

4.1. Effets des plantes transgéniques résistantes aux insectes sur les abeilles solitaires

Résumé préliminaire des résultats principaux

Roger Konrad and Dirk Babendreier^{1*}

Station de Recherche Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Reckenholzstrasse 191, CH-8046 Zurich, www.art.admin.ch

¹ adresse actuelle: CABI Europe – Suisse, Rue des Grillons 1, CH-2800 Delémont

* **Contact:** d.babendreier@cabi.org

1. Effets des plantes transgéniques sur les larves des abeilles solitaires:

Historique et méthodes: Les larves de nombreuses abeilles solitaires se nourrissent quasi-exclusivement de pollen et ainsi ont de fortes probabilités d'être en contact avec les produits transgéniques exprimés dans le pollen. Les conséquences possibles du pollen de colza exprimant l'inhibiteur de la cystéine protéase, oryzacystatin-1 (OC-1) ont été étudiés sur les larves de l'abeille solitaire *Osmia bicornis* (= *O. rufa*). D'autre part, l'effet de l'OC1 recombinant, la toxine Bt (Cry1Ab) and l'agglutinine (GNA) de *Galanthus nivalis* sur les paramètres de vie de cet important pollinisateur a été mesuré.

Résultats: Le développement larvaire a été significativement prolongé et la conversion de nourriture a été significativement réduite dans le cas de larves nourries avec le pollen contenant le plus important taux de GNA (0.1%) comparé au contrôle. La longévité post-émergence des abeilles ayant traversé l'hiver n'a pas significativement varié selon les traitements et aussi les analyses de perte de poids relatif durant l'hiver ont montré aucune différence significative comparé au contrôle. Parmi les 174 larves testées, 5 (2.9%) sont mortes durant le développement larvaire avec un maximum de 2 dans le cadre d'un ou de l'autre traitement. Sur les 169 individus qui ont accompli leur développement larvaire, 17 (10.1%) sont mortes durant l'hivernage, avec un maximum de 4 pour n'importe quel traitement. Ni le pollen exprimant la protéine transgénique ni aucun autre traitement avec une protéine insecticide ajoutée n'ont montré de différences significatives comparés au control en terme de mortalité.

Résumé et signification: Les apports de pollen de colza transgénique OC-1 n'a pas affecté le développement des larves. De même que de fortes doses de OC-1 et Cry1Ab aussi bien qu'une faible dose de GNA n'a eu aucun effet significatif. Cependant, une forte quantité de GNA (0.1%) dans le régime de la larve a causé une augmentation du temps de développement et a réduit l'efficacité de conversion du pollen en masse corporelle de la larve.

Les méthodes expérimentales mises au point et décrites dans la présente étude ne sont pas seulement appropriées pour des tests en première phase sur des organismes non-ciblés, mais ils peuvent être adoptées pour des tests en laboratoires avant la mise en champs de produits phytosanitaires incluant les pesticides qui peuvent être trouvés dans le pollen. Dans des tests de toxicité in vitro sur des larves d'abeilles mellifères, des taux de mortalité élevé des contrôles peuvent poser un problème. Dans cette étude, en revanche, un taux de mortalité des contrôles faible a été observé, ce qui serait dû à une manipulation minimale des œufs et des larves quand les abeilles sont élevées sur leurs

provisions. Un autre avantage des méthodes expérimentales de cette étude n'est pas seulement dans la ponte mais aussi dans la récolte et la préparation du pollen qui ont été faites selon des procédures standardisées ce qui représente une amélioration par rapport aux études antérieures dont l'objet était les effets potentiels des pesticides sur les larves d'abeilles solitaires.

Les résultats de cette étude indiquent qu'il est peu probable que le gène OC-1 ou le gène Cry1Ab pose un problème aux larves d'*O. bicornis*. GNA, à fortes doses, plus dangereux pour les abeilles n'a pas montré d'effet négatif aux niveaux d'expression attendus. L'on peut s'attendre à ce que ces résultats obtenus à partir du modèle d'une seule espèce soient valables pour une large part des 700 espèces d'abeilles solitaires environ rencontrées en Europe centrale étant donné que beaucoup sont aussi polylectiques, et font leur récolte sur des céréales cultivées et se reproduisent durant la floraison de ces cultures.

2. Effet des plantes transgéniques sur les adultes des abeilles solitaires:

Historique et méthodes: L'objectif de cette étude était double: il s'agissait d'évaluer l'impact des plantes transgéniques exprimant un inhibiteur de protéase (IP) et celui de protéines insecticides purifiées sur la longévité des abeilles solitaires ainsi que de caractériser le profil des protéases digestives natives de cette abeille solitaire et de déterminer les altérations possibles dans les activités de la protéase en réponse à l'ingestion de IP.

Les gènes codant pour IP sont connus pour une grande variété d'animaux, de plantes et de micro-organismes. Dans les plantes, les IP peuvent avoir un rôle dans la défense contre les insectes herbivores en se fixant spécifiquement aux enzymes protéolytiques dans l'intestin de l'insecte et en les désactivant. Cette inhibition directe de l'hydrolyse protéique induit souvent l'hyperproduction de protéases dans l'intestin de l'insecte ceci afin de contrer cette inhibition. La diminution en acides aminés qui en résulte peut entraîner un effet répressif des IPs sur la croissance, la fécondité ou même sur la survie des insectes herbivores observées dans le cas des plantes transgéniques exprimant IP ou des IPs purifiés administrés dans le régime de l'insecte. Les IPs varient dans leur pouvoir à inhiber des protéases spécifiques et la sensibilité d'un insecte à un certain type d'IP dépend du profil des protéases natives de l'insecte ainsi que de sa capacité de passer à des enzymes insensibles à la présence d'IP.

Résultats de longévité: La longévité des abeilles solitaires sur les colzas transgéniques exprimant OC-1 n'est pas significativement différente de celle des abeilles sur les plantes contrôles. La longévité moyenne des abeilles était de 45.9 jours (+/-5.01) sur la lignée OC-1 et de 52.1 jours (+/- 7.10) sur la lignée correspondante mais non-transgénique avec les deux valeurs considérablement plus hautes que ce qui est connu pour *Osmia* en plein champ.

La longévité des groupes expérimentaux soumis à des protéines insecticides dissoutes dans une solution sucrée a été significativement différente. Les abeilles qui ont reçu GNA ou une forte dose de SBTI dans leur régime ont souffert d'une longévité très sévèrement réduite, mais aussi les abeilles qui ont reçu une faible dose de SBTI ou une forte dose d'OC-1 ont vécu significativement moins longtemps que les abeilles contrôles. Seule la

longévité des abeilles nourries avec Cry1 Ab ou avec une faible dose d'OC-1 n'était pas différente des contrôles.

Résultats des enzymes digestives: La sensibilité d'une espèce d'insecte à certains inhibiteurs de protéases dépend de la gamme des protéases natives présentes dans le système digestif de l'insecte et de sa capacité à s'adapter aux inhibiteurs ingérés en surproduisant les protéases natives sensibles ou en passant à l'expression de protéases insensibles. Les enzymes digestives sont généralement classées comme étant sérine, cystéine, aspartique et des métallo-protéinases, ceci étant dépendant de l'acide aminé présent sur le site actif de l'enzyme.

Dans les essais enzymes sur microplaques avec des substrats synthétiques spécifiques de la classe enzymatique et des diagnostics d'inhibiteurs de protéases, le profil des protéases des extraits de l'intestin grêle d'adultes d'*O. bicornis* a été étudié. Nous avons trouvé de fortes preuves de la présence de protéases de sérine comme la chymotrypsine et la trypsine (environ 60% de l'activité protéolytique digestive totale) dans l'extrait de l'intestin grêle. La cystéine protéase et les métalloprotéases ont été décelés comme jouant un rôle moins important dans la digestion de protéines d'*O. bicornis* (chacune environ 20% de l'activité totale), tandis qu'aucune activité des protéases de l'aspartique n'a été détectée.

Afin de caractériser la réponse compensatoire d'*O. bicornis* à l'ingestion de deux IPs qui visent deux classes différentes de protéases et pour relater les effets contraires de ce stress métabolique sur la longévité de l'abeille, nous avons analysé l'activité protéolytique dans le système digestif des abeilles qui ont reçu soit SBTI ou OC-. La consommation d'OC-1 a amené une augmentation de 30% de l'hydrolyse générale comparée au niveau d'activité dans l'extrait des abeilles contrôles. La caractérisation de cette augmentation d'activité a révélé une augmentation modérée de la production d'aspartique et aussi probablement de sérine et de cystéine protéase indiquant une compensation relativement complexe qui inclut à la fois la surproduction des protéases natives et l'induction d'une nouvelle protéase insensible. La consommation de SBTI a amené une augmentation de l'hydrolyse générale d'au moins 60% ce qui suggère une compensation forte et efficace de la trypsine inhibée par SBTI alors qu'apparemment des taux élevés ont été atteints. La caractérisation de cette réponse compensatoire à SBTI a révélé des changements dans le profil des protéases qui sont similaires mais plus prononcées que chez les abeilles nourries avec l'OC-1, ce qui est probablement dû au rôle plus dominant des sérines protéases par rapport aux cystéines protéases du profil natif d'*O. bicornis*.

Résumé et signification: Les résultats de la présente étude indique qu'il est très peu probable que, soit la toxine Bt Cry1Ab ou l'inhibiteur de cystéine protéase OC-1 à un niveau d'expression attendu, comporte un risque sur les abeilles adultes d'*O. bicornis*. La lectine GNA, l'inhibiteur de protéinase pour la sérine SBTI aussi bien que des fortes concentrations irréalistes d'OC-1 réduisent de façon significative la longévité des abeilles. Les résultats de GNA sont en accord avec l'activité bien documentée de l'activité insecticide de cette protéine sur une large gamme d'espèces d'insectes. Les effets des deux IPs sur la longévité des abeilles sont mieux interprétés à la lumière des études enzymatiques in vitro, ce qui suggère un système digestif assez complexe de la sérine et les cystéines protéases et peut-être aussi les métallo-protéases dans le système digestif d'*O. bicornis*. Tandis que le rôle dominant des protéases de sérine dans la digestion des protéines est en accord avec ce qui est connu de l'abeille mellifère (*Apis*

mellifera), nos résultats sur la présence de l'activité cystéique dans le système intestinal d'*O. bicornis* contrastent avec la plupart des autres études sur l'activité protéases des abeilles qui n'avait pas fait de rapport sur l'activité cystéine protéase dans le système digestif des abeilles. Cependant, l'activité sérine est très probablement essentielle pour une digestion efficace chez *O. bicornis*, comme observé dans la réponse physiologique à l'ingestion de SBTI qui est plus forte que celle d'OC-1 et l'impact plus important de SBTI sur la longévité de l'abeille. Ces résultats mettent en lumière l'importance de prendre en compte le profil de la protéase native ainsi que l'enzyme complément d'organismes clés non-ciblés dans une évaluation de risques pour l'environnement de plantes transgéniques exprimant l'inhibiteur de protéases.

3. Le miellat, une possibilité d'exposition à des produits transgéniques

Historique et méthodes: Dans les zones où l'agriculture est intensive, les sources de pollen et de nectar peuvent être rares et le miellat est probablement la première source exogène d'hydrates de carbone disponible. Tandis que la récolte de miellat est bien connue pour les abeilles à miel, il y a seulement des rapports anecdotiques concernant les bourdons et pratiquement aucune information quantitative n'est disponible à propos de l'utilisation du miellat par les abeilles solitaires. Une compréhension de la contribution du miellat dans le régime des abeilles solitaires est importante dans l'analyse du risque posé par les plantes modifiées, étant donné que le miellat est une voie potentielle d'exposition à des produits insecticides transgéniques.

Afin de tester si *O. bicornis* se nourrit du miellat, de jeunes femelles ont été placées dans des cages en champs contenant des (A) plants de colza infectés avec des aphides (sans nectar, que du miellat), ou (B) des plants de colza en fleur non-infectés et donnant du nectar (que du nectar, sans miellat), ou (C) des plants de colza à la fois en fleurs ET infectés (avec nectar et miellat). Deux espèces de pucerons (le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* et le puceron du chou *Brevicoryne brassicae*) ont été testées et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) a été utilisée pour analyser le profil des hydrates de carbone contenu dans l'appareil digestif. Le miellat en tant que nourriture a été évalué par observation directe du comportement et par la présence de „sucres signatures“ (en général erlose et melezitose), des oligosaccharides spécifiques au miellat, qui sont typiquement synthétisés par des insectes se nourrissant du phloème et sont sécrétées dans le miellat.

Résultats: Aucun des „sucres signatures“ n'a été détecté dans l'appareil digestif d'abeilles nouvelles-nées non nourries ni aucune indication n'a été trouvée sur la capacité d'*O. bicornis* à synthétiser les sucres spécifiques au miellat. L'oligosaccharide erlose n'a pas été seulement détecté dans le miellat de *M. persicae* et de *B. brassicae* bien qu'en plus grande quantité dans le premier cas (6.4 - 14.5% vs. 0.5 - 3.5% des sucres totaux) mais a été aussi détecté dans l'appareil digestif des abeilles qui ont été nourries avec du miellat récolté à la main. Ainsi, l'erlose a été identifié comme un sucre signature approprié pour la détection de la nourriture en miellat dans *O. bicornis*, bien que, seulement pour un repas relativement récent étant donné que le niveau de sucres était significativement réduit 24h après le nourrissage, atteignant le niveau des abeilles non-nourries, 96h après le nourrissage.

Les abeilles provenant des cages avec les plants de colza en fleurs (les situations B et C) ont montré de très hauts niveaux de sucres et un profil de sucres très similaire à celui du nectar (dominé par le glucose et fructose). Les abeilles qui ont eu seulement du miellat de *Brevicoryne* à leur disposition ont montré des niveaux de sucres totaux extrêmement bas. 29 des 33 abeilles avaient moins d'1 µg de sucres totaux et le sucre indicateur erlose n'a été trouvé dans aucune de ces abeilles. Celles qui ont eu seulement du miellat de *Myzus* avaient aussi un taux de sucres totaux relativement bas même si la consommation de miellat a été clairement observée parmi ces abeilles et que l'erlose a été détecté chez 50% d'entre elles. Le nourrissage sur le miellat de *Brevicoryne* n'a jamais été observé. Ces observations directes du comportement sont en accord avec les résultats de CLHP.

Résumé et signification: Les résultats de nos expériences en semi-champ ont montré qu'*O. bicornis* préfère clairement le nectar floral au miellat et butine sur le nectar comme source d'hydrates de carbone quand des fleurs sont disponibles. Si ces résultats peuvent être appliqués à la situation en plein champ, ils pourraient indiquer qu'en période et aux endroits de floraison abondante, il est très peu probable que le miellat soit exploité comme source de nourriture et jouerait un rôle mineur dans une voie d'exposition potentielle à des produits transgéniques. Cependant dans certaines conditions, par ex. si d'autres sources d'hydrates de carbone sont limitées, le miellat ne peut pas être exclu complètement. Nous avons clairement démontré qu'*O. bicornis* était capable de détecter le miellat des pucerons et exploité cette source d'hydrates de carbone selon l'espèce de pucerons et les conditions environnementales. Ainsi, nous pouvons conclure que l'exposition des abeilles à un produit transgénique via le miellat doit être considéré dans une évaluation du risque environnemental posé par une plante transgénique résistante aux insectes, spécialement quand le trait est présent dans la sève du phloème.