

PLANTES TRANSGENIQUES ET RESISTANCES AUX INSECTES

Yvonne COUTEAUDIER et Guy RIBA

INRA – D.S.P.P.V.

147, rue de l'Université

75338 PARIS CEDEX 07

INTRODUCTION

Si on ne procédait à aucune protection des cultures, les pertes induites par les insectes s'élèveraient à 400 milliards de dollars. Grâce à l'emploi d'insecticides classiques et de méthodes alternatives, le coût de ces dégâts n'est plus que de 100 milliards de dollars.

Peu à peu sont conçues des alternatives à la lutte chimique par épandage d'insecticides : on assiste ainsi au développement de la lutte biologique par entomophages ou microorganismes entomopathogènes, de la confusion sexuelle par saturation de l'atmosphère d'un champ en médiateurs chimiques, ou par la sélection variétale. C'est ainsi que de plus en plus des variétés conventionnelles résistantes aux ravageurs sont mises sur le marché. Il convient d'encourager les investigations qui sont à l'origine de ces variétés performantes et durablement résistantes, d'autant que pour la plupart des espèces cultivées, l'exploration des ressources génétiques n'est qu'à peine amorcée.

On sait toutefois que dans de nombreux cas l'accroissement de la résistance ou de la tolérance à un ravageur s'accompagne de modifications morphologiques ou de teneurs en substances secondaires qui affectent considérablement la digestibilité de la plante ou son aptitude à la transformation.

Dans ce contexte, la transgénèse offre d'indéniables avantages qui justifient l'engouement spectaculaire et médiatisé que suscite cette stratégie.

En 1987 apparaissaient les premières publications de création d'une variété transgénique résistante à un insecte : (HILDER *et al* ; VAECK *et al*). Dix ans plus tard, plus de 5 millions d'hectares de "maïs Bt" sont exploités dans le monde tandis que plus de 40 gènes de résistance ont été spécialement introduits dans plus de 20 espèces cultivées : (SCHULER *et al*, 1998). De ce fait les sources potentielles de résistance connaissent un élargissement sans précédent qui, sous réserve d'une utilisation appropriée, contribuera à réduire la pollution chimique de l'environnement, à protéger l'entomofaune et à éliminer les résidus d'insecticides dans les aliments ou l'eau.

Nous verrons successivement les gènes et promoteurs susceptibles d'être introduits dans les plantes, puis nous évoquerons l'efficacité des plantes actuellement exploitées ; enfin nous décrirons les risques induits et présenterons les procédures de biovigilance qu'il serait raisonnable de mettre en oeuvre.

1 - LES GENES DE RESISTANCE

1.1 - Les gènes issus de plantes

Les perspectives de transgénèse élargissent indéniablement la recherche des sources de résistance qui sont, encore aujourd'hui, fort mal connues et sans doute très fortement sous-estimées.

L'une des possibilités est de modifier la voie de synthèse des métabolites supposés intervenir dans la résistance aux ravageurs. Il en est ainsi des investigations concernant les phytoecdystéroïdes (LAFONT *et al*, 1991) dont la chaîne de biosynthèse a été récemment mise en évidence dans le maïs (DEVARENNE *et al*, 1995)

Dans le même ordre d'idée, on recherchera des molécules de plantes susceptibles d'affecter plus spécifiquement une fonction chez les insectes. Il en est ainsi des chitinases de plantes dont l'effet insecticide ne se manifeste toutefois qu'à des concentrations bien supérieures à celles nécessaires pour induire un effet antifongique.

Une autre stratégie consiste à augmenter la concentration en alcaloïdes de tryptamine dont on connaît déjà les effets anti-oviposition et anti-appétents. Signalons à ce propos l'effet remarqué de la tryptophane décarboxylase de pervenche dont l'expression dans le tabac affecte considérablement la reproduction de *Bemisia tabaci* (THOMAS *et al*, 1995).

Une autre orientation consiste à rechercher dans les plantes des protéines à effet insecticide. Une attente particulière doit à ce propos être accordée aux graines et semences qui, au cours de l'évolution, ont été soumises à des pressions de sélection favorables à la synthèse localisée de telles protéines, notamment chez les légumineuses.

On trouve chez les végétaux les principales classes d'inhibiteurs de protéases : protéases à sérine, cystéine, métallo-protéases et aspartyl-protéases. Pour l'instant les gènes de 14 d'entre eux ont été clonés puis exprimés dans des espèces cultivées (SCHULER *et al*, 1998). Fabacées, Solanées et Poacées sont à l'origine de la plupart des inhibiteurs de sérine et cystéine-protéases actifs contre des Lépidoptères et quelques Coléoptères et Orthoptères (BROADWAY and DUFFEY, 1986, ORR *et al*, 1994) ; l'un des plus efficaces fut isolé du niébé. Parmi les nombreux inhibiteurs de cystéine-protéases, signalons celui qui fut trouvé chez le riz (LIANG *et al*, 1994).

Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer le fait que la plupart des résultats sont décourageants :

1) la mort de l'insecte serait due à une déficience des acides aminés essentiels provoquée par l'hypersecretion d'enzymes digestives ;

2) la plupart des insectes sont capables de compenser l'inhibition d'une de leurs protéases par l'activation d'une autre non sensible à l'inhibiteur.

Il est pour l'instant trop tôt pour statuer sur l'intérêt d'utiliser l'inhibiteur d'alpha-amylases du haricot commun (HILDER *et al*, 1997) qui a été introduit dans plusieurs espèces maraîchères, ou de trois autres inhibiteurs qui ont été clonés et exprimés dans le tabac (SCHULER *et al*, 1998).

Les lectines végétales semblent être efficaces contre des Homéoptères, Coléoptères, Lépidoptères et Diptères. Bien que le mode d'action ne soit pas encore connu, on sait déjà que certaines d'entre elles très actives contre les insectes ont peu d'effet sur les vertébrés. Par sa forte activité contre les Homoptères, une lectine du perce-neige a fait l'objet d'investigations plus approfondies sur pomme de terre, colza et tomate. Les variétés transgéniques ainsi créées n'affectent ni la mortalité ni la durée du développement mais réduisent considérablement la fécondité des pucerons (HILDER *et al*, 1997). Il convient donc de poursuivre les investigations sur les lectines végétales pour l'identification de nouvelles molécules, comprendre le mode d'action et optimiser l'efficacité des variétés transgéniques (Tableau 1).

Tableau 1 : Principales lectines dont les gènes ont été introduits dans des plantes

Produit du gène	Insecte cible
WGA : agglutinine de germe de blé	Lépidoptères, Coléoptères
GNA : lectine de perce-neige	Homoptères, Lépidoptères
p-lec : lectine de pois	Homoptères, Lépidoptères
jacaline	Lépidoptères, Coléoptères
lectine de riz	Lépidoptères, Coléoptères

Une piste encore trop peu étudiée consiste en l'étude des mécanismes de résistance des plantes aux attaques d'insectes pouvant induire la fuite du ravageur ou sa mort par arrêt brutal des flux phloemiens ou apoptose.

1.2 - Les gènes issus d'animaux

D'une façon générale cette possibilité est très nettement sous-explorée. Certes, chitinases ou antiprotéases d'insectes, ou même antiprotéases de vertébrés ont été exprimées dans des plantes. Nous considérons toutefois qu'il faut rapidement étudier les effets de l'expression dans des plantes d'hormones spécifiques et déterminantes du développement ou du comportement des insectes.

1.3 - Les gènes d'origine microbienne

Les plus célèbres d'entre eux sont bien évidemment les gènes d'endotoxine de *Bacillus thuringiensis*. A partir des 40 000 souches de Bt isolées de par le monde, une centaine de toxines différentes ont été séquencées et réparties en une trentaine de familles. Chacune d'elles a un spectre d'hôte qui lui est spécifique, car seuls les insectes qui ont le récepteur mésentéral correspondant peuvent être sensibles à la toxine.

Les gènes de Bt actifs sur Lépidoptères (cry1, cry2, cry6 et cry9) ou sur Coléoptères (cry3) ont été introduits dans 26 espèces de plantes cultivées mono ou dicotylédones (SCHULER *et al*, 1998). Après optimisation des séquences du transgène et choix approprié des promoteurs, on peut obtenir des effets insecticides tout à fait inégalés.

La cholestérol oxydase d'un streptomycète a été exprimée dans du tabac ainsi devenu très toxique pour *Anthonomus grandis* et *Heliothis virescens* (PURCELL,1997).

Enfin notons les espoirs fondés sur les protéines toxiques sécrétées par *B.cereus*, *B. sphaericus* et même *B. thuringiensis* (WARREN,1997) ; on ne peut pour l'instant se prononcer sur ces molécules récemment découvertes mais elles s'inscrivent en tout cas dans une démarche à soutenir.

2 - L'EFFICACITE DES MAÏS BT

Compte tenu de son activité et des débats qu'il engendre, nous évoquerons l'extraordinaire efficacité des maïs BT. En France 600.000 ha de maïs font l'objet d'application d'un insecticide chimique performant mais polluant pour protéger les cultures des attaques de la pyrale. A l'exception des zones les plus septentrionales, cet insecte n'a qu'une génération annuelle et reste le ravageur unique du maïs. On peut en effet considérer que les dégâts par taupins ou pucerons qui peuvent être localement graves n'ont pas d'incidence nationale sur cette production. De même la sésamie est pour l'instant limitée à une partie du Sud-Ouest malgré une extension significative en Espagne.

Les résultats montrent une grande sensibilité des populations françaises de pyrale à la toxine de Bt et plus précisément au maïs BT. Cette efficacité est indépendante du niveau initial d'infestation (LABATTE *et al*, 1996).

Enfin, bien qu'insensible aux biopesticides à base de Bt, la sésamie est tuée par les variétés transgéniques qui expriment la toxine tronquée.

3 - LES RISQUES LIES AUX PLANTES TRANSGENIQUES RESISTANTES AUX INSECTES

3.1 - Caractérisation des risques

Nous évoquerons sans les approfondir les effets non intentionnels qui concernent "a priori" toutes les plantes transgéniques :

- 1) dispersion de la plante ;
- 2) dispersion du transgène par hybridation avec d'autres variétés de la même espèce ou d'une espèce végétale proche ;
- 3) dispersion des gènes marqueurs associés au gène d'intérêt ;
- 4) apparition d'une toxicité ou d'une allergénicité nouvelle ;
- 5) modifications des itinéraires phytosanitaires ou même des pratiques culturales ;
- 6) modifications des procédures de collecte, stockage ou distribution des récoltes ou des produits dérivés.

Seule l'analyse au cas par cas en fonction de l'espèce cultivée, de la nature du transgène, du devenir de la récolte, du contexte environnemental permet de traiter naturellement ces effets potentiels.

Parmi les risques plus spécifiques liés à l'activité insecticide apportée par la variété, nous évoquerons les effets secondaires sur l'entomofaune auxiliaire et le risque de "contournement du gène" par suite de la sélection non intentionnelle d'une population cible résistante.

D'une grande spécificité, les endotoxines de Bt n'ont aucun effet sur les pollinisateurs tels que les bourdons et abeilles ni sur des nombreux auxiliaires tels que trichogrammes, syrphes et coccinelles. Pour autant, comme cela a été fait pour Bt, il conviendra d'éprouver l'inocuité de chaque gène introduit dans une plante sur chacun des principaux auxiliaires de la culture cible.

3.2 - Le contournement du gène par sélection d'insectes résistants

Les plantes transgéniques à effet insecticide sont particulièrement propices à la sélection non intentionnelle d'insectes résistants, en effet :

- 1) le déterminisme de la résistance de la plante est monogénique ;
- 2) tous les individus qui attaquent la variété sont au contact d'une dose de toxine.

La vitesse de sélection de tels insectes dépend :

- 1) de la fréquence initiale des allèles de résistance ;
- 2) de la fréquence des accouplements entre insectes résistants et sensibles au transgène ;
- 3) du déterminisme dominant ou récessif de la résistance ;
- 4) de la fitness des insectes résistants. Par application successive d'une dose affectant 70 à 90% des larves, nous avons sélectionné une population de *Spodoptera* parfaitement résistante à Bt CryIC (MÜLLER-COHN *et al*, 1996).

En utilisant le même protocole sur trois populations géographiques de pyrale du maïs, on n'est pas parvenu au même résultat puisque la courbe de sensibilité des insectes à Bt ne s'est pas modifiée au cours des expériences.

3.3 - La gestion des risques

Au niveau européen, elle est actuellement basée davantage sur des études conceptuelles que sur d'importants travaux scientifiques (R. ROUSH, 1997 ; A.F. KRATTIGER, 1997).

Les principaux axes stratégiques sont les suivants :

3.3.1 - Retarder l'apparition des insectes résistants

3.3.1.1. - Au cours de la création des variétés

On peut être tenté par la conception de variétés exprimant de faibles doses et de ce fait, exerçant de faibles pressions de sélection sur les insectes. Au delà du fait qu'il n'est pas

prouvé que de faibles doses ne conduisent pas *in fine* à la sélection de tous les allèles forts et faibles de résistance, cette stratégie n'est pas acceptable aujourd'hui car seuls des effets drastiques seront de nature à convaincre les agriculteurs de l'intérêt de ces variétés. Par ailleurs, les expressions fortes conduisant à plus de 99% de mortalité en 2 jours (ce qui est le cas pour le maïs BT) sont compatibles avec le fait que, à l'heure actuelle, dans tous les cas où des insectes ont pu être sélectionnés, le déterminisme s'est avéré récessif.

L'idée d'intégrer dans la même plante deux gènes de résistance suppose d'une part, qu'il n'y a pas de résistance croisée entre eux, d'autre part, qu'ils ont une efficacité comparable.

Enfin l'ultime possibilité est de ralentir l'apparition de résistants en n'exprimant le transgène que dans certaines parties de la plante ou à des moments précis. A cette fin, d'importantes investigations sont réalisées dans la recherche de promoteurs tissus-spécifiques (Tableau 2).

Tableau 2 : Exemples de promoteurs tissus-spécifiques

Promoteur	Site d'expression	Toxine insecticide
RSs1 : sucrose -synthase de riz	phloème	GNA
PHA-L, <i>dlec 2</i> phytohémataglutinine-L de haricot	graine	α -AI-Pv
Promoteur "pollen spécifique" de maïs	pollen	Cry1 Ab
trpA : "sous unité α de la tryptophane synthase" de maïs	moëlle	Cry1 Ab
PEPC : phosphoenolpyruvate-carboxylase de maïs	tissus verts	Cry1 Ab
<i>Prrn</i> : opéron ARN ribosomal	chloroplastes	Cry1 Ac

3.3.1.2. - Au cours de la culture des variétés

La stratégie maîtresse consiste à implanter des zones refuges, au sein desquelles les insectes ne seront pas du tout soumis à la pression du transgène, et serviront de ce fait de "diluteurs" des allèles de résistance dont la fréquence augmente parmi les survivants à un champ transgénique. On peut aussi concevoir de semer un damier de champs transgéniques et de cultures non transgéniques. D'autres travaux suggèrent de circonscrire la variété transgénique par quelques rangs d'une variété conventionnelle. Les mélanges de variétés transgéniques et conventionnelles ont aussi un effet "refuge". Finalement d'autres personnes préconisent des rotations culturales autorisant un usage alterné des variétés transgéniques.

S'il n'y a aucun doute sur le bien fondé de cette stratégie, la difficulté reste entière dès lors qu'il faut évaluer la part relative de non transgénique dans une région où les variétés transgéniques sont fortement sollicitées. Seules des études de base qui font encore défaut permettent de fournir une réponse objective.

3.3.2. - Contrôler la dissémination

La première façon de limiter les risques liés à la dispersion du transgène est d'en limiter la composition au strict gène d'intérêt. A cette fin, des stratégies sont mises en place pour éliminer les gènes marqueurs, par exemple avec le système "cre-lox", ou bien en les insérant dans des éléments transposables mobiles qui seront finalement éliminés.

Toutes les variétés transgéniques, y compris le maïs, posent le problème des hybridations infraspécifiques. L'incidence de tels flux peut avoir des conséquences technologiques (cas des produits dérivés de graines) ou agronomiques (cas des productions de semences). On sait que les fécondations à partir d'une source de pollen diminueront très rapidement en fonction de la distance et peuvent devenir insignifiantes au bout de quelques centaines de mètres, mais on sait aussi que leur fréquence suit une asymptote qui empêche de garantir l'absence absolue de toute fécondation entre champs espacés de quelques kilomètres. La résolution de ce problème dont l'incidence est finalement minime dans le cas du maïs réside dans la maîtrise de l'expression du transgène dans la seule lignée femelle et son absence totale dans le pollen.

La troisième possibilité de dispersion du transgène résulte d'hybridations interspécifiques. Toujours beaucoup plus rares que les croisements entre variétés de la même espèce, ces cas peuvent toutefois être significatifs dans certaines familles de plantes telles que choux, colzas ou betteraves.

Dans de nombreux cas le risque majeur de dispersion est celui des repousses auquel une attention particulière doit être apportée, dès lors que les plantes transgéniques s'intégreront dans des systèmes de culture complexes.

3.4. - La biovigilance

Le potentiel encore mal évalué des variétés transgéniques, les avantages encore mal perçus pour et par le consommateur ou l'agriculteur, et en vis à vis les risques induits par ces cultures, conduisent les autorités à préconiser leur contrôle continu. C'est ainsi, qu'au cas par cas, seront établies des procédures de biovigilance fondées sur une traçabilité des semences et des cultures, sur une caractérisation des risques encourus, et enfin sur leur évaluation régulière dans l'espace et dans le temps.

CONCLUSION

Encore peu nombreuses, les plantes transgéniques sont toutefois une réalité agronomique. Les perspectives qu'elles offrent sont encore insoupçonnées compte tenu du manque de gènes disponibles. Elles contribuent incontestablement au respect de l'environnement en réduisant totalement l'usage d'insecticides. Source d'économie, d'intrants, de résidus et d'argent, elles devraient logiquement participer à la compétitivité des filières et à la baisse des prix à la consommation.

BIBLIOGRAPHIE

- BROADWAY R., DUFFEY S. -1986- Plant proteinase inhibitors : mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*, *J. Insect. Physiol.* 32, 827-833.
- DEVARENNE T.P., SEN-MICHAEL B., ADLER J.H., -1995- Biosynthesis of ecdysteroids in *Zea Mays*. *Phytochemistry*. 40, 1125-1134.
- HILDER V.A., GATEHOUSE A.M.R., SHEERMAN S., BARKER R.F., BOULTER D. -1987- A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330, 160-163.
- HILDER U.A., POWELL K.S., GATEHOUSE A.M.R., GATEHOUSE, J.A., GATEHOUSE L.N., SHY Y., HAMILTON W.O.O., MERRYWEATHER A., NEWELL C.A., TIMANS J.C. -1995- Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgen. Res.* 4, 18-25.
- KRATTIGER A.F.- 1997- Insect resistance in crops : a case study of *Bacillus Thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. *ISAAA Briefs (2)*. ISAAA Ithaca, NY. pp. 42.
- LABATTE J.M., MEUSNIER S., MIGEON A., CHAUFFAUX J., COUTEAUDIER Y., GOT B., RIBA G. -1996- Field evaluation of and modeling the impact of three control methods on the larval dynamics of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Pyralidae). *J.Econ. Entomol.* 89 (4), 852-862.
- LAFONT R., BOUTHIER A., WILSON I.O. -1991- Phytoecdysteroids : structures, occurrence, biosynthesis and possible ecological significance. *Insect Chemical Ecology*, Hardy I.Ed-The Hague ; *Acad. Praha and SBP Acad Publ.*197-214.
- LIANG C., BROOKHART G., FENG G., REECK G., KRAMER K. -1991- Inhibition of digestive proteinases of stored grain coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. *FEBS Lett.* 278, 139-142.
- MULLER-COHN J., CHAUFFAUX J., BUISSON C., GILOIS N., SANCHIS V., LERECLUS D. - 1996- *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera : Noctuidae) resistance to Cry1C and cross resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. *J. Econ. Entomol.* 89, 4, 791-796.
- ORR G., STRICKLAND J. and WALSH T.. Inhibition of *Diabrotica* larval growth by multi-cystatin from potato tubers. *J. Insect. Physiol.* 40, 893-900.
- PURCELL J.P. -1997- Cholesterol oxidase for the control of boll weevil. 95-108, *In : Advances in insect control ; the role of transgenic plants*, Ed. by CAROZZI, N. and KOZIEL, M. 301p. TAYLOR and FRANCIS Ltd, London.
- ROUSH R. -1997- Managing resistance to transgenic crops. 271-294 *In : Advances in insect control ; the role of transgenic plants*, Ed. by CAROZZI, N. and KOZIEL, M. 301p. TAYLOR and FRANCIS Ltd, London.
- SCHULER T.J., POPPY G.M., KERRY B.R., DENHOLM I. -1998- Insect resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology* (sous presse).
- THOMAS J.C., ADAMS D.G., NESSLER C.L., BROWN J.K., BOHNEK H.J. -1995- Tryptophan decarboxylase tryptamine and reproduction of the whitefly. *Plant Physiol.* 109, 717-720
- VAECK M., REYNARTS A., HOFTE H., JANSSENS S., DEBENCKELEER M., DEAN C., ZABEAU M., VANMONTAGU M., LEEMANS J. -1987- Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*. 238 (2), 33-37.
- WARREN G.W. -1997- Vegetative insecticidal proteins : novel proteins for control of corn pests. 109-121. *In : Advances in insect control ; the role of transgenic plants*. Ed. by CAROZZI N. et KOZIEL M.. 301p. TAYLOR et FRANCIS Ltd, London.