



**HAL**  
open science

## Résistance des insectes aux toxines de *Bacillus thuringiensis* produites par les plantes génétiquement modifiées

Sylvie Augustin, Marie-Thérèse Bethenod, Denis D. Bourguet, Josette Chaufaux, Claudine Courtin, Brigitte B. Frerot, Gilles Genestier, Anne Genissel, Laurent Pelozuelo, Agnes A. Rejasse, et al.

► **To cite this version:**

Sylvie Augustin, Marie-Thérèse Bethenod, Denis D. Bourguet, Josette Chaufaux, Claudine Courtin, et al.. Résistance des insectes aux toxines de *Bacillus thuringiensis* produites par les plantes génétiquement modifiées. 2004. hal-02832891

**HAL Id: hal-02832891**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02832891>**

Submitted on 7 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Résistance des insectes aux toxines de *Bacillus thuringiensis* produites par les plantes génétiquement modifiées

Sylvie AUGUSTIN<sup>(1)</sup>, Marie-Thérèse BETHENOD<sup>(2)</sup>, Denis BOURGUET<sup>(2,3)\*</sup>, Josette CHAUF AUX<sup>(2)</sup>, Claudine COURTIN<sup>(1)</sup>, Brigitte FREROT<sup>(4)</sup>, Gilles GENESTIER<sup>(4)</sup>, Anne GENISSEL<sup>(1)</sup>, Laurent PELOZUELO<sup>(3)</sup>, Agnès REJASSE<sup>(2)</sup> et Yan THOMAS<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Unité de Zoologie Forestière, Centre de Recherches d'Orléans, Institut National de la Recherche Agronomique, BP 20619 Ardon, 45 166 Olivet.

<sup>(2)</sup> Unité Génétique Microbienne et Environnement, Institut National de la Recherche Agronomique, La Minière, 78285 Guyancourt Cedex

<sup>(3)</sup> Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP), Institut National de la Recherche Agronomique, Campus International de Baillarguet, CS 30 016, 34 988 Montferrier / Lez.

<sup>(4)</sup> Unité de Phytopharmacie et des Médiateurs chimiques, Institut National de la Recherche Agronomique Versailles, Route de Saint-Cyr, 78 026 Versailles Cedex.

Auteur correspondant : D. Bourguet, mél: [bourguet@ensam.inra.fr](mailto:bourguet@ensam.inra.fr); Tel. 04 99 62 33 66; Fax. 04 99 62 33 45.

## Résumé

Un des risques environnementaux le plus souvent évoqué lors de l'utilisation des plantes transgéniques exprimant une toxine de *Bacillus thuringiensis* est la sélection d'insectes ravageurs résistants à cette toxine. Dans le cadre de cette ACI, plusieurs paramètres permettant un meilleur ajustement des stratégies de gestion de ces résistances ont été estimés. Nous avons ainsi montré que les fréquences des allèles de résistance aux toxines produites par les maïs *Bt* dans les populations naturelles de pyrale du maïs du sud de la France et dans celles de la Corn Belt américaine sont  $< 10^{-3}$ . En revanche, sur un autre modèle d'étude, la chrysomèle du tremble, nos études montrent que les fréquences d'allèles de résistance aux toxines produites par les peupliers *Bt* peuvent être initialement (i.e., avant l'introduction de ces peupliers transgéniques) élevées ( $> 10^{-3}$ ). Ces allèles confèrent une résistance à la toxine Cry3Aa (la toxine produite par les peupliers *Bt*) monogénique, récessive et d'un facteur  $> 6400$  fois. Par ailleurs, nous avons mis en évidence deux races-hôtes de pyrale, la première se développant sur le maïs, la deuxième infestant l'armoise et le houblon. Les femelles de ces deux races produisent des phéromones sexuelles différentes et les émergences sont décalées : les papillons issus de la race armoise/houblon émergent plus précocement que ceux de la race maïs. Ces deux facteurs sont probablement impliqués dans l'isolement reproducteur entre les individus des deux races-hôtes. La structuration des populations de pyrale en races-hôtes a des implications directes sur la gestion de la résistance aux maïs *Bt* qui nécessite le maintien de zones refuges (des zones exemptes de toxines de *Bt*). Les résultats de nos études montrent que les peuplements d'armoise et les massifs de houblon (sauvages ou cultivés) ne sont pas des refuges pour les pyrales issues du maïs. En l'absence de données sur les populations de pyrales colonisant d'autres plantes hôtes, il est donc nécessaire de maintenir une quantité suffisante de maïs conventionnel à proximité des maïs *Bt*.

## Mots clés

*Ostrinia nubilalis*, *Chrysomela tremulae*, *Bacillus thuringiensis*, races hôtes, phéromones sexuelles, résistance, maïs transgénique, peuplier transgénique

## Articles publiés dans des revues à comité de lecture, issus des travaux soutenus par l'ACI

- [1] Génissel, A., Viard F., Bourguet D., Population genetics of *Chrysomela tremulae*: a first step towards management of transgenic *Bacillus thuringiensis* poplars *Populus tremula* x *tremuloides*. Hereditas 133 (2000) 85-93.
- [2] Bourguet D., Génissel A., Raymond M., Insecticide resistance and dominance levels. J. Econ. Entomol. 93 (2000) 1588-1595.
- [3] Chaufaux J., Séguin M., Swanson J.J., Bourguet D., Siegfried BD, Chronic exposure of the European corn borer (Lepidoptera : Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin. J. Econ. Entomol. 94 (2001) 1564-1570.
- [4] Martel C., Réjasse A., Rousset F., Bethenod M.-T., Bourguet D., Host-plant associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. Heredity 90 (2003) 141-149.
- [5] Bourguet D., Chaufaux J., Séguin M., Buisson C., Hinton J.L., Stodola T.J., Porter P., Cronholm G., Buschman L.L., Andow D.A., Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. Theor. Appl. Genet. 106 (2003) 1225-1233.
- [6] Thomas Y., Bethenod M.-T., Pélozuelo L., Frérot B., Bourguet D., Genetic isolation between host plant races of the European corn borer I – sex pheromone, moth emergence timing and parasitism. Evolution 57 (2003) 261-273.
- [7] Génissel A., Augustin S., Courtin C., Pilate G., Lorme P., Bourguet D., Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bt* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. Proc. R. Soc. Lond. B. 270 (2003) 791-797.

- [8] Pélozuelo L., Malosse C., Genetier G., Guenego H., Frérot B., Host-plant specialization in pheromone strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in France. *J. Chem. Ecol.* 30 (2004) 335-352.
- [9] Bourguet D. 2004 Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the European corn borer: what chance for *Bt* maize? *Physiol. Entomol.* Sous presse.
- [10] Augustin S., Courtin C., Réjasse A., Lorme P., Génissel A., Bourguet D., Genetics of transgenic *Bacillus thuringiensis* poplar in the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* Sous presse.

## 1 Introduction

Un des risques environnementaux le plus souvent évoqué lors de l'utilisation des plantes transgéniques exprimant une toxine issue de la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* (ici dénommées plantes *Bt*), est la sélection d'insectes ravageurs résistants à cette toxine, c'est à dire d'augmenter, dans une population déterminée, la fréquence d'allèles de résistance [1]. Parmi les stratégies proposées pour retarder l'apparition de résistance dans les populations d'insectes cibles, celle qui est le plus souvent évoquée est appelée « haute-dose-refuge » (HDR) [2]. Elle propose de coupler des parcelles de plantes *Bt*, produisant une grande quantité de toxine, avec des parcelles de plantes non transformées, constituant la zone refuge. Cette stratégie repose notamment sur 3 conditions (i) les allèles de résistance doivent être rares dans les populations avant la mise en place des plantes *Bt*, (ii) les individus issus des plantes *Bt* doivent pouvoir se croiser avec les individus issus des zones refuges, et (iii) la résistance aux doses de *Bt* produites par les plantes *Bt* doit être récessive.

Nous avons évalué la fréquence initiale des allèles de résistance dans les populations naturelles de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner et de la chrysomèle du peuplier *Chrysomela tremulae* F. La découverte de lignées de chrysomèles résistantes aux toxines produites par les peupliers transgéniques *Bt* nous a permis d'étudier la génétique de cette résistance. Enfin nous avons étudié la structure génétique des populations de pyrales se nourrissant sur d'autres plantes hôtes que le maïs. Les populations se nourrissant sur le houblon (*Humulus lupulus* L.) et l'armoise (*Artemisia vulgaris* L.) étant différenciées de celles infestant le maïs (*Zea mays* L.) nous avons étudié plusieurs paramètres susceptibles d'engendrer un isolement reproducteur entre les individus issus de ces deux types de populations. Nous avons en particulier analysé la variabilité des phéromones sexuelles produites par les femelles et reconnues par les mâles. Cet article a pour objectif de faire la synthèse des principaux résultats des publications issus de l'ACI *Impact des OGM*.

## 2 Fréquences des allèles de résistance dans les populations naturelles de ravageurs

### 2.1 La méthode du F<sub>2</sub> screen

Andow et Alstad [3] ont proposé une méthode appelée *F<sub>2</sub> screen for rare resistance alleles*. Il s'agit d'établir, à partir d'individus échantillonnés en populations naturelles, des lignées isofemelles, de telle sorte que si l'un des parents d'une lignée est hétérozygote *R/S*, les descendants de la F<sub>2</sub> comporteront statistiquement 1/16 d'individus *R/R*. Ces derniers pourront être détectés par leur capacité à se développer à une dose de toxine trop importante pour permettre la survie des hétérozygotes. Ainsi, chaque lignée permet d'estimer si l'un des 4 allèles provenant des parents confère une résistance y compris à des doses pour lesquelles cette résistance est récessive. Des méthodes développées à partir de statistiques bayésiennes permettent d'estimer la fréquence avec un intervalle de confiance à 95% ainsi que la probabilité de détection des allèles de résistance dans les lignées isofemelles [3-5].

## 2.2 Estimation dans les populations de la pyrale du maïs

David Andow et son équipe ont réalisé des  $F_2$  screens sur *O. nubilalis* en 1996 (91 lignées, [6]), en 1997 (188 lignées, [7]), en 1999 (146 lignées, [8]), en 2000 (251 lignées, [8]) et en 2001 (21 lignées, [8]). Nous les avons rejoint dans cet effort en testant 328 lignées en 1999 et 483 en 2000. Ces lignées ont été établies à partir de papillons capturés dans le sud de la France près de Muret. Sur les deux années, aucune larve issue des  $F_2$  n'a survécu sur du maïs *Bt produisant la toxine cry1Ab*. Les probabilités cumulées montrent que la probabilité de détection était  $> 80\%$  dans la plupart des lignées testées ; la probabilité moyenne de détection d'un allèle de résistance était de  $96\%$  en 1999 et de  $89\%$  en 2000.

En 1999, la fréquence des allèles de résistance était donc  $< 7,6 \times 10^{-4}$  avec un intervalle de confiance à  $95\%$  de  $[0 - 2,2 \times 10^{-3}]$ . En 2000 cette fréquence était  $< 5 \times 10^{-4}$  avec un intervalle de confiance à  $95\%$  de  $[0 - 1,5 \times 10^{-3}]$ . Les deux échantillonnages ayant été réalisés à proximité l'un de l'autre et les populations de pyrale du sud de la France formant une unité panmictique [9] nous pouvons faire une analyse globale des résultats. Ainsi, l'absence de lignées résistantes parmi les 811 lignées testées indique que la fréquence dans la population échantillonnée est inférieure à  $3,1 \times 10^{-4}$  avec un intervalle de confiance à  $95\%$   $[0 - 9,2 \times 10^{-4}]$  (table I, [8]). Une estimation plus conservatrice peut être faite en ne tenant compte que des lignées pour lesquelles la probabilité de détection de l'allèle de résistance était  $> 90\%$ . Ce nombre de lignées est de 595 ce qui donne une fréquence  $< 4,2 \times 10^{-4}$  avec un intervalle de confiance  $[0 - 1,3 \times 10^{-3}]$  et une probabilité de détection moyenne sur l'ensemble des lignées de  $97\%$ . En d'autres termes, la fréquence était inférieure à  $1,26 \times 10^{-3}$  avec une probabilité de  $95\%$  associé à une probabilité moyenne de détection de  $97\%$ . Aucune lignée positive n'ayant été détectée sur l'ensemble des  $F_2$  screens réalisés par l'équipe de David Andow, nous avons estimé que la fréquence dans les populations du nord de la Corn Belt américaine est inférieure à  $4,2 \times 10^{-4}$ , avec un intervalle de confiance  $[0 - 1,3 \times 10^{-3}]$  (table I, [8]). Dans leur cas la probabilité moyenne de ne pas avoir détecté un allèle de résistance était  $< 10\%$ .

En compilant les résultats de l'équipe animée par David Andow et ceux que nous avons obtenus, près de 1500 lignées de pyrale ont été testées. L'absence de lignées résistantes suggère que chez la pyrale du maïs les allèles conférant une résistance aux doses de toxines Cry1Ab (i.e. aux doses produites par les maïs transgéniques utilisés lors de ces expériences) sont initialement à des fréquences  $< 10^{-3}$ . Au vu de ces résultats l'effort des recherches pour estimer les fréquences des allèles de résistance aux toxines de *Bt* dans les populations d'*O. nubilalis* ne s'est pas poursuivi. Nous avons alors porté notre effort sur un deuxième ravageur, la Chrysomèle du tremble.

## 2.3 Estimation dans les populations de la chrysomèle du tremble

Des peupliers transgéniques produisant la toxine Cry3Aa de *B. thuringiensis* ont été mis au point à l'INRA d'Orléans. La quantité de toxine Cry3Aa produite par les feuilles est suffisante pour tuer les larves de la chrysomèle du tremble *Chrysomela tremulae* se nourrissant de ces feuilles [10]. Des échantillonnages réalisés à Vatan dans la région Centre de la France ont permis la mise en place de 179 lignées isofemelles en 1999, 51 lignées en 2000 et 300 lignées en 2001. A partir de ces 530 lignées isofemelles nous avons pu obtenir 270 descendance  $F_2$ . Trois descendance contenaient des individus qui ont réussi à se développer sur du feuillage de peuplier transgénique. La proportion de ces individus résistants indique que dans chacune de ces lignées l'un des parents était hétérozygote pour un allèle de résistance aux toxines de *Bt*. La probabilité de détection d'un allèle de résistance était, sur l'ensemble des lignées, supérieure à  $95\%$ . La fréquence globale de l'allèle de résistance est de  $3,7 \times 10^{-3}$ , avec un intervalle de confiance à  $95\%$  compris entre  $4,5 \times 10^{-4}$  et  $8 \times 10^{-3}$  (table I, [11]).

Dans une population naturelle prélevée à Bar de Duc, nous avons estimé que la fréquence du même allèle de résistance était proche de la population de Vatan localisée à plus de 500 km. Cette deuxième estimation de la fréquence des allèles de résistance aux peupliers *Bt* confirme que ces fréquences peuvent être initialement – i.e., avant l'introduction de pressions sélectives par l'homme – fortes dans les populations naturelles de ce ravageur.

## 2.4 Conclusions

Les résultats des expériences entreprises sur la pyrale du maïs sont conformes aux attendus théoriques : initialement – i.e. avant que les populations ne soient exposées aux toxines de *Bt* – les allèles de résistance sont apparemment à de faibles fréquences. Les estimations réalisées par Bentur *et al.* [11] sur un autre lépidoptère ravageur du riz, *Scirpophaga incertulas*, soutiennent également cette conclusion. Cependant dans les populations de deux papillons ravageurs du cotonnier, *Heliothis virescens* et *Pectinophora gossypiella*, des fréquences initiales de  $10^{-2}$  ont été détectées par Gould *et al.* [13] et Tabashnik *et al.* [14]. Dans ces deux exemples l'explication la plus probable est une immigration d'individus résistants sélectionnés dans des régions géographiques où des épandages de formulations contenant des toxines et des spores de *Bt* ont été réalisés par le passé.

Les expériences que nous avons réalisées montrent que la fréquence initiale d'un allèle de résistance aux toxines de *Bt* est également importante dans les populations de la chrysomèle du tremble. Cette forte fréquence est surprenante pour plusieurs raisons : (i) l'allèle de résistance est apparemment associé à un coût de la résistance, (ii) les peupliers transgéniques n'ont jamais été plantés en dehors des serres du laboratoire de l'INRA d'Orléans situé à plus de 100 km des sites d'échantillonnage et (iii) les peupleraies dans lesquelles se nourrissent les populations de *C. tremulae* – les chrysomèles étant monophages – ne sont pas traitées par des toxines de *Bt*. L'hypothèse que nous formulons est que des souches de *Bt* produisant des toxines Cry3Aa – ou d'autres toxines dans le cas de résistances croisées – sont naturellement présentes dans les peupleraies. En conclusion il semble difficile de prédire la fréquence initiale des mutations conférant une résistance aux toxines de *Bt*. Les taux de mutation, les pressions de sélection qui ont lieu directement – ou par effets d'auto-stop – dans la population considérée ou dans des populations adjacentes ainsi que l'intensité des flux géniques entre les différentes populations sont autant de paramètres qui vont venir modifier la capacité des individus d'une population à réagir à une modification de l'environnement. Partir de l'hypothèse que les allèles de résistance sont initialement rares relève d'une vision optimiste mais pas nécessairement réaliste.

## 2 Génétique de la résistance de la chrysomèle du tremble à la toxine Cry3Aa

Le déterminisme de la résistance de la chrysomèle du tremble a été étudié à partir d'une souche issue d'une des trois lignées isofemelles résistantes obtenues lors du  $F_2$  screen réalisé sur la population de Vatan. Cette souche, capable de se développer totalement sur le feuillage des peupliers exprimant la toxine cry3Aa, a présenté un niveau de résistance très élevé (supérieur à 6400 fois), un des plus forts actuellement observés en dehors de toute utilisation d'insecticide en condition naturelle [15].

D'après nos estimations, la dose de toxine de Cry3Aa produite par les peupliers *Bt* est 6,34 fois supérieure à la  $LC_{99}$  des hybrides  $F_1$ . Les doses de toxines de *Bt* produites par les peupliers transgéniques sont donc suffisamment importantes pour tuer l'ensemble des hétérozygotes. Ces résultats valident, pour ce modèle biologique, l'une des conditions de la réussite de la stratégie HDR à savoir la complète récessivité de la résistance [2]. Par ailleurs les croisements entre individus sensibles, résistants et les hybrides  $F_1$  ont montré que la résistance était monogénique et autosomale ([16] ; figure II). Le mécanisme de résistance sous-jacent n'a pas encore été déterminé, mais il est probable que la perte de sensibilité soit due à une modification au niveau du récepteur membranaire.

## 3 Différenciation des populations de pyrale prélevées sur différentes plantes hôtes

Nous avons pu mettre en évidence que, en France, la présence de la pyrale sur armoise se situe principalement dans un bassin comprenant l'Île de France, la Picardie et le Nord-Pas-de-Calais [17]. L'aire de répartition de la pyrale sur le maïs est différente. En effet, les attaques d'*O. nubilalis* sur cette culture ont toujours été détectées sur la majeure partie du territoire. Sur la moitié nord de la France, nous

avons prélevé 16 populations sur armoise dans le but de comparer la structure génétique de ces populations à 9 autres populations préalablement échantillonnées. L'analyse hiérarchique de l'ensemble des populations révèle une différenciation génétique inter-plante hôte significative [17, 18].

Jusqu'à présent, les différentes études entreprises sur la pyrale avaient permis de distinguer deux couples de races. Le premier couple se distingue par des différences de voltinisme, c'est à dire du nombre de générations par an. La pyrale du maïs se divise ensuite en deux races phéromonales. L'une est désignée sous le nom de race Z car les femelles produisent 97% de cis acétoxy-1-tétradécène $\Delta$ 11 et 3% de l'isomère trans du même composé. Dans la seconde race, appelée E, les femelles produisent les mêmes composés mais en proportion inverse. Les résultats que nous avons obtenus révèlent que les plantes hôtes permettent un troisième niveau de différenciation entre les populations de pyrale. Il est à noter qu'une divergence génétique entre des populations colonisant des plantes hôtes variées avait déjà été mise en évidence dans d'autres familles de papillons de nuit tels que les Noctuidae [19], les Tortricidae [20] ou encore les Prodoxidae [21]. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'isolement reproducteur entre les deux races hôte de la pyrale, nous avons mené une expérience nous permettant d'analyser deux facteurs susceptibles d'engendrer de l'homogamie : le système de communication chimique et les dates d'émergence des adultes issus de l'armoïse et du maïs.

### 3.1 Plan d'expérimentation

Les expériences ont été conduites à partir d'échantillons prélevés sur le site INRA de Thiverval-Grignon dans la région Ile-de-France. Ce site présente une enclave d'environ 400 m<sup>2</sup> dans laquelle poussent de nombreux pieds d'armoïse (*A. vulgaris*). Cette enclave est entourée de champs de maïs. Ce site est particulièrement intéressant puisque les deux plantes hôtes, présentes en sympatrie, sont fortement infestées par la pyrale du maïs. Plus de 1600 cannes de maïs et autant d'armoïse, présentant des dégâts caractéristiques des larves diapausantes de pyrale du maïs, ont été récoltées. Les cannes de chaque plante hôte furent divisées en trois lots. Les cannes du premier lot ont été ouvertes permettant la récolte de larves diapausantes. Les analyses électrophorétiques effectuées sur ces larves ont confirmé la présence d'une différenciation génétique entre ces deux populations sympatriques. Un deuxième lot d'environ 1000 cannes fut laissé à l'extérieur, recouvert d'un filet empêchant qu'elles soient détruites ou disséminées, et ce, afin d'observer les dates d'émergences *in natura*. Enfin la composition des phéromones produites par les femelles issues du dernier lot de cannes a été analysée. Le protocole détaillé de cette expérience est donné dans Thomas *et al.* [22].

### 3.2 Allochronie des émergences des adultes

Les papillons issus des tiges d'armoïse du troisième lot ont émergé en moyenne 10 jours plus tôt que ceux provenant des cannes de maïs (figure II). Cette différence favorise donc les croisements entre les mâles et les femelles se développant sur la même plante hôte – autrement dit un degré non négligeable d'homogamie – puisque la durée de vie de la pyrale du maïs, bien qu'elle ne soit pas connue avec précision, semble être de l'ordre de 10 à 15 jours [23]. Un écart dans les dates d'émergence avait déjà été mis en évidence entre les races hôtes des papillons *Spodoptera frugiperda* [24] et *Prodoxus quinquepunctellus* [21] ou encore de la mouche *Rhagoletis pomonella* [25]. Chez cette dernière, les mouches colonisant le pommier émergent dix jours plus tôt que celles colonisant l'aubépine, ceci étant sélectionné par une maturation plus précoce des pommes (trois semaines plus tôt que les fruits de l'aubépine) [25]. Il est possible que chez la pyrale, l'écart entre les dates d'émergence soit également lié à des différences de phénologie des plantes hôtes, l'armoïse étant favorable à la ponte de la pyrale plus précocement que le maïs.

Lors de la levée de diapause *in natura*, nous avons noté une différence entre le temps moyen d'émergence des deux sexes : dans les deux populations, les mâles émergent 4 jours plus tôt que les femelles. Ces différences engendrent une asymétrie dans les possibilités de croisements inter-race en faveur de croisements entre les mâles des populations se développant sur le maïs et les femelles issues de l'armoïse. En effet l'écart moyen d'émergence entre eux est de 6 jours alors que les femelles du maïs émergent en moyenne 14 jours plus tard que les mâles de l'armoïse. Cependant, les croisements dans les deux sens restent possibles car on assiste à des émergences de mâles et de femelles tout au long de la période d'émergence dans les deux races (voir figure II).

### 3.3 Association entre race-hôte et populations phéromonales

Nous avons vu que la pyrale du maïs se divise en deux races phéromonales, l'une désignée sous le nom de race Z, l'autre appelée E. Les analyses effectuées sur les femelles issues du dernier lot de cannes indiquent que les deux populations n'appartiennent pas à la même race phéromonale : les femelles issues des larves collectées sur l'armoise appartiennent à la race E tandis que les femelles issues des cannes de maïs appartiennent à la race Z [22].

Dans une étude complémentaire des populations ont été collectées sur armoise, houblon et maïs sur l'ensemble du territoire [26]. Pour chaque population nous avons analysé les phéromones émises par les femelles et le type de phéromone (E ou Z) responsable de l'attraction des mâles. La relation entre race-hôte et phérotypage fut presque parfaite. En effet, sur les 176 femelles analysées provenant du maïs, seule une n'était pas de phérotypage Z. Inversement sur les 170 provenant du houblon ou de l'armoise, seules deux n'étaient pas de phérotypage E. Ces trois femelles particulières étaient vraisemblablement des hybrides (le ratio des isomères E:Z était de l'ordre de 55:45). Les résultats sur les mâles étaient moins précis en raison de la technique utilisée (tunnel de vol) mais ils renforcent les conclusions obtenues à partir de l'analyse des phéromones produites par les femelles. Nous pouvons donc conclure à l'issue de cette analyse que la race armoise utilise une phéromone de type E et la race maïs une phéromone de type Z.

## 4 Conclusions

La chrysomèle du tremble présente un avantage considérable pour étudier l'impact des OGM puisque la résistance sélectionnée est l'une des rares à être suffisamment élevée pour permettre la survie des homozygotes résistants sur une plante *Bt*. Les résultats obtenus sur ce ravageur du peuplier sont inquiétants et rassurants à la fois. Inquiétants, car ils confirment que dans les populations des ravageurs cibles des toxines produites par les plantes *Bt*, les allèles de résistance peuvent être à des fréquences initialement élevées. Rassurants, car la résistance est récessive : les hétérozygotes sont clairement incapables de se développer sur les peupliers *Bt* produisant de fortes doses de toxine Cry3Aa. Cette caractéristique est favorable aux stratégies de gestion de la résistance telle que la stratégie hautes doses refuges. Les allèles sélectionnés dans de nombreuses autres espèces confèrent une résistance beaucoup trop faible pour permettre le développement complet de l'insecte sur sa plante hôte transgénique *Bt*. C'est le cas pour la pyrale du maïs : les différentes souches résistantes sélectionnées à ce jour ne permettent pas l'étude des caractéristiques de la résistance aux maïs *Bt*. Nous avons donc consacré une grande partie de nos études à l'analyse des populations de ce ravageur.

La pyrale a colonisé le maïs suite à son introduction sur le continent européen au cours du 16<sup>ième</sup> siècle. Nous avons mis en évidence que les populations sur maïs sont génétiquement différenciées de leurs homologues sur armoise. Les résultats de nos études permettent d'avancer que le système de communication chimique pourrait être un des moteurs de cette différenciation qui ne s'est pas encore accompagnée d'une différenciation morphologique des individus des deux races. Ceci explique que la pyrale a longtemps été considérée comme une espèce polyphage alors qu'elle est apparemment un complexe de plusieurs races, voire d'espèces jumelles, se nourrissant sur des plantes-hôtes variées. La séparation – partielle et éventuellement totale – de ces entités a d'importantes implications en terme de gestion et de contrôle de ce ravageur des cultures. Nous avons vu que, toutes les stratégies visant à réduire la vitesse de sélection des allèles de résistance aux maïs *Bt* mettent l'accent sur l'importance de maintenir des zones refuges – i.e. des zones exemptes de toxines *Bt* permettant le maintien d'un pool d'individus sensibles à ces toxines. Nos résultats montrent que les houblonnières, les massifs de houblon sauvage et les peuplements d'armoise ne peuvent pas constituer de tels refuges, et que la mise en place de maïs transgéniques doit obligatoirement s'accompagner de parcelles de maïs non transgénique et non traité.

## 5 Remerciements

Nous tenons à remercier le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie pour avoir assuré une partie du financement de ces recherches dans le cadre de l'ACI "Impact des OGM".



## 6 Références bibliographiques

- [1] Wolfenbarger L.L., Phifer P.R., Biotechnology and ecology – The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science* **290** (2000) 2088-2093.
- [2] Alstad D.N., Andow D.A., Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* **268** (1995) 1894-1896.
- [3] Andow D.A., Alstad D.N., F-2 screen for rare resistance alleles. *J. Econ. Entomol.* **91** (1998) 572-578.
- [4] Andow D.A., Alstad D.N., Credibility interval for rare resistance allele frequencies. *J. Econ. Entomol.* **92** (1999) 755-758.
- [5] Schneider J.C., Confidence interval for Bayesian estimates of resistance allele frequencies. *J. Econ. Entomol.* **92** (1999) 755.
- [6] Andow D.A., Alstad D.N., Pang Y.H., Bolin P.C., Hutchinson W.D., Using an F-2 screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* **91** (1998) 579-584.
- [7] Andow D.A., Olson D.M., Hellmich R.L., Alstad D.N., Hutchison W.D., Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera : Crambidae). *J. Econ. Entomol.* **93** (2000) 26-30.
- [8] Bourguet D., Chaufaux J., Séguin M., Buisson C., Hinton J.L., Stodola T.J., Porter P., Cronholm G., Buschman L.L., Andow D.A., Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theor. Appl. Genet.* **106** (2003) 1225-1233.
- [9] Bourguet D., Bethenod M.-T., Pasteur N., Viard F., Gene flow in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: implications for the sustainability of transgenic insecticidal maize. *Proc. R. Soc. London B*, **267** (2000) 117-122.
- [10] Génissel A., Leplé J.-C., Millet N., Augustin S., Jouanin L., Pilate G., High tolerance against *Chrysomela tremulae* of transgenic poplar plants expressing a synthetic cry3aA gene from *Bacillus thuringiensis* ssp *tenebrionis*. *Mol. Breeding.* **11** (2003) 103-110.
- [11] Génissel A., Augustin S., Courtin C., Pilate G., Lorme P., Bourguet D., Initial frequency of alleles conferring resistance to Bt poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **270** (2003) 791-797.
- [12] Bentur J.S., Andow D.A., Cohen M.B., Romena A.M., Gould F., Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippine population of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **93** (2000) 1515-1521.
- [13] Gould F., Anderson A., Jones A., Sumerford D., Heckel D.G., Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 3519-3523.
- [14] Tabashnik B.E., Patin A.L., Dennehy T.J., Liu Y.B., Carrière Y., Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000) 12980-12984.
- [15] Ferré J., Van Rie J., Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* **47** (2002) 501-533.
- [16] Augustin S., Courtin C., Réjasse A., Lorme P., Génissel A., Bourguet D., Genetics of transgenic *Bacillus thuringiensis* poplar in the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* Sous presse.
- [17] Martel C., Réjasse A., Rousset F., Bethenod M.-T., Bourguet D., Host-plant associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. *Heredity* **90** (2003) 141-149.
- [18] Bourguet D., Bethenod M.-T., Trouvé C., Viard, F., Host-plant diversity of the European corn borer

*Ostrinia nubilalis*: what value for sustainable transgenic insecticidal *Bt* maize? Proc. R. Soc. London B 267 (2000) 1177-1184.

[19] Pashley D.P., Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? Ann. Entomol. Soc. Am. 79 (1986) 898-904.

[20] Emelianov I., Mallet J., Baltensweiler W., Genetic differentiation in *Zeiraphera diniana* (Lepidoptera, Tortricidae, the larch budmoth): polymorphism, host races or sibling species. Heredity 75 (1995) 416-424.

[21] Groman J.D., Pellmyr O., Rapid evolution and specialization following host colonization in a yucca moth. J. Evol. Biol. 13 (2000) 223-236.

[22] Thomas Y., Bethenod M.-T., Pélozuelo L., Frérot B., Bourguet D., Genetic isolation between host plant races of the European corn borer I – sex pheromone, moth emergence timing and parasitism. Evolution 57 (2003) 261-273.

[23] Fadamiro H.Y., Baker T.C., Reproductive performance and longevity of female European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: effects of multiple mating, delay in mating, and adult feeding. J. Insect Physiol. 45 (1999) 385-392.

[24] Pashley, D.P., Hammond A.M., Hardy T.N., Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 85 (1992) 400-405.

[25] Feder, J.L., Filchak K.E., It's about time: the evidence for host plant-mediated selection in the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*, and its implications for fitness trade-offs in phytophagous insects. Entomol. Exp. Appl. 91 (1999) 211-225.

[26] Pélozuelo L., Malosse C., Genetier G., Guenego H., Frérot B., Host-plant specialization in pheromone strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in France. J. Chem. Ecol. 30 (2004) 335-352.

## Légendes des figures

**Figure I.** Courbes de mortalité obtenues lors des tests de toxicité à la toxine Cry3Aa sur des larves de la souche sensible de *C. tremulae* (○), sur les hybrides entre cette souche sensible et la souche résistante (□) et sur les deux rétrocroisements possibles entre ces hybrides et la souche résistante ([▼] et [▲]). La courbe de mortalité de la souche résistante n'a pu être établie ; même aux doses de toxine les plus importantes, la mortalité des larves de cette souche était < 20%.

**Figure II.** Date d'émergence des pyrales issues des cannes de maïs et des tiges d'armoise. Les flèches indiquent les dates moyennes d'émergence des tiges d'armoise (flèche vide) et des cannes du maïs (flèche pleine). Les deux dates moyennes d'émergence sont séparées de 10 jours.

**Table I.** Estimation des fréquences initiales des allèles de résistance aux toxines de *B. thuringiensis* produites par les maïs transgéniques (pour la pyrale du maïs *O. nubilalis*) et par les peupliers transgéniques (pour la chrysomèle du tremble *C. tremulae*). La probabilité de détection correspond à la moyenne des probabilités de détecter un allèle de résistance dans chaque lignée.

Espèce	Localisation	Années	Nbre lignées isofemelles	Fréquence des allèles de résistance	Intervalle de confiance à 95%	Probabilité de détection	Références
<i>O. nubilalis</i>	Muret Sud-Ouest de la France	1999 – 2000	811	$< 3,1 \times 10^{-4}$	$0 - 9,2 \times 10^{-4}$	80%	[8]
	Nord de la Corn Belt Américaine	1998 – 2001	589	$< 4,2 \times 10^{-4}$	$0 - 1,3 \times 10^{-3}$	90%	[8]
<i>C. tremulae</i>	Orléans Centre de la France	2000 – 2001	270	0,0037	0,00045 – 0,0080	90%	[11]

Figure I

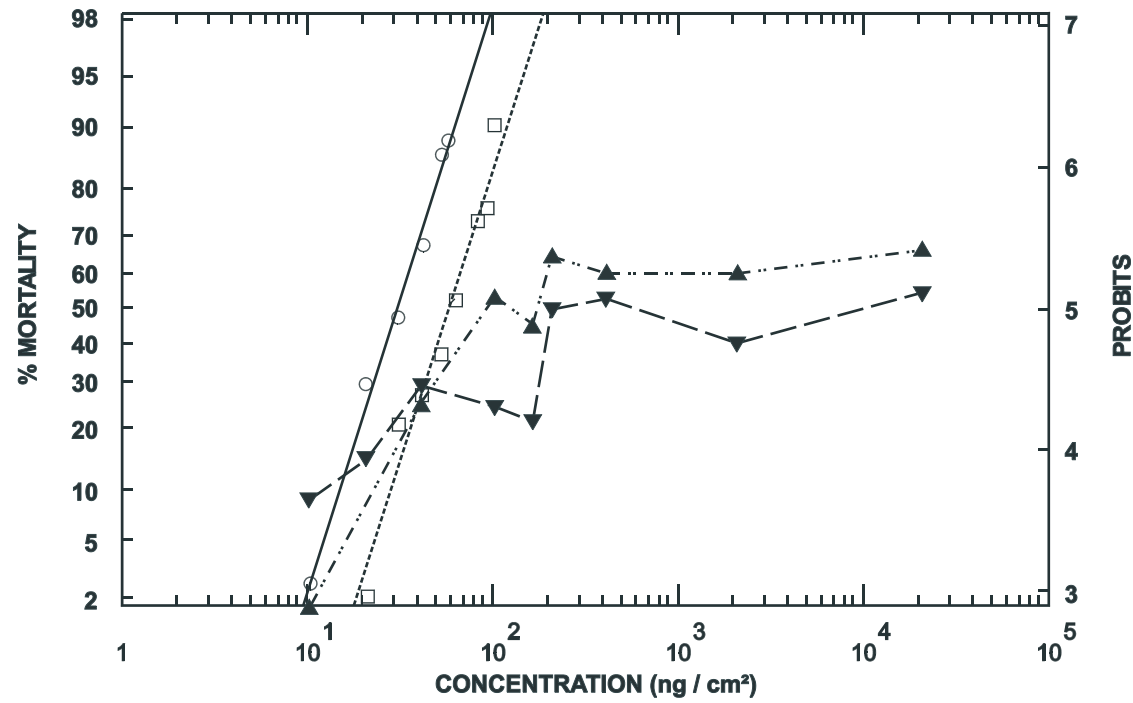


Figure II

