

EVALUATION DE L'IMPACT ENVIRONNEMENTAL : Comment étudier l'impact de colzas transgéniques sur les abeilles ?

ENVIRONMENTAL IMPACT STUDIES: How to study the impact of genetically modified colza on bees?

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 7, Numéro 4, 341-4, Juillet - Août 2000, Dossier : "OGM: expertise et décision publique"

Auteur(s) : Jacqueline PIERRE, Minh-Ha PHAM-DELEGUE, INRA, UMR Biologie des organismes et des populations appliquée à la protection des plantes, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France.

Résumé : L'évaluation de l'impact environnemental de plantes génétiquement modifiées implique, lorsqu'il s'agit de plantes mellifères, la prise en compte de leurs interactions avec les abeilles. Les interactions à prendre en compte sont de deux types : - d'une part, il s'agit de vérifier l'innocuité de ces plantes sur l'abeille. En effet, l'abeille joue un rôle essentiel sur les plans économique et écologique, en tant que productrice de miel et pollinisatrice de nombreuses plantes sauvages ou cultivées. Ces différentes activités reposent sur l'aptitude de l'abeille à identifier et à visiter régulièrement des plantes susceptibles de lui procurer de la nourriture sous forme de nectar, qu'elle transforme en miel et qui lui sert d'alimentation glucidique, et de pollen, source de protéines. Toute modification survenant au niveau de ces plantes peut entraîner des perturbations du comportement ou de la physiologie des abeilles et se répercuter sur leur productivité en miel ou leur efficacité pollinisatrice. Les perturbations éventuelles peuvent découler soit d'effets directs liés à la présence du produit de transgène (protéine codée par le gène d'intérêt introduit dans la plante), soit d'effets indirects dus à des modifications secondaires de la physiologie de la plante associées à l'introduction du gène (effets pléiotropiques) ; - d'autre part, il faut prendre en compte le rôle potentiel de l'abeille comme facteur de dissémination du transgène. Ainsi, l'abeille, en se déplaçant de fleur en fleur, peut contribuer, en parallèle à une vexion pollinique par le vent, à transférer le transgène via le pollen et à assurer une fécondation intra, voire interspécifique. Or, notamment dans le cas de gènes de résistance à des herbicides, on souhaite circonscrire strictement aux plantes transgéniques le caractère d'intérêt, en évitant des croisements interspécifiques avec des plantes adventices de la même famille, auxquelles il serait fortement indésirable de conférer une telle résistance à un traitement herbicide. Pour prendre en compte ces deux aspects, des études ont été entreprises en adaptant pour partie des procédures d'écotoxicologie utilisées pour l'évaluation de produits phytosanitaires conventionnels et en adoptant une démarche allant du laboratoire au plein champ. Deux études faisant référence à des travaux récemment menés à l'INRA, en collaboration avec le Cetiom, et dans le cadre d'un projet européen du programme biotechnologie (4e programme cadre, BIO4-CT96-0375) sont présentées ici. Ces travaux ont porté sur deux types de colzas génétiquement modifiés : l'un exprimant une protéine insecticide conférant une résistance à des coléoptères ravageurs du colza, et de caractère expérimental, l'autre présentant une résistance à un herbicide et engagé dans le processus de commercialisation. Le modèle colza-abeille a été retenu car le colza est une plante largement cultivée, se prêtant bien à l'ingénierie génétique et très attractive pour les abeilles.

Summary: Different methods are used to study the incidence of genetically modified oilseed rape on honeybees, that depend on the type of transgene and on the transformation induced in the plant. Two examples are chosen to present risk assessment procedures. One deals with oilseed rape resistant to pest insects (by expressing protease inhibitors PI), the other concerns oilseed rape tolerant to an herbicide (glufosinate). In the first case, the aim is to ensure the safety of honeybees. First, the occurrence of the transgene product in nectar and pollen is checked and the foraging behaviour on the plants is observed. Second, the effects of various concentrations, equal or higher than those expressed in the plant, is evaluated under laboratory conditions. Thus, acute and chronic toxicity, individual learning behaviour and life span of workers exposed to the PI is investigated. Experiments are also carried out to examine the effects on the colony activity and development. In addition, indirect effect related to secondary changes in plant signals cueing bees visits are examined. In the second case, the aim is to assess the risk for transgene dispersal in the environment, mediated by honeybees. It is unlikely that tolerance to herbicide has toxic effects, but a pleiotropic effect of the transgene could affect the value and attractiveness of the plants. So, pollen and nectar production, flower size and density are evaluated and experiments are carried out in the field to study the foraging behaviour. In particular, the ability of honeybees to cross-visit transgenic and traditional oilseed rape or oilseed rape and weedy relatives is observed. Both types of studies show how complementary methods and collaborations between teams have been designed to study various aspects of the impact of genetic engineered oilseed rape on honeybees.

Keywords: oilseed rape, honeybee, genetically modified organism, transgene, toxicity, behaviour, pollination.

ARTICLE

Méthodologie appliquée à l'étude de l'impact de lignées de colza génétiquement modifiées pour la résistance aux insectes ravageurs

La plupart des insectes ravageurs du colza sont des coléoptères. Ces derniers ne sont pas sensibles à la toxine de *Bacillus thuringiensis* dont le gène a été introduit par transgénèse pour lutter avec succès contre d'autres insectes ravageurs (lépidoptères). Un autre moyen de lutte consistant à introduire dans la plante des gènes codant pour des inhibiteurs de protéases (IP) a été envisagé. Les protéases sont des enzymes permettant la digestion chez les insectes. On en connaît différentes catégories, les protéases à sérine et les protéases à cystéine étant celles rencontrées chez les coléoptères. Leur inhibition doit avoir pour effet direct de perturber la digestion des aliments par l'insecte mais aussi, secondairement, d'augmenter sa mortalité au stade larvaire ou de retarder son développement. Ainsi, chaque gène codant pour un des IP a été introduit dans une variété de colza pour créer deux groupes de lignées transgéniques (matériel végétal mis à disposition par le laboratoire de Biologie cellulaire de l'Inra de Versailles). Or, les abeilles ont également dans leur tube digestif des protéases, de type protéases à sérine, potentiellement inhibées par des IP spécifiques. Il est donc important d'évaluer les effets de telles plantes sur les abeilles qui les visitent. Parallèlement aux plantes transgéniques et aux plantes témoins non transformées, les protéines recombinantes ou des protéines de synthèse analogues à celles exprimées dans les plantes ont également été utilisées.

L'essentiel des travaux a porté sur l'étude des effets directs des plantes transformées ou des produits de gène sur l'abeille. Afin d'évaluer les risques d'exposition des abeilles aux IP, la première étude a consisté à vérifier les degrés d'expression des protéases dans le nectar et le pollen, éléments de la plante consommés par l'abeille. Dans le cas des variétés de colzas étudiées, où le gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur constitutif CaMV 35S, aucune trace d'IP n'a été détectée dans le nectar et dans le pollen, ce qui exclut les risques d'exposition des abeilles au produit de gène dans le cas de ces plantes. On constate d'ailleurs que, lorsqu'on propose un choix entre plantes transformées et témoins à une colonie d'abeilles en cage de vol, les butineuses ne montrent aucune préférence entre les variétés. Toutefois, avec ce même promoteur, les protéines peuvent s'exprimer dans le pollen de certaines espèces, comme le tabac et d'autres promoteurs peuvent être utilisés pour favoriser l'expression dans le pollen, lorsque les insectes ravageurs visés le consomment. Il est donc important de mettre en œuvre une méthodologie permettant d'analyser la toxicité des IP que pourraient rencontrer les abeilles. Au laboratoire, on a d'abord examiné la toxicité à court terme d'IP, selon une procédure adaptée de la méthode utilisée pour attribuer le label « abeille » à des produits phytosanitaires conventionnels. Le test consiste à administrer par voie orale le produit toxique à différentes concentrations à des petits groupes d'abeilles maintenues en cagettes, et à relever la mortalité 24 ou 48 heures après. Les concentrations utilisées s'étendent sur une gamme allant des concentrations de protéines potentiellement exprimées dans les plantes à des concentrations 10 à 100 fois supérieures. Aucune mortalité aiguë n'a été constatée, ce qui suggère que des butineuses brièvement exposées à des protéines ne seraient pas affectées. La toxicité à plus long terme a également été évaluée en mesurant la longévité de groupes d'individus constamment alimentés en eau sucrée contenant les différentes concentrations de protéines. Seule la concentration la plus élevée, très supérieure aux valeurs de protéines exprimées dans les plantes, entraîne une réduction significative de la durée de vie des abeilles. Ainsi, on peut supposer que des jeunes abeilles exposées pendant des durées longues aux IP, par exemple *via* les réserves de la colonie, ne seraient affectées significativement que si les concentrations de protéines atteignent des niveaux très élevés. Ceci n'est pas exclu, si on suppose que les protéines ne se dégradent pas dans les conditions de la ruche, qu'elles sont présentes dans le nectar et qu'elles peuvent se concentrer à la suite de phénomènes d'évaporation qui conduisent à la transformation du nectar en miel. Pour vérifier ces hypothèses, une autre série d'études a été effectuée sur des colonies entières. On a proposé aux butineuses une source alimentaire contenant une concentration d'un IP réaliste, et on a dosé la quantité de cet IP au cours du temps, dans différents éléments de la ruche (abeilles, larves, miel, pollen). On n'a observé aucun phénomène de concentration d'IP dans la ruche et aucune incidence du produit sur le développement de la ruche. De plus, les effets toxiques ont été testés sur les capacités d'apprentissage des odeurs florales, c'est-à-dire sur une phase du comportement qui permet la reconnaissance de la plante par l'insecte. La méthode employée procède d'un conditionnement individuel fondé sur un mécanisme réflexe d'extension de la langue (ou réflexe d'extension conditionnée du proboscis). Normalement, l'abeille au contact du nectar tire la langue pour le prélever et mémorise l'odeur émise par la fleur. On peut reproduire cette situation avec des abeilles mises, en contention individuelle. Une association est alors créée entre une odeur et une solution sucrée, ce qui aboutit à une réponse dite conditionnée à la seule présentation de l'odeur. On peut établir ainsi une courbe d'apprentissage et comparer les performances d'individus ayant ingéré ou non le produit à tester. On peut considérer qu'une altération des capacités de mémorisation olfactives se traduira par une perturbation du comportement de butinage des abeilles. C'est uniquement dans le cas d'une ingestion prolongée d'IP à sérine, à concentration supérieure à

celle exprimée dans les plantes, qu'on observe une réduction du niveau de réponses conditionnées. Enfin, le métabolisme digestif d'abeilles soumises ou non à des régimes alimentaires additionnés de différentes concentrations d'IP a été étudié : il montre aux fortes concentrations une surproduction de protéases à sérine, en compensation de l'ingestion des IP. Ce mécanisme permettrait à l'abeille de survivre à l'ingestion d'IP, mais la mobilisation des acides aminés nécessaires à cette synthèse de protéases pourrait se faire au détriment d'autres fonctions, impliquées par exemple dans les processus de mémorisation.

Parallèlement aux effets directs des plantes transformées ou des produits de transgène, les éventuels effets indirects associés à la transformation génétique ont été envisagés. On a ainsi procédé à des analyses des nectars et émissions volatiles florales de colzas transformés ou témoins. Des différences apparaissent dans la composition chimique des odeurs florales et des nectars, mais ces modifications ne semblent pas perturber la reconnaissance des plantes par les abeilles.

Au bilan, ces expérimentations menées en conditions contrôlées ou semi-naturelles indiquent une innocuité des plantes exprimant des IP et permettent d'établir des seuils de concentrations induisant des effets sublétaux comportementaux et physiologiques. Cet ensemble d'essais biologiques pourrait constituer la base d'une méthodologie d'évaluation de l'impact de plantes transgéniques sur les abeilles. Celle-ci pourrait être appliquée au cas par cas pour les plantes génétiquement modifiées en cours de commercialisation et susceptibles d'être visitées par les abeilles. Pour plus de détails on pourra se reporter aux publications scientifiques correspondantes [1-3].

Méthodologie appliquée à l'étude de l'impact de colzas génétiquement modifiés pour la résistance à un herbicide (glufosinate) sur les abeilles

La résistance du colza à l'herbicide total, le glufosinate (synonyme de phosphinothricine), est conférée par l'introduction du gène *pat*. Ce gène vient du nom de l'enzyme phosphinothricine-acétyl-transférase et a été isolé chez une bactérie. Cet enzyme a pour effet d'inactiver le glufosinate en présence d'acétyl-co-enzyme A et de le rendre non toxique. Ce transgène concerne donc le métabolisme de la plante dans un processus de détoxification très spécifique. En conséquence, aucune incidence sur les insectes se nourrissant sur la plante ne doit logiquement en découler. Cependant, le colza génétiquement modifié ne peut être considéré comme totalement identique à son homologue traditionnel. On ne peut exclure l'hypothèse d'un effet pléiotropique de l'introduction d'un transgène sur des facteurs d'attractivité de la plante pour les abeilles. Par ailleurs, les risques d'une telle transgenèse concernent l'environnement et la gestion agronomique. On sait en effet que le colza est susceptible de se croiser avec des adventices très répandues comme la ravenelle qui pourrait devenir ainsi résistante aux herbicides [4].

Il apparaît donc nécessaire dans un tel cas d'étudier l'attractivité du colza classique, du colza modifié et de la ravenelle, ainsi que le comportement des abeilles en conditions de plein champ afin de déterminer quelles sont les probabilités de transfert de pollen entre les deux espèces végétales *via* ces insectes.

La valeur attractive de la plante a été mesurée par sa production de nectar en quantité (volume) et en qualité (teneur et composition en sucre) et par sa production en pollen. La taille et la forme de la fleur ont été notées car elles peuvent également jouer un rôle sur les visites des abeilles (accessibilité au pollen et surtout au nectar). La densité de fleurs a été également évaluée car elle

influe sur le nombre de visites et la densité de butineuses (les données sont exprimées en nombre d'abeilles/1 000 fleurs). De plus, la précocité respective des génotypes a été prise en compte (synchronisation ou non des floraisons). L'ensemble de ces données a permis de comparer voire d'expliquer des différences de fréquentation entre les types. Les protocoles comprennent de nombreuses répétitions, les notations sur les génotypes à comparer devant être effectuées de manière quasi synchrone. La fiabilité des résultats dépend en effet du respect de ces contraintes car la population de butineuses est instantanément sensible aux variations des conditions climatiques (passage nuageux, vent). Les vitesses de butinage et les postures sur la fleur ont également été notées. La mesure de la fréquentation respective des génotypes permet d'apprécier si l'abeille perçoit une différence entre les types mais elle ne permet pas, à elle seule, d'évaluer les probabilités d'échanges de pollen : deux types peuvent être de même valeur attractive sans qu'il y ait pour autant passage des abeilles entre eux (cas des colzas avec et sans pétales) [5].

Pour répondre à la question des risques de transfert de pollen, des mesures de passages d'abeilles ont été réalisées. Il s'agit soit de suivre des individus et de noter leur déplacement de fleur en fleur (fleurs des deux types en mélange ou sur deux zones contiguës), soit d'observer une fraction de la population d'abeilles. Dans ce cas, le nombre de passages entre les deux zones contiguës a été ramené au nombre total d'individus butinant sur les deux zones durant un laps de temps donné. Des mesures de référence ont été réalisées au même moment entre deux zones comportant des génotypes identiques car les taux de passages ainsi définis (nombre de passages/nombre total de butineuses) dépendent de l'activité instantanée des abeilles. La difficulté majeure de ces observations a résidé dans le caractère très fluctuant des conditions climatiques propres aux études pratiquées à l'extérieur.

Compte tenu de ces difficultés mais aussi des limites imposées par la réglementation relative aux expérimentations en plein champ, des mesures d'attractivité du colza ont été conduites sous tunnel ou en cage de vol sur une autre variété de colza résistant au glufosinate. La confrontation des résultats a constitué un gain d'information qui a permis de conforter et limiter des expérimentations plus proches des conditions agronomiques, certes indispensables mais plus lourdes à gérer.

Enfin, bien que le produit du transgène ne présente pas *a priori* de risque de toxicité pour l'insecte, des expérimentations très proches de celles citées dans l'exemple précédent ont été effectuées à la fois par mesure de précaution et pour affiner la méthodologie (mesure de l'activité des abeilles par le nombre d'entrées et de sorties de la ruche, recherche de produit dans le miel).

De l'ensemble de ces données, il ressort que les deux variétés transformées pour la résistance au glufosinate ne présentent aucun effet pléiotropique sur les caractéristiques de la fleur. Les abeilles ne font aucune différence entre colza transgénique ou classique. De plus, la totale innocuité des colzas modifiés semble se confirmer. Enfin, il apparaît que les abeilles préfèrent le colza à la ravenelle et que, du fait de la fidélité individuelle des abeilles à un type floral, ce ne sont pas les mêmes individus qui butinent les deux espèces végétales. En conséquence, les transferts de pollen entre colza et ravenelle par le butinage des abeilles est très peu probable. Ces derniers résultats, très récemment acquis, doivent faire l'objet de prochaines publications [6, 7].



CONCLUSION

Ces deux illustrations nous ont montré l'étendue des études qui peuvent être menées pour répondre aux questions posées sur les conséquences de la transgénèse végétale pour les abeilles. Au cours de ces dernières années, les outils méthodologiques se sont peu à peu mis en place. La détection du produit du transgène, son niveau d'expression ou encore l'éventualité de modifications secondaires des caractéristiques de la plante liées à la transgénèse ont été pris en compte. Les protocoles d'étude de la toxicité, en particulier sur la survie et le développement de la colonie, ont été réfléchis. Divers essais biologiques permettant d'évaluer l'attractivité de la plante, son caractère appétent et les effets sur le comportement au laboratoire et au champ ont été mis en œuvre de manière complémentaire grâce à des collaborations. Il est difficile à l'heure actuelle de prédire quel sera le devenir commercial des colzas OGM. Quoi qu'il en soit, on peut d'ores et déjà affirmer que la méthodologie définie au cours de ces recherches sera applicable à d'autres travaux dans le domaine plus large de l'écotoxicologie.

REFERENCES

1. GIRARD C, PICARD-NIZOU AL, GRALLIEN E, ZACCOMER B, JOUANIN L, PHAM-DELEGUE MH (1998). Effect of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybees. *Transgen Res* : 1-8.
2. JOUANIN L, PHAM-DELEGUE MH (1999). Colzas transgéniques résistants aux insectes : un danger pour l'abeille ? In : *Organismes génétiquement modifiés à l'Inra, environnement, agriculture et alimentation*. Paris : INRA : 68-70.
3. PHAM-DELÈGUE MH, GIRARD C, LE METAYET M, PICARD-NIZOU AL, HENNEQUET C, PONS O, JOUANIN L. (2000). Long-term effects of soybean proteinase inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. *Entomol Exp Applic*, 95 : 21-9.
4. CHEVRE AM, EBER F, BARANGER A, VALLÉE P, PIERRE J, RENARD M (1998). Impact de la transformation génétique du colza. *Cahiers Agricultures*, 7 : 525-30.

5. PIERRE J, PIERRE JS, MARILLEAU R, PHAM-DELEGUE MH, TANGUY X, RENARD M (1996). Influence of the apetalous character in rape (*Brassica napus*) on the foraging behaviour of honeybees (*Apis mellifera*). *Plant Breeding*, 115 : 484-7.
6. PIERRE J, RENARD M, PICAULT H, MARILLEAU R, GENECQUE E, PHAM-DELEGUE MH (2000). May an herbicide tolerant transgenic oilseed rape affect the behaviour of honeybees and other pollinating insects under field conditions ? (Soumis.)
7. PIERRE J (2000). The role of honeybees (*Apis mellifera*) and other insect pollinators in gene flow between oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*). Proc. of the 8th International Pollination Symposium, 4-7 July 2000, Mosonmagyaróvár, Hungary. *Acta Hort* (à paraître).