

Pour tenir compte des effets d'expositions de plus longue durée, des études de mortalités chroniques ont été conduites : des abeilles naissantes sont mises en cagette et nourries de façon continue avec une solution alimentaire contaminée. La mortalité quotidienne est enregistrée. Les courbes de survies obtenues pour différents inhibiteurs de protéases, montrent qu'une mortalité accrue n'est observée que pour des doses 10 à 100 fois supérieures à celle potentiellement exprimée dans des tissus végétaux (Pham-Delègue et al, 2000).

Les effets attendus portant moins sur la mortalité que sur des perturbations du comportement, nous avons développé un essai biologique destiné à évaluer les effets de produits de gènes sur l'apprentissage des odeurs. Cet essai repose sur la reproduction au laboratoire d'une réponse naturellement produite par les butineuses. Lorsqu'elle atterrit sur

une fleur, l'abeille explore le substrat à la recherche de nourriture grâce à des récepteurs gustatifs placés sur les tarsi, les antennes ou les pièces buccales. Elle étend alors son proboscis (langue) de façon réflexe, et prélève ainsi de la nourriture. Ce faisant, elle associe cette prise alimentaire aux signaux odorants environnants. Il en résulte un apprentissage associatif de type Pavlovien. Cette réponse peut être obtenue sur des abeilles en contention individuelle. On soumet l'individu à plusieurs associations odeur-nourriture (phase de conditionnement ou d'acquisition) puis on lui propose l'odeur sans nourriture (phase de test ou d'extinction). Si l'abeille a correctement appris le signal odorant, elle étend le proboscis en présence de l'odeur seule (réponse conditionnée). Pour évaluer les effets possibles de produits de gènes sur cette réponse, ces produits sont additionnés soit à la nourriture lors du test, soit de façon plus prolongée dans la nourriture proposée lors de l'élevage qui précède l'expérimentation. On a ainsi pu montrer que les capacités d'apprentissage pouvaient être affectées, mais seulement après une exposition prolongée à certaines protéines (inhibiteurs de protéases), à des concentrations 100 fois supérieures à celles exprimées dans des plantes (Pham-Delègue et al, 2000).

Enfin, dans le cas d'inhibiteurs de protéases nous avons recherché leurs effets sur la physiologie digestive de l'abeille. une ingestion prolongée d'inhibiteurs de protéases à sérine induit l'apparition d'une nouvelle forme de protéases ce qui suggère l'existence de processus de régulation en présence d'inhibiteurs de protéases digestives de l'abeille (Girard et al, 1998).

## 2. Etudes en conditions semi-naturelles

Afin de nous placer dans des conditions plus réalistes et de tenir compte du caractère social des abeilles, nous avons développé des expérimentations à l'échelle de colonies placées dans des enceintes climatisées ou dans des cages de vol extérieures. Dans ces conditions, les butineuses en vol libre ont la possibilité de visiter des sources alimentaires artificielles ou des fleurs (transformées ou témoins).

Sur plantes entières, les paramètres enregistrés sont le nombre total de visites et les stratégies individuelles de butinage (temps passé sur la fleur, type d'aliment prélevé). Dans le cas de colzas exprimant une chitinase, aucune différence n'est apparue dans le comportement de butinage des abeilles sur plantes transformées et plantes témoins (Picard-Nizou et al, 1995).

Sur fleurs artificielles, une étude a été menée pour évaluer la quantité de protéines accumulée dans la colonie et potentiellement transférée aux abeilles de la ruche. Pour ce faire, des colonies ont été nourries avec une solution alimentaire additionnée d'un inhibiteur de protéase à sérine à des doses réalistes pendant une durée de 2 mois. Une fois par semaine, le développement des colonies est évalué par la mesure des surfaces de couvain et de nourriture stockée. La nourriture contaminée est colorée avec des colorants neutres de différentes couleurs afin de suivre la cinétique de son stockage dans la ruche. La concentration d'inhibiteurs de protéases dans la nourriture stockée et dans des abeilles adultes et des larves, est évaluée en fin d'expérimentation. La protéine a pu être dosée dans la nourriture stockée et une légère augmentation de l'activité protéasique a été décelée chez les larves nourries avec la protéine. Toutefois aucun effet n'a été observé sur le développement de la colonie (Pham-Delègue et al, en préparation).

Par ailleurs, des études à plus grande échelle ont été menées sous tunnels en plaçant des ruches en présence de parcelles de colza exprimant une résistance à un herbicide glufosinate sur une période d'un mois. Différents paramètres ont été enregistrés au niveau des abeilles (mortalité, activité de butinage, activité d'entrées et sorties de la ruche, développement de la colonie), ainsi qu'au niveau des plantes (quantité et composition des nectars, dosage des protéines ou de résidus d'herbicides dans le miel, le pollen ou les abeilles). Aucune différence notable entre plantes transformées et témoins n'a été rapportée (voir Pham-Delègue et al, même volume).

### 3. Etudes en conditions naturelles

Compte tenu des difficultés de mises en place d'expérimentations de terrain à grande échelle, peu d'expériences ont été conduites jusqu'ici en conditions naturelles. Nous avons pu mener sur deux sites (Bretagne, Sud-Ouest) et sur des parcelles de colza exprimant une résistance à un herbicide et de colza témoin, de différentes dimensions (voir Pierre J. et al, même volume) des relevés de l'entomofaune pollinisatrice et de son comportement. Aucune différence n'a été notée au niveau des populations d'insectes et de leur comportement, entre les différentes variétés de colzas.

### ETUDES DES EFFETS INDIRECTS

Les deux paramètres sur lesquels nous avons étudié l'apparition éventuelle de modifications secondaire liées à l'introduction d'un transgène sont d'une part le nectar, et d'autre part les arômes floraux (pour une revue, voir Pham-Delègue et al., 2002).

Pour les analyses de nectar, la procédure consiste à prélever du nectar sur des plantes transformées ou témoin, à un même stade de floraison, à l'aide de pipette de verre (5 µl), et d'estimer la quantité de nectar sécrétée par fleur. La composition en sucres de ces échantillons est ensuite analysée par HPLC après dérivation des sucres selon une méthode déjà utilisée sur le colza. Nos études, conduites sur différents types de colza transformés indiquent des différences dans les volumes de nectar sécrété, et corrélativement dans les concentrations en sucres totaux entre plantes transformées et témoins, et selon les types de colzas considérés. Ces différences dépendent de la date de récolte, des conditions environnementales et de la variété, comme nous l'avons déjà montré dans le cas de variétés de colzas conventionnels (Pierre et al., 1999). En ce qui concerne la composition en sucres, lors des comparaisons entre plantes transformées et témoins, nous avons autant que possible récolté les échantillons dans des conditions comparables, et les deux types de plantes étaient soit fortement reliées génétiquement, soit isogéniques. Donc les différences observées le cas échéant sont imputables à des effets pléiotropiques. Nous avons noté des différences de composition pour certaines paires de génotypes, avec une tendance pour un nectar plus concentré en sucres chez les plantes transgéniques, ce qui ne devrait pas affecter négativement le comportement des abeilles.

Concernant les arômes floraux, les études ont consisté en l'association d'analyses chimiques de la composition des émissions volatiles de colzas exprimant un Inhibiteur de protéases (et de son témoin), et d'enregistrement de réponses d'extension du proboscis. Il est apparu que des différences quantitatives et qualitatives pouvaient être mises en évidence dans les profils chromatographiques des émissions volatiles des deux types de plantes. Toutefois, les abeilles sont capables d'apprendre les deux types d'odeurs, et ne les distinguent pas l'une de l'autre. De plus, on a montré que la reconnaissance des deux types d'arômes se faisait sur la base des mêmes composés-clés, le linalool et le phényl acétaldéhyde, ce qui avait également été montré pour des colzas conventionnels (Blight et al., 1997).

### CONCLUSION

L'ensemble de ces travaux permet de proposer des méthodes d'évaluation des effets de la transformation génétique de plantes cultivées, sur différents paramètres de la biologie de l'abeille. L'originalité de ces approches et de prendre en compte des effets autres qu'une mortalité aiguë, peu probable dans le cas d'une exposition à des produits de gènes. De plus, les études de laboratoire permettent d'établir des seuils de toxicité comportementale pour une gamme de protéines potentiellement exprimées dans des plantes, et peuvent être utilisées pour évaluer en amont des protéines-candidates.

## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été financés en majeure partie dans le cadre d'un contrat européen (BIO CT 960365) du Programme Biotechnologie du 4<sup>ème</sup> PCRD.

## REFERENCES

- Blight M.M., Le Métayer M., Pham-Delègue M.H., Pickett J.A., Marion-Poll F., Wadhams L.J., 1997. Identification of floral volatiles involved in recognition of oilseed rape flowers *Brassica napus* by honeybees *Apis mellifera*. *J. Chem. Ecol.*, 23, 1715-1727.
- EPPO, 1993. Decision-making schemes for the environmental risk assesment of plant protection products-honeybees, OEPP/EPPO Bull.23, 151-165.
- Girard C., Picard-Nizou A.L., Grallien E., Zaccomer B., Jouanin L., Pham-Delègue M.H., 1998. Effects of protéinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybees. *Transg.Res.*, 4, 239-246.
- Malone L.A., Pham-Delègue M.H., 2001. Effects of transgenes products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, 32, 287-304.
- Menzel R., Greggers U., Hammer M., 1993. Functional organization of appetitive learning and memory in a generalist pollinator, the honey bee. In : *Insect learning*, Papaj D.R., Lewis A.C. (eds), Chapman and Hall, New York, pp.79-125.
- Pham-Delègue M.H., Girard C., Le Métayer M., Picard-Nizou A.L., Hennequet C., Pons O., Jouanin L., 2000. Long-term effects of soybean protéase inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. *Ent.Exp.Applic.*, 95, 21-29.
- Pham-Delègue M.H., Jouanin L., Sandoz J.C., 2002. Direct and indirect effects of genetically modified plants on the honey bee. In : *Honey bees – Estimating the environmental impact of chemicals*, Devillers J., Pham-Delègue M.H. (eds), Taylor and Francis (sous presse) .
- Picard-Nizou A.L., Pham-Delègue M.H., Kerguelen V., Douault P., Marilleau R., Olsen L., Grison R., Toppan A., Masson C., 1995. Foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) on transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera*.). *Transg.Rus.*, 4, 270-276.
- Picard-Nizou A.L., Grison R., Olsen L., Pioche C., Arnold G., Pham-Delègue M.H., 1997. Impact of protéines used in plant transgenic and engineering : toxicity and behavioral study in the honeybee. *J.Econ.Entomol.*, 90, 1710-1716.
- Pierre J., Mesquida J., Marilleau R., Pham-Delègue M.H., Renard M., 1999. Nectar secretion in oilseed rape *Brassica napus* – quantitative and qualitative variability among 71 genotypes. *Plant Breed.*, 118, 471-476.