

# Nouvelles connaissances au sujet des effets du maïs Bt transgénique sur les abeilles

<sup>1</sup>Dirk Babendreier, <sup>1</sup>Jörg Romeis, <sup>1</sup>Franz Bigler et <sup>2</sup>Peter Fluri

<sup>1</sup>Agroscope FAL Reckenholz, Reckenholzstrasse 191, CH-8046 Zurich

<sup>2</sup>Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), Centre de recherches apicoles, CH-3003 Berne

*Les plantes utiles transgéniques, résistantes aux insectes, sont des plantes que „l'on a équipées“ de propriétés qui sont toxiques pour les insectes qui les menacent. Celles-ci peuvent aussi être synthétisée dans le pollen qui sert de nourriture aux insectes pollinisateurs. Les abeilles, en tant qu'insectes pollinisateurs d'un grand nombre de plantes cultivées et sauvages, ont une grande importance tant du point de vue économique qu'écologique. Elles doivent donc être en mesure de supporter les plantes utiles transgéniques. Dans la présente étude, nous nous sommes penchés, lors d'un premier essai, sur l'exposition de larves d'abeilles à des plantes transgéniques. Dans un deuxième essai, nous avons étudié l'effet du maïs Bt et de la toxine Bt en haute concentration sur le développement de la glande nourricière des abeilles.*

Les plantes utiles résistantes aux insectes, modifiées génétiquement (transgéniques) résistent contre certains ravageurs (organismes ciblés), car elles sont en mesure de synthétiser elles-mêmes, dans les parties de la plantes sujettes aux attaques des insectes, des protéines toxiques pour ces derniers. En Europe, seul le maïs Bt est actuellement autorisé sur le marché comme plante transgénique, résistante aux insectes. Bt se réfère à la bactérie *Bacillus thuringiensis* très répandue dans les sols. Le maïs Bt produit une toxine qui agit spécifiquement contre les papillons ravageurs. En Europe centrale, on lutte de cette façon contre la pyrale du maïs. La spécificité élevée de ce moyen de lutte vient du fait que la toxine se lie à certains récepteurs différents selon le groupe animal. Pour lutter contre les ravageurs, les protéines toxiques sont produites en premier lieu dans les parties vertes de la plante et les racines. En plus, ces toxines peuvent aussi être présentes dans le pollen. Mais jusqu'à présent, on ne l'a pas trouvée dans le nectar, le pollen étant riche en protéines alors que le nectar n'est composé pratiquement que de sucres.

Ces toxines ne doivent pas endommager les organismes non ciblés tels les abeilles mellifères ou les abeilles sauvages de même que d'autres insectes et des animaux vivant librement. L'effet des toxines dépend en général de la quantité et de la toxicité spécifique de la protéine formée de même que l'exposition, c'est-à-dire de la probabilité et de l'ampleur de l'ingestion de la toxine par les organismes non-ciblés. Pour établir une analyse approfondie des risques, il faut donc connaître exactement la quantité de pollen ingérée par les larves et les abeilles adultes. Etant donné qu'il manque des données exactes surtout au sujet des larves, nous avons compté, dans la première partie de cette étude, la quantité de grains de pollen ingérée et valorisée par les différentes larves d'abeilles pendant toute la durée du développement de celles-ci <sup>(1)</sup>. Dans un second essai, nous avons analysé le développement de la glande nourricière <sup>(2)</sup>. La plupart des études réalisées jusqu'à aujourd'hui sur les éventuelles répercussions des plantes transgéniques sur les abeilles ont porté avant tout sur le taux de mortalité. Il y a cependant d'autres paramètres, par exemple la glande nourricière, qui peuvent jouer un rôle important dans le développement d'une colonie. Pour notre étude, nous avons choisi le maïs pour deux raisons: d'une part, le maïs Bt est déjà largement cultivé en Europe et, d'autre part, on sait que l'abeille mellifère récolte, lors de la floraison du maïs, de grandes quantités de pollen de maïs et que la proportion annuelle totale de pollen de maïs peut s'élever à 20% <sup>(3)</sup>.

## Consommation de pollen des larves

Pour déterminer la consommation de pollen des larves, nous n'avons donné à celles-ci, dans des conditions de semi-liberté, que du pollen de maïs. Nous avons semé dans 3 tentes de vol hermétiques (8 m x 14 m, fig. 1) du maïs non transgénique (variété Monumental). Environ 800 plantes par tente ont poussé. Dès que les plantes de maïs ont commencé à fleurir, nous avons

placé dans chaque tente deux petites colonies d'abeilles avec leur reine (environ 1'000 abeilles dans une ruche à un cadre). Les abeilles ont été nourries avec un pâte nourricière exempte de protéines, composée de saccharose et de miel de même que d'eau. Elles n'avaient cependant aucune provision de pollen dans les rayons. Cette structure d'essai a garanti que les abeilles ne récoltaient que du pollen de maïs et ne nourrissaient les larves qu'avec cette espèce de pollen. Pour cet essai, il était indispensable que les larves ne vident jamais le contenu de leur intestin pendant toute la phase de croissance. Ainsi, nous avons pu analyser tout le pollen ingéré et qui se trouvait dans l'intestin des larves adultes. Pour chacune des 5 colonies qui ont élevé du couvain, nous avons prélevé entre 26 et 35 larves des cellules fraîchement operculées, les avons pesées et disséquées. L'intestin préparé a été homogénéisé dans de l'eau isotonique et les pollens comptés sous le binoculaire. Tous les grains de pollen ont été attribués à l'une des trois catégories suivantes : totalement digéré (maximal 10% du contenu du grain de pollen), partiellement digéré ou non digéré (aucune différence reconnaissable avec du pollen frais, cf. fig. 2).



Fig. 1: tentes tunnel (8 m x 14 m) avec maïs

Pour chacune des 5 colonies qui ont élevé du couvain, nous avons prélevé entre 26 et 35 larves des cellules fraîchement operculées, les avons pesées et disséquées. L'intestin préparé a été homogénéisé dans de l'eau isotonique et les pollens comptés sous le binoculaire. Tous les grains de pollen ont été attribués à l'une des trois catégories suivantes : totalement digéré (maximal 10% du contenu du grain de pollen), partiellement digéré ou non digéré (aucune différence reconnaissable avec du pollen frais, cf. fig. 2).

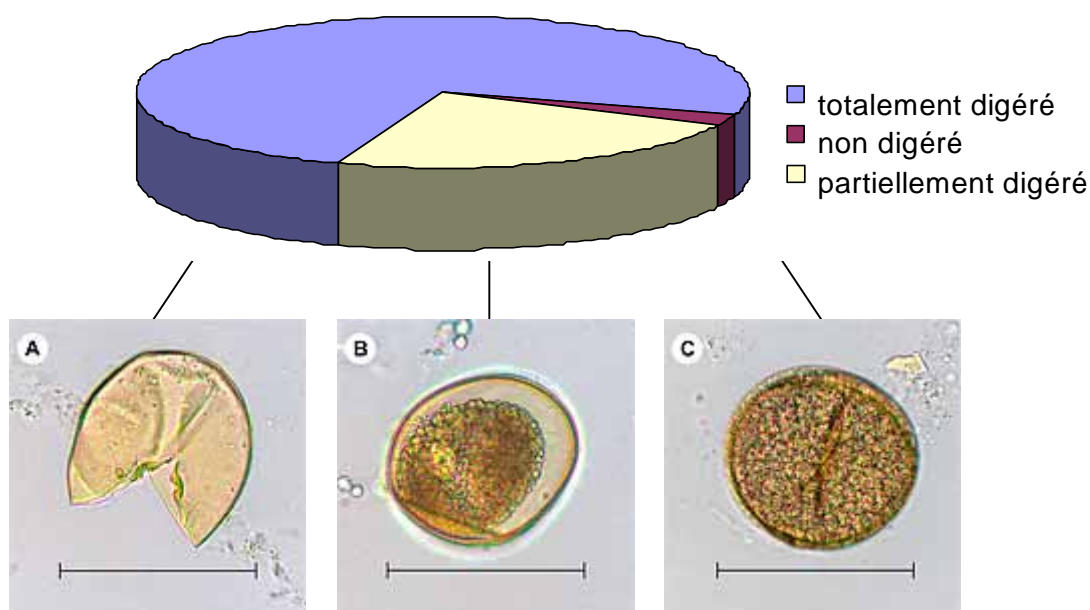


Fig. 2: Proportion de pollen dans les intestins des larves d'abeilles qui n'a pas du tout été digéré, a été partiellement digéré et a été totalement digéré (n = 177 larves de 5 colonies). La dimension correspond à 0,1 mm.

Nous avons trouvé en moyenne entre 1720 et 2310 grains de pollen de maïs dans l'intestin des différentes larves d'abeilles. Eu égard au poids frais des grains de pollen de maïs, cela correspond à environ 1,5 – 2,0 mg de pollen (fig. 3). En moyenne, 75% des grains de pollen était totalement digéré, alors que 23% l'était partiellement et 2% ne l'était pas du tout (fig. 2). Dans la présente étude, il y avait aussi quelques larves de faux-bourdon. Celles-ci pesaient en moyenne 39 % de plus que les larves d'ouvrières et contenaient 36% de grains de pollen en plus dans leur intestin. Autrement dit, la quantité de pollen dans la nourriture des faux-bourbons ne s'écarte pas fondamentalement des quantités relevées pour les ouvrières.

Quel est cependant le rapport entre le nombre de grains de pollen que nous avons dénombré par rapport au total de protéines nécessaire pour élever une larve? Des estimations antérieures ont

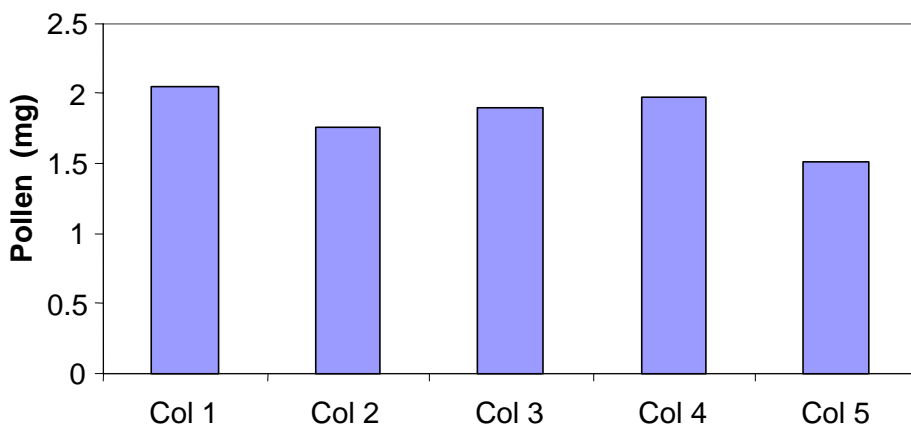


Fig. 3: Quantité moyenne de pollen que les différentes larves ont ingéré (n = 26-35 pour les 5 colonies).

montré qu'une colonie a besoin d'environ 160 mg de pollen par larve <sup>(4)</sup>. Ceci inclut le besoin des abeilles adultes pour l'ensemble de l'année. On obtient une estimation plus exacte comme base la teneur en azote des différentes larves (env. 1.85 mg) <sup>(5)</sup>. Si l'on tient compte des excréments déjà excrétés, du facteur de conversion de l'azote en protéine et de la teneur en protéine dans le pollen, on peut calculer pour le maïs une quantité de pollen approximative de 86 mg qui est nécessaire pour élever une larve. Nos données montrent ainsi que la proportion de protéine provenant des grains de pollen ne couvre qu'environ 2,5% du besoin en protéines des larves pendant toute la durée du développement. Le reste - et donc la partie, de loin, la plus importante des protéines - est fourni aux larves par le biais de la gelée nourricière. Il faut cependant considérer que le nombre de grains de pollen pourrait varier en fonction de divers facteurs (par ex. le spectres des variétés de pollen récolté). Une étude réalisée déjà en 1955 parvient à des résultats semblables <sup>(6)</sup>. Dans l'étude de Simpson les abeilles n'ont pas été nourries, pour les besoins de l'essai, avec une seule espèce de pollen, mais pouvaient récolter du pollen de différentes plantes. Ce dernier point a conduit, en raison des considérables différences de dimension des grains de pollen, à des difficultés lors du calcul de la quantité de pollen ingérée.

La quantité relativement faible d'à peine 2 mg de pollen par larve signifie que l'exposition des larves d'abeilles aux toxines produites par les plantes transgéniques a été jusque là sur-estimée. Ainsi Malone et al. <sup>(7)</sup> ont donné aux larves d'abeilles des quantités de toxines qui reposent sur des suppositions beaucoup trop élevées. Nos données au sujet de la consommation de pollen doivent être utilisées comme base pour d'autres études des risques des larves d'abeilles pour assurer que des quantités de toxines réalistes dans les essais sur le nourrissage soient utilisées <sup>(1)</sup>. La question de savoir si les toxines dans les glandes nourricières des nourrices peuvent arriver dans les larves a été traité dans deux essais (voir ci-dessous).

## Effets sur la glande nourricière des nourrices

La glande nourricière des ouvrières adultes produit la gelée nourricière, substance riche en protéines destinées aux larves ; elle est donc très importante pour le développement des colonies. En conséquence, la glande nourricière pourrait être un facteur important pour estimer les risques des plantes transgéniques sur les colonies d'abeilles. Au moyen de modélisations avec le maïs Bt, nous avons analysé si la distribution de pollen transgénique avait des répercussions sur le développement de la glande nourricière chez les ouvrières <sup>(2)</sup>. Toutefois, la variété que nous avons utilisée (MON 810) contenant très peu de toxine Bt dans le pollen, nous avons en plus nourri les abeilles avec de hautes concentrations de toxine pure (Cry1Ab, 0,0014%), dissoute dans de l'eau. En outre, les abeilles ont reçu aussi du pollen de maïs de la variété non transgénique (Monumental). Quant aux abeilles témoins, elles ont reçu elles aussi de ce pollen de même qu'une solution sucrée sans additifs. Pour le contrôle positif, nous avons utilisé un inhibiteur de la protéase (fèves de soja inhibiteur de la trypsine, abrégé SBTI), dont on connaît les effets négatifs

sur les abeilles <sup>(8, 9, 10)</sup>. Ces abeilles ont été nourries avec du pollen de maïs non transgénique et une solution d'eau, qui contenait des SBTI en deux concentrations différentes (0,1% et 1%).

Dans notre essai, nous avons mis dans des chambres climatisées de petites colonies d'abeilles avec leur reine, du couvain et environ 250 ouvrières (fig. 4). Pour chaque traitement et répétition de traitement, nous avons en plus mis 50 ouvrières fraîchement écloses dans chaque colonie. Les glandes nourricières ayant terminé leur développement au bout d'une dizaine de jours, l'essai a été interrompu après cette période. Pour chaque traitement, 24 abeilles ont été disséquées et les glandes nourricières prélevées ont été lyophilisées.



Fig. 4: Petites colonies dans des petites ruches de type Liebefeld avec un cadre provenant de petites ruchettes de fécondation Apidea.

Il ressort de cet essai que ni le pollen de maïs Bt ni la toxine Bt n'a eu un quelconque effet sur le développement des glandes nourricières après une période de 10 jours de nourrissage (fig. 5). De même, avec 82,1% pour le pollen Bt et 89,7% pour la toxine Bt, les taux de survie des abeilles n'étaient pas beaucoup différents des taux relevés pour les abeilles témoins (81,2%). Au contraire, le traitement des abeilles fraîchement écloses avec des SBTI (0,1 et 1%) pendant 10 jours a réduit de manière significative le poids sec moyen des glandes nourricières et le diamètre moyen des différents sacs glandulaires (fig. 5). Dans la concentration la plus élevée (1%), le SBTI a aussi réduit la quantité de solution sucrée ingérée et a inhibé l'élevage du couvain. Au contraire, l'ingestion de pollen ne se distinguait pas de façon significative entre les traitements. Au total, nous avons trouvé seulement 3 cellules de couvain operculées dans le traitement avec 1% à la fin de l'essai (après 10 jours), alors que dans les autres traitements nous en avons trouvé respectivement 39 et 140.

Etant donné que les toxines formées par les plantes transgéniques sont éventuellement aussi transmises aux larves par le biais de la glande nourricière, nous avons essayé de mettre cela en évidence par des méthodes moléculaires. Nous avons utilisé à cet effet un test 'ELISA' avec lequel il est possible de détecter la toxine Bt par le biais d'anticorps spécifiques. Avec ce test, nous avons détecté de très faibles quantités de toxines Bt dans les glandes nourricières des abeilles nourries avec la solution sucrée contenant du Bt. La concentration de la toxine Bt dans les tissus de la glande nourricière s'élevait à seulement un millième de la concentration donnée en nourrissant aux abeilles. Vu que dans les glandes des abeilles nourries avec du pollen de maïs Bt nous n'avons trouvé aucune trace de toxine, on peut en conclure que le passage de la toxine Bt par le biais des glandes nourricière dans le couvain est improbable ou, le cas échéant, seulement en quantités extrêmement faibles.

## Conclusion

L'étude portant sur la consommation de pollen a montré combien il est important de disposer de données exactes sur l'exposition des abeilles aux toxines synthétisées par les plantes transgéniques et que l'exposition des larves a été surestimée jusqu'à aujourd'hui. Etant donné que l'ingestion de pollen des larves d'abeilles est minimale, nous en concluons qu'elles sont sensiblement moins exposées aux protéines insecticides que les adultes. Dans une deuxième étude, nous avons montré que le pollen de la variété de maïs Bt MON 810 de même que la toxine correspondante (Cry1Ab) n'ont aucun effet négatif sur le développement des glandes nourricières même en concentrations élevées.

Autrement dit, les toxines Bt utilisées jusqu'à aujourd'hui n'ont eu aucun effet négatif sur les abeilles même en concentrations élevées, bien que nous ayons étudié surtout le taux de mortalité, mais aussi d'autres paramètres comme le comportement de récolte. Les publications parues sur le thème ont eu des résultats semblables, à savoir que les toxines Bt et les plantes transgéniques

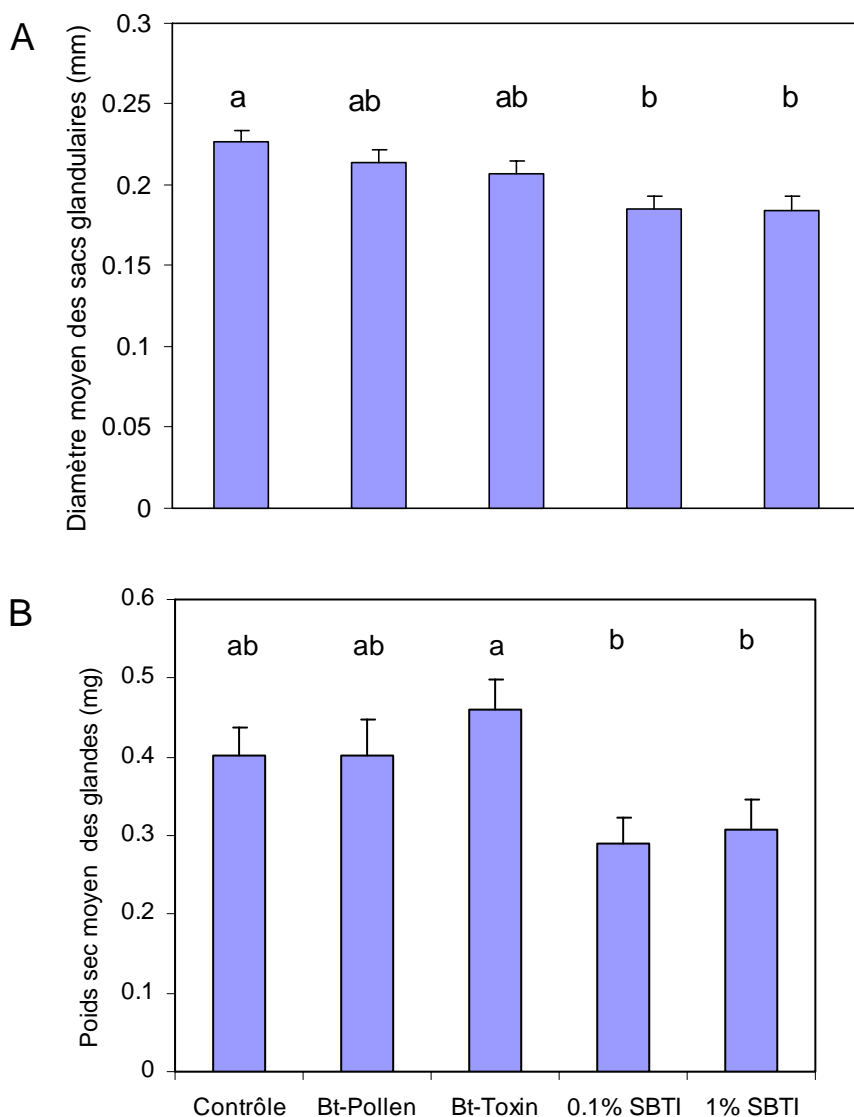


Fig. 5: Diamètre moyen des divers petits sacs glandulaires (A) poids sec moyen (B) de la glande nourricière en fonction du traitement (n = 120). Les mêmes lettres sur les colonnes montrent qu'il n'y a pas de différences significatives; dans le cas de lettres différentes, les valeurs sont significativement différentes.

correspondantes ne sont pas dangereuses pour les abeilles <sup>(8, 9, 10)</sup>. En raison du mécanisme d'action particulier des toxines Bt qui doivent se fixer à des récepteurs spécifiques dans l'intestin pour déployer tous ses effets, les effets à long terme du maïs Bt sur les abeilles sont aussi très improbables. Les connaissances acquises au cours de ces essais comblent certaines lacunes dans les connaissances existantes et coïncident avec les conclusions des études réalisées antérieurement sur le thème des plantes transgéniques et des abeilles.

## Remerciements:

Nous remercions sincèrement Hans-Ueli Thomas (Zurich) pour la mise à disposition de ses colonies. Nous remercions aussi Nicole Kalberer pour son soutien lors des essais et Lena Obrist pour la réalisation du test ELISA. Ce projet a été cofinancé par l'Office fédéral de l'environnement (OFEV).

## Bibliographie

1. Babendreier D., Kalberer N., Romeis J., Fluri P., Bigler F. (2004) Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35 (3) 293-300.
2. Babendreier D., Kalberer N., Romeis J., Fluri P., Bigler F. (2005) Influence of transgenic Bt-Pollen, pure Bt-toxin and proteinase inhibitor (SBTI) ingestion on survival and development of the hypopharyngeal gland in the honeybee. *Apidologie* 36 (4) 585-594.
3. Wille H., Wille M., Kilchenmann V., Imdorf A., Bühlmann G. (1985) Pollenernte und Massenwechsel von drei *Apis mellifera* Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren. *Rev. Suisse Zool.* 92 (4) 897-914.
4. Alfonsus E.C. (1933) Zum Pollenverbrauch des Bienenvolkes. *Arch. Bienenkde.* 14 (5) 220-223.
5. Imdorf A., Rickli M., Kilchenmann V., Bogdanov S., Wille H. (1998) Nitrogen and mineral constituents of honey bee worker brood during pollen shortage. *Apidologie* 29 (4) 315-325.
6. Simpson J. (1955) The significance of the presence of pollen in the food of worker larvae of the honeybee, *Quart. J. Microscop. Sci.* 96 (1) 117-120.
7. Malone L.A., Tregidga E.L., Todd J.H., Burgess E.P.J., Philip B.A., Markwick N.P., Poulton J., Christeller J.T., Lester M.T., Gatehouse H.S. (2002) Effects of ingestion of a biotin-binding protein on adult and larval honey bees. *Apidologie* 33 (5) 447-458.
8. Malone L.A., Pham-Delegue, M.H. (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32 (4) 287-304.
9. Keil S., Romeis J., Bigler F., Fluri P. (2002) Abschätzung des Risikos von transgenen Pflanzen für Honigbienen. *Schweiz. Bienenztg.* 125 (1) 20-27.
10. Malone L.A. (2004) Potential effects of Gm crops on honey bee health. *Bee World* 85 (2) 29-36.