

PYRALE DU MAÏS ET MAÏS TRANSGENIQUE BT : SELECTION ET GESTION DE LA RESISTANCE

MANAGEMENT OF BT MAIZE: SELECTION OF RESISTANT STRAINS AND GENE FLOW AMONG EUROPEAN CORN BORER POPULATIONS

D. BOURGUET, J. CHAUFaux

INRA, Unité de Recherches de Lutte biologique, La Minière, 78285 Guyancourt Cedex

RESUME

La gestion des maïs transgéniques produisant des toxines de *Bacillus thuringiensis* (maïs Bt) est nécessaire pour diminuer, voire éviter, la sélection d'allèles de résistance à ces toxines, dans les populations de son principal ravageur qu'est la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hübner. La mise en place de cette gestion nécessite l'estimation de paramètres tels que la dominance de la résistance, la fréquence initiale des allèles de résistance et les capacités de migration de ce ravageur. La sélection d'une population de la pyrale du maïs à l'une des toxines exprimées dans le maïs transgénique a été entreprise. Le plus fort rapport de résistance entre lignée sélectionnée et lignée sensible a été de 32, après plus de 35 générations soumises à différents protocoles de sélection. Ce niveau de résistance est insuffisant pour permettre aux larves de la pyrale de se développer sur du

maïs Bt. La fréquence initiale des allèles de résistance au maïs Bt a été étudiée au cours de 2 années consécutives, par l'analyse de la descendance de plus de 800 lignées isofemelles. L'absence de lignée résistante indique que la fréquence dans la population étudiée était inférieure à 3.08×10^{-4} . Enfin, l'étude des flux géniques entre et au sein de populations de pyrale du maïs montre qu'il existe un important flux génique au sein et entre les populations des différentes régions, sur l'ensemble du territoire français. La faible fréquence des allèles de résistance et l'importance de la dispersion dans les populations sont des atouts favorables pour une bonne gestion de la résistance. Toutefois, les caractéristiques génétiques de la résistance, essentielles dans le cadre de cette gestion, demeurent inconnues.

SUMMARY

Effective management of transgenic crops producing Bacillus thuringiensis (Bt) insecticidal proteins is necessary to delay the evolution of Bt resistance in the natural pest populations targeted by these toxins. The high-dose plus refuge strategy is used to manage Bt maize, which produces Bt toxins active

against the European corn borer (ECB), Ostrinia nubilalis Hübner (Lepidoptera: Crambidae). Implementation of this strategy requires the assessment of various parameters, including the dominance level of Bt resistance, the initial frequency of alleles conferring resistance to Bt toxins, and gene

flow within and between ECB populations. An ECB strain displaying some resistance was selected with the Cry1Ab Bt toxin. Forty-two consecutive generations were selected and the highest level of resistance was obtained in generation 39 (32-fold). This level of resistance was insufficient for the development of larvae of this strain on Bt maize. The initial frequency of Bt resistance alleles was studied in two consecutive years in natural populations of O. nubilalis. More than 800 isofemale lines of O. nubilalis collected in south-west France were screened for susceptibility to Bt maize. No resistant line was obtained, indicating that the

initial frequency of alleles conferring resistance to Bt maize was $< 3.08 \times 10^{-4}$ in this geographical area. Finally, genetic variability within and between ECB populations collected throughout France was studied revealing a high level of gene flow between populations. The low frequency of Bt resistance alleles coupled with the substantial dispersion suggested by gene flow analysis are good news for the management of Bt maize. However, our inability to select a strain of ECB truly resistant to Bt maize precludes the genetic characterisation of Bt resistance on this pest.

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 (Wolfenbarger & Phifer, 2000). 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) (Alstad & Andow, 1995). 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 sur trois 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 doit être récessive. Nous avons tenté d'évaluer si ces trois conditions étaient remplies dans le cas de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner. Pour ce faire, nous avons tout d'abord sélectionné une lignée de pyrales résistantes à la toxine Cry1Ab avec l'objectif d'estimer la dominance de la résistance à cette toxine. Nous avons ensuite évalué la fréquence initiale des allèles de résistance dans des populations sauvages du ravageur. Enfin nous avons étudié la structure génétique des populations de pyrales afin d'obtenir des indications quant aux capacités de dispersion de ce papillon.

SELECTION D'UNE LIGNEE RESISTANTE A LA TOXINE CRY1AB

Trois populations de pyrales originaires de Suisse, d'Alsace et des Landes ont été sélectionnées durant 30 générations par ingestion de milieu artificiel traité en surface. Les populations initiales utilisées pour constituer des lignées étaient de l'ordre de 150 à 300 individus. Pour chaque population, 20 répétitions de 50 larves du 1^{er} stade ont été traitées individuellement, avec une suspension de spores et de cristaux de *B. thuringiensis* exprimant la toxine Cry1Ab, à une dose provoquant une mortalité supérieure à 70 %. Après 30 générations sans avoir pu mettre en évidence une résistance stable, nous avons regroupé ces 3 populations pour n'en faire qu'une, appelée LAS. La souche LAS fut soumise aux mêmes conditions de sélection pendant 6 générations supplémentaires. À la 7^e génération, une sélection massale a été entreprise avec une dose de toxine donnant plus de 90 % de mortalité, ceci pendant 12 générations. Après 2 générations de sélection massale, le ratio de résistance entre la lignée traitée et la lignée non traitée, élevée en parallèle, était de 5 fois et significativement différent de 1. Ce ratio a atteint 32 fois (avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre 16 et 66) à la 9^e génération avant de fluctuer autour d'une valeur moyenne de 15 à 20. Les résultats de cette sélection et la variabilité de la résistance suggèrent qu'elle est polygénique, chaque gène de résistance ne conférant par lui-même qu'un très faible niveau de résistance. Ces résultats sont similaires à ceux déjà publiés sur la pyrale du maïs par Huang *et al.* (1997) et Bolin *et al.* (1999) et démontrent que la variabilité génétique présente dans les populations de pyrale est suffisante pour permettre la sélection de faibles niveaux de résistance. Ces niveaux de résistance ne sont toutefois pas suffisants pour permettre la survie des larves sur du maïs transgénique. Par conséquent, nous n'avons pas jugé pertinent d'étudier la génétique de cette résistance. La dominance de la résistance conférée par des mécanismes permettant la survie des larves de pyrale sur les maïs transgéniques reste à ce jour inconnue.

FREQUENCE DES ALLELES DE RESISTANCE DANS LES POPULATIONS NATURELLES

Andow et Alstad (1998) ont proposé une méthode appelée *F₂ 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 *F₂* comporteront statistiquement 1/16 d'individus *R/R* qui pourront être détectés par leur capacité à se développer à une dose de toxine trop importante pour permettre la survie des hétérozygotes (Figure 1).

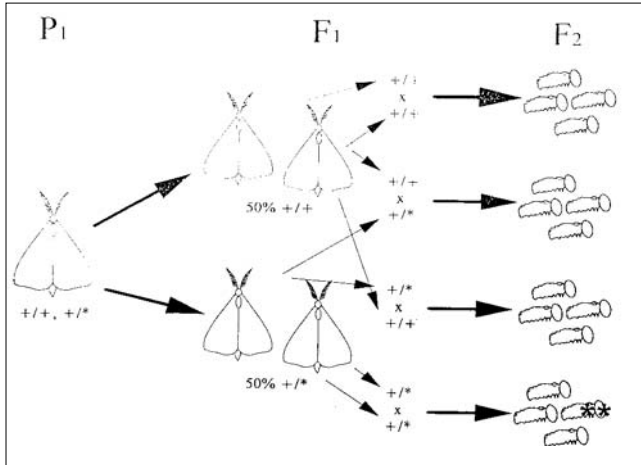


Figure 1. *F₂ screen for a rare resistance allele (*).* Chaque lignée isofemelle est mise en place à partir d'une femelle fécondée par un mâle, capturés directement en population naturelle (P₁). Si l'un des deux parents est hétérozygote pour l'allèle de résistance (i.e. de génotype +/*), la fréquence des larves */* lors de la deuxième génération sera de 1/16. D'après Andow & Alstad (1998).

Ainsi, chaque lignée permet d'estimer si l'un des 4 allèles provenant des parents confère une résistance, y compris pour des doses pour lesquelles cette résistance est récessive. Des méthodes d'estimation bayésienne permettent d'estimer la fréquence avec un intervalle de confiance à 95 % (Andow & Alstad 1998, 1999 ; Schneider, 1999).

David Andow et son équipe ont réalisé des *F₂ screen* sur *O. nubilalis* en 1996 (91 lignées ; Andow *et al.*, 1998), en 1997 (188 lignées ; Andow *et al.*, 2000), en 1999 (122 lignées) et en 2000 (237 lignées). Nous les avons rejoints 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.

Sur les deux années, aucune larve issue des *F₂* n'a survécu sur du maïs *Bt* ou à des doses équivalentes à celles produites par ces maïs. Les probabilités cumulées (Figure 2) montrent que la probabilité de détection était supérieure à 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.

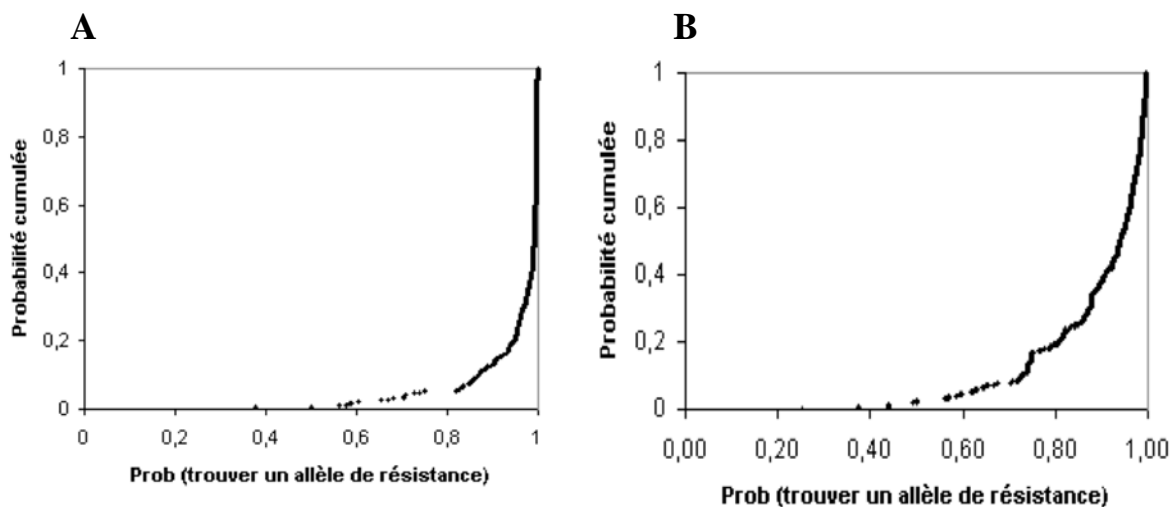


Figure 2. Probabilité cumulée des probabilités de détecter un allèle de résistance dans les lignées isofemelle testées en 1999 (A) et en 2000 (B).

En 1999, la fréquence des allèles de résistance était inférieure à $7,6 \times 10^{-4}$ avec un intervalle de confiance à 95 % de $[0 - 2,2 \times 10^{-3}]$. En 2000, cette fréquence était inférieure à 5×10^{-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 (voir ci-dessous), nous pouvons faire une analyse globale des résultats. Ainsi, l'ensemble des 811 lignées testées indique que la fréquence dans la population échantillonnée est inférieure à $3,08 \times 10^{-4}$ avec un intervalle de confiance à 95 % $[0 - 9,21 \times 10^{-4}]$. 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 supérieure à 90 %. Ce nombre de lignées est de 595 ce qui donne une fréquence inférieure à $4,21 \times 10^{-4}$ avec un intervalle de confiance $[0 - 1,26 \times 10^{-3}]$ 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 % et ce, associé à une probabilité moyenne de détection de 97 %.

FLUX GENIQUES AU SEIN ET ENTRE LES POPULATIONS

L'analyse des flux géniques au sein et entre les populations de pyrale a été réalisée à partir d'un échantillonnage hiérarchique de 29 localités sur l'ensemble du territoire français. La variabilité génétique des 29 localités a été étudiée en analysant le polymorphisme de 6 *loci* enzymatiques : *Tpi*, *Aat*, *Pgi*, *Pgm*, *Mpi* et *Hbdh*.

Suivant les *loci*, entre 4 et 8 allèles ont été trouvés sur l'ensemble des localités permettant ainsi une analyse génétique de ces populations. Il n'existe pas de déséquilibre de liaison entre les *loci*, et la moyenne du nombre d'allèles sur l'ensemble des *loci* varie entre 2.2 et 4. Il n'y pas de différence significative entre l'hétérozygotie observée et attendue à chaque *locus*, et les populations sont à l'équilibre d'Hardy-Weinberg sur l'ensemble des *loci* ; ceci indique vraisemblablement un croisement aléatoire des individus dans les champs de maïs.

Six localités ont été échantillonnées plusieurs années de suite. La comparaison de ces échantillons ne montre pas de variation significative des fréquences alléliques indiquant une forte stabilité de la structure génétique au cours du temps. Bien que hautement significative ($P < 10^{-5}$) la différenciation entre les populations est extrêmement faible ($\hat{\theta} = 0,011$ sur l'ensemble de la France). Les localités peuvent être réparties en trois sous-groupes : sud, nord-est et nord-ouest. La différenciation entre les populations de chaque région est là encore très faible ($0,003 < \hat{\theta} < 0,015$) et n'est pas significative dans le sud de la France. Enfin l'isolement génétique en fonction de la distance géographique des populations n'est significatif que dans le nord-ouest de la France ce qui peut être la conséquence d'un morcellement plus important des champs de maïs.

Ces résultats indiquent que le sud de la France représente une unité panmictique et qu'il existe un important flux génique au sein et entre les populations des différentes régions sur l'ensemble du territoire français (Bourguet *et al.*, 2000).

L'intense flux de gènes entre les populations a deux effets potentiels : il peut engendrer une migration des allèles de résistance sur une large échelle géographique, mais il peut également limiter la sélection d'allèles de résistance au niveau local par la migration d'individus sensibles issus des zones refuges. Ces résultats n'assurent pas qu'il y aura un croisement aléatoire entre des individus homozygotes résistants sélectionnés dans les parcelles de maïs *Bt* et des papillons homozygotes sensibles provenant des zones refuges. L'allèle de résistance peut, par exemple, réduire la vitesse de développement larvaire des pyrales comme dans le cas du papillon *Pectinophora gossypiella* (Liu *et al.*, 1999). Enfin, ces études de flux génique devront à l'avenir tenir compte du fait que la pyrale peut se développer sur de nombreuses plantes hôtes et qu'il existe une variabilité de son système de communication chimique.

REFERENCES

- Alstad D.N., Andow D.A., 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, 268, 1894-1896.
- Andow D.A., Alstad D.N., 1998. F_2 screen for rare resistance alleles. *J. Econ. Entomol.*, 91, 572-578.
- Andow D.A., Alstad D.N., 1999. Credibility interval for rare resistance allele frequencies. *J. Econ. Entomol.*, 92, 755-758.

- Andow D.A., Alstad D.N, Bolin P.C., Hutchison W.D., 1998. Using an F₂ screen for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.*, 91, 579-584.
- Andow D.A., Olson D.M., Hellmich R.I., Alstad D.N., Hutchison W.D., 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.*, 93: 26-30.
- Bolin P.C., Hutchison W.D., Andow D.A., 1999. Long term selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.*, 92, 1021-1030.
- Bourguet D., Bethenod M.T., Pasteur N., Viard F., 2000. Gene flow in the European Corn Borer: implications for the sustainability of transgenic insecticidal maize. *Proc. R. Soc. London. B.*, 267, 117-122.
- Huang F., Higgins R.A., Buschman L.L., 1997. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 90, 1137-1147.
- Liu Y.B., Tabashnik B.E., Dennehy T.J., Patin A.L., Bartlett A.C., 1999. Development time and resistance to *Bt* crops. *Nature*, 400, 519.
- Schneider J.C. 1999. Confidence interval for bayesian estimates of resistance allele frequencies. *J. Econ. Entomol.*, 92, 755-758.
- Wolfenbarger L.L., Phifer P.R., 2000. Biotechnology and ecology – The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 290, 2088-2093.

PUBLICATIONS ISSUES DU PROJET

Articles scientifiques

- Bourguet D.**, Bethenod M.T., Pasteur N., Viard F., 2000. Gene flow in the European Corn Borer: implications for the sustainability of transgenic insecticidal maize. *Proc. R. Soc. London. B.*, 267, 117-122.
- Bourguet D.**, Génissel A., Raymond M., 2000. Insecticide resistance and dominance levels. *J. Econ. Entomol.*, 93: 1588-1595.
- Bourguet D.**, Bethenod M.T., Trouvé C., Viard F., 2000. Host plant diversity in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: what value for sustainable transgenic insecticidal *Bt* maize ? *Proc. R. Soc. London. B.*, 267: 1177-1184.
- Chaufaux J.**, Séguin M., Swanson J.J., **Bourguet D.**, Siegfried B.D., 2001. Chronic exposure of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) to the Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol.*, 94 (6) : 1564-1570.

Articles de vulgarisation

- Bourguet D.**, Trouvé C., Pinte S., Bethenod M.T., Frérot B., 1999. La pyrale du maïs dans les houblonnières du Nord Pas-de-Calais : une race à part ? *Phytoma*, 517, 48-49.
- Bourguet D.**, **Chaufaux J.**, 2000. *Bt* : les insectes font de la résistance. *Biofutur*, 201, 42-45.
- Réjasse A., Bethenod M.T., **Bourguet D.**, 2000. A propos des zones refuges dans le maïs transgénique. *Phytoma*, 531, 52-54.