

Cultures transgéniques Bt et abeilles

Lilian Ceballos

L'exposition des abeilles aux cultures transgéniques

Partout dans le monde, les colonies d'abeilles subissent des mortalités importantes. Cette mortalité est très probablement plurifactorielle, en partie causée par les pesticides toxiques utilisés pour l'enrobage des semences, par les conditions climatiques locales, par la présence d'agents pathogènes (*Varroa* sp.) et par la susceptibilité de la souche génétique d'abeilles (Huang et al. 2004, Mullin et al. 2005). En Californie, le déclin des colonies d'abeilles perturbe la pollinisation des amandiers (et arbres à fleurs en général), ce qui affecte négativement les rendements agricoles (Klein et al. 2007). La pollinisation des plantes à fleurs est un service écologique gratuit que remplissent les pollinisateurs sauvages et domestiques, en l'absence desquels les rendements agricoles chutent inexorablement (Klein et al. 2007).

Avec le développement des cultures transgéniques¹, les colonies d'abeilles se trouvent confrontées à un nouveau risque potentiel : les plantes Bt sont modifiées pour produire des toxines insecticides et les abeilles pourraient être affectées par cette nouvelle source de protéines qu'elles récoltent et rapportent à la ruche. Il convient donc d'évaluer l'impact de ces toxines sur les butineuses, mais aussi sur les nourrices ou encore les larves qui absorbent de grandes quantités de protéines dans le pollen qu'elles consomment.

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie du sol qui produit des inclusions cristallines contenant des protéines insecticides (d'où le nom Cry). Selon la souche bactérienne², ces cristaux sont composés d'une ou plusieurs protoxines insecticides qui nécessitent un mécanisme pour les activer³. Ce mécanisme confère une spécificité étroite à ces protéines insecticides, ce qui explique leur utilisation en agriculture biologique (Schnepf 1998, Hilbeck & Schmidt 2006). Ce sont des séquences tronquées de ces gènes bactériens Cry qui sont insérées dans la plante par modification génétique. C'est pourquoi il a d'abord été affirmé qu'en raison de l'utilisation ancienne et sûre de biopesticides Bt en agriculture biologique, il n'y avait aucune raison de craindre une toxicité des plantes Bt.

Cependant, le spectre d'activité des protéines Cry est bien plus large que supposé, incluant certains arthropodes, nématodes, vers plats et protozoaires (Hilbeck & Schmidt 2006). Même les formulations naturelles de toxines et spores ne présentent pas la spécificité d'action que les promoteurs de PGM leur prêtent : par exemple, la mortalité larvaire des coccinelles est augmentée suite à l'absorption de solutions de toxines Cry1Ab (Schmidt 2006). Par ailleurs, les différences entre toxines bactériennes et végétales (PGM) tiennent tant à la structure des protéines qu'à la voie d'exposition des insectes:

- 1) les toxines Bt pulvérisées par voie aérienne sont dégradées rapidement par les rayons UV;

¹ Il existe deux catégories de plantes génétiquement modifiées (PGM) cultivées à l'échelle commerciale : les plantes tolérantes à un herbicide et les plantes insecticides Bt. Nous nous concentrons sur les plantes Bt car le maïs Mon 810, seule variété de maïs autorisée en Europe, est un maïs modifié pour produire constitutivement la protéine insecticide Cry1Ab (active sur la pyrale).

²: Cry1 et Cry2 sont actives sur Lépidoptères et/ou Diptères, Cry3 sur Coléoptères et Cry4 sur Diptères.

³: Processus durant lequel le poids moléculaire des protéines est réduit, par exemple de 130-140 kDa à 60-65 kDa dans le cas des toxines Cry1. A l'inverse, les PGM expriment les toxines Bt sous une forme activée de poids moléculaires différents (69 kDa pour la toxine Cry1Ab).

- 2) les formulations Bt contiennent un cocktail de toxines sous forme inactive (protoxine) et les spores de *B. thuringiensis* dont la présence potentialise l'activité insecticide des protéines Bt ;
- 3) la séquence Bt introduite dans le maïs Bt est une séquence tronquée ;
- 4) alors que les protoxines doivent être activées par un processus complexe qui se déroule dans l'intestin des insectes, le maïs Bt sécrète la toxine sous forme active ;
- 5) les insectes sont continuellement exposés aux toxines du maïs Bt qui les produit dans tous ses tissus pendant tout le cycle, et les toxines Bt produites par les PGM s'accumulent dans l'environnement (Hilbeck & Schmidt 2006, Rosi-Marshall 2007).

L'évaluation environnementale des cultures transgéniques

Face à la généralisation des cultures transgéniques, il devient essentiel d'évaluer leur impact sur les insectes pollinisateurs, et en particulier les abeilles (domestiquées ou sauvages). Des lignes directrices ont été publiées par l'EPA pour les tests de toxicité aiguë sur les abeilles domestiques (EPA 1996). Par contre, on peut s'étonner que malgré leur rôle dans la pollinisation de nombreux systèmes, les abeilles sauvages n'aient apparemment pas été testées pour l'enregistrement du maïs Bt (EPA 1996 & 1999, Hilbeck & Schmidt 2006). En fait, des effets inattendus sur l'abeille domestiquée ont déjà été rapportés: une solution de Bt (var. *tenebrionis*), supposée spécifique des Coléoptères, entraînait une mortalité significative des abeilles domestiquées (Vandenberg 1990). Une autre étude indiquait que le pollen de colza transgénique (ciblant Coléoptères et Lépidoptères) interférait avec l'apprentissage par les abeilles domestiquées (Picard-Nicou et al. 1997). Depuis, certaines études sur l'impact des cultures Bt ont aussi révélées des effets adverses des plantes Bt sur certains insectes non cibles (Pilcher et al. 1997, Hilbeck et al. 1998, Losey et al. 1999, Pimentel & Raven 2000). Depuis cette reconnaissance, plusieurs auteurs ont régulièrement averti de la nécessité d'une évaluation rigoureuse des impacts environnementaux des cultures Bt sur les pollinisateurs, et les abeilles en particulier (Morse et Calderone 2001). Ainsi, Keil et al. (2002) notaient qu'en raison de la présence de la toxine active dans les plantes Bt, ces PGM étaient susceptibles de provoquer des effets secondaires sur les insectes non ciblés, en particulier les abeilles: «*tous les stades de développement de l'abeille peuvent être en contact avec la toxine si elle est exprimée dans le pollen*».

Pour évaluer l'impact potentiel des plantes transgéniques sur les abeilles, la procédure standard pour l'évaluation de la toxicité orale aiguë des pesticides chimiques est souvent adaptée : pour évaluer les effets directs sur les abeilles de PGM, des solutions de saccharose contenant différentes doses de protéines transgéniques sont distribuées aux ouvrières (Girard et al. 1998, Malone et al. 1999 et 2001, Pham Delegue et al. 2000). Sims (1995, 1997) nourrit les larves et adultes d'*A. mellifera* de solutions de sucre avec la toxine activée Cry1Ac (Sims 1995) ou la toxine activée Cry2A (Sims 1997): aucune différence significative de mortalité n'est trouvée entre les deux lots. Arpaia (1996, 1997) donne un sirop contenant la toxine Cry3B à des colonies d'abeilles: aucun effet de la toxine sur la survie larvaire et le poids sec des pupes n'a été trouvé. De même, Malone & Pham-Delegue (2001) ne trouvent aucune différence sur la longévité et l'activité de vol lorsqu'*A. mellifera* reçoit les toxines purifiées Cry1Ba. Il faut toutefois noter que la toxine du maïs Bt est la Cry1Ab et non Cry1Ba. Enfin, Malone et Pham-Delegue (2001) ont passé en revue plus de seize études en laboratoire où seuls les **produits purifiés du transgène** (protéines) étaient donnés aux abeilles adultes ou aux larves dans les ruches. Ils ne trouvent pas d'effets significatifs sur les abeilles dans ces études. Plus récemment, Malone et al. (2002) et Brødsgaard et al. (2003) ont évalué l'impact des plantes transgéniques en exposant les larves d'abeilles au produit purifié du transgène (inhibiteur de la sérine protéinase) via un protocole d'élevage in vitro au laboratoire. En général, ces études montrent que l'impact des plantes Bt sur les abeilles est moindre que celui des inhibiteurs de protéases⁵ ou d'insecticides chimiques à large spectre (Malone et al. 2001, Keil et al. 2002).

⁴: Environmental Protection Agency (Agence de Protection de l'Environnement)

Dans une étude portant sur l'alimentation des larves, Malone et al. (2004) et Babendreier et al. (2005) montrent que le pollen ou la toxine Bt n'ont pas d'influence sur la survie ou le développement des glandes hypopharyngiennes des nourrices, contrairement à l'inhibiteur de protéinase SBTI. Par contre, ces auteurs mettent en évidence la toxine Bt au niveau des glandes hypopharyngiennes des nourrices alors qu'ils ne détectent pas l'inhibiteur de protéinase SBTI qui a pourtant un impact sur les abeilles nourrices. La durée de cette étude était limitée à 10 jours, ce qui peut être insuffisant pour la détection d'effets subtiles. Par ailleurs, quelques rares études sont menées sur le terrain. Un essai au champ du coton Bt évaluait divers paramètres pendant deux ans: nombre d'adultes et de larves, poids des pupes et concentrations protéiques dans l'hémolymphe (Huang et al. 2004). Malgré une concentration protéique supérieure chez les abeilles des champs GM, cette différence est rejetée et même considérée comme favorable à la nutrition! De même, le protocole est modifié entre 2001 et 2002 (changements de variétés GM et non GM, nombre d'adultes déterminé après 10 puis 8 jours).

Cependant, ces études n'explorent que l'aspect toxicologique des cultures Bt, et encore dans le cadre d'une prise alimentaire directe. Les effets trophiques ne peuvent pas être pris en compte par des protocoles aussi simplistes. Pour effectuer une évaluation environnementale complète, il est important de distinguer les effets directs (toxicité aiguë pour les abeilles) d'effets plus indirects qui pourraient cependant avoir des conséquences désastreuses sur l'apiculture et l'agriculture. Les effets directs peuvent suivre l'ingestion des protéines transgéniques si elles sont exprimées dans le pollen ou le nectar des fleurs visitées (ce qui est le cas pour le pollen des variétés Bt176, Mon 810). Alternativement, des effets indirects peuvent découler de modifications pléiotropiques du phénotype floral (changement de forme et/ou couleur de la fleur, du bouquet d'arômes, présence/absence de défenses végétales ...). Ces changements phénotypiques sont susceptibles d'influencer l'interaction plantes/pollinisateurs. La désorientation des abeilles domestiquées rapportées par Picard-Nicou et al. (1997) était en fait due à des changements pléiotropiques de la qualité des protéines (non Bt) du pollen de colza transgénique : cette étude montre que des modifications non intentionnelles peuvent provenir de la relative imprécision de la modification génétique et que ces modifications non intentionnelles peuvent jouer un rôle biologique majeur.

Enfin, une critique générale s'adresse à l'ensemble de ces études de toxicité : dans les études d'écotoxicologie, il est important de disposer d'un **témoin négatif** (blanc) et d'un **témoin positif**. Or, l'effet des toxines Bt est souvent comparé à celui des inhibiteurs de protéinases (SBTI, BBI) ou insecticides (λ -cyhalothrine, deltaméthrine, imidaclopride..) qui constituent un témoin positif mais souvent, le témoin négatif manque. De même, quand l'évaluation de l'impact des cultures Bt a lieu en milieu naturel, c'est toujours par comparaison avec des champs traités par des insecticides. Par ailleurs, toutes les semences de maïs Bt commercialisées aux Etats-Unis sont enrobées par des insecticides et/ou fongicides, et l'utilisation de ces graines enrobées pour les études scientifiques crée une confusion entre les divers facteurs (Mullin 2005). Dans ces conditions, conclure que la toxicité des plantes Bt est bien moindre ne nous apporte pas d'éléments pour une évaluation scientifique rigoureuse mais permet de donner l'illusion d'une absence de toxicité alors que **la toxicité est juste moindre sur les paramètres mesurés**.

Bien que certaines études aient détecté des effets adverses de certains produits purifiés du transgène, il est souvent difficile d'extrapoler l'impact écologique sur les colonies d'abeilles à partir de résultats obtenus avec de telles études réalisées en laboratoire simplement parce que le contexte écologique ou apicole réaliste ne peut pas être inclus dans la conception de l'étude. De même, les tests en laboratoire ne permettent pas de reproduire des conditions environnementales pertinentes et ne devrait en aucun cas être cités comme preuve d'une innocuité des PGM, preuve que seules des études en milieu naturel peuvent apporter.

⁵ : Ces inhibiteurs enzymatiques provoquent une inhibition des enzymes digestives dans l'intestin des insectes. Les carences alimentaires provoquées par cette inhibition entraînent finalement la mort de l'insecte.

Par exemple, l'extraction du produit purifié du transgène par les adultes et les larves d'abeilles du système d'exposition de l'élevage *in vitro* peut être différent de l'extraction de tissus végétaux entiers comme le pollen. De plus, les processus écologiques et les interactions entre organismes se déroulent à des échelles diverses : au niveau de l'individu, des populations, des communautés. Entre chaque niveau, il peut y avoir des effets d'échelle qui ne sont pas reproductibles en conditions artificielles. Pour des pollinisateurs comme l'abeille, les relations sociales dans la colonie sont aussi difficilement reproductibles: *«les études in vitro en laboratoire éliminent les interactions sociales des colonies et ont donc des limitations pour la prédiction de l'impact sur les colonies dans des conditions apicoles réalistes »* (Huang et al. 2004). Pour le coton Bt, Biao Liu et al. (2005) insistent : *« Cependant, les abeilles n'ingèrent normalement pas le pollen dans des solutions de saccharose comme mentionné dans notre expérience, mais dans un média complexe basé sur le nectar et la salive des abeilles qui contient un grand éventail de sucres solubles, de lipides et d'acides aminés. Les impacts sur les abeilles de diètes artificielles peuvent être différents de ceux d'une diète réelle. En plus, les larves peuvent être plus sensibles à la toxine Bt que les ouvrières adultes. Donc, nos résultats expérimentaux ne peuvent pas complètement démontrer la sûreté du coton Bt pour les abeilles. »*

En plus, de nombreux tests utilisent la toxine produite dans *Escherichia coli* et non celle extraite de la PGM. Il est pourtant essentiel que les tests soient effectués avec la toxine Bt de la PGM sans quoi l'évaluation du produit purifié du transgène ignore les possibilités d'effets pléiotropiques ou d'interactions des gènes dans la PGM (Uberlacker et al. 1996, Kohli et al. 1998), et l'altération du spectre d'activité des toxines Bt (Manacchini et al. 2006). Cette altération des caractéristiques biochimiques des protéines Bt supprime les trois verrous (pH intestinal, protéases spécifiques et liaison au récepteur) qui garantissent la spécificité des protoxines. Si l'on se reporte aux travaux de Marvier (2007), on s'aperçoit très clairement que des groupes d'insectes non ciblés par les PGM subissent un impact négatif plus ou moins important, ce qui est la conséquence logique de l'expression des séquences Bt tronquées insérées dans les PGM. Les nombreuses études en laboratoire qui montrent un impact inférieur des toxines Bt par rapport aux inhibiteurs de Protéases (IP) ne signifie pas que la toxicité des PGM sur l'abeille soit nulle. L'étude de Marvier (2007) montre d'ailleurs que les hyménoptères auxquels appartiennent les abeilles voient leur abondance relative fortement diminuée dans les champs de maïs ou de coton Bt.

Conclusion

En conclusion, il n'y a pas de preuves directes que les larves ou adultes d'*A. mellifera* soient affectées par les toxines Bt. Cependant, la majorité des études effectuées n'utilisent pas la toxine activée du maïs Bt et d'autres espèces de pollinisateurs n'ont pas encore été testés. Ces études doivent aussi prendre en compte les spécificités des castes (nutrition, trophallaxie) et elles doivent se prolonger sur des périodes appropriées. Nous recommandons d'établir une méthodologie appropriée qui dépasse l'approche strictement toxicologique pour intégrer aux protocoles des éléments de complexité écologique indispensable à une évaluation réaliste. En aucun cas, les essais ne devraient être réalisés avec d'autres formes de toxine que celle produite par la plante Bt et à laquelle l'insecte est exposé. Pourtant la majorité écrasante des essais de toxicité n'est pas réalisée avec le matériel pertinent. De plus, certaines études utilisent des semences transgéniques enrobées de traitements insecticides et/ou fongicides, connus pour leur toxicité sur les abeilles. Un tel protocole qui confond les facteurs de mortalité (toxine Bt, insecticide, fongicide..) ne peut pas permettre de conclure à une absence de toxicité car elle peut tout simplement être masquée. Parmi les lacunes de l'évaluation, beaucoup d'études ne durent qu'un an, n'ont pas le nombre de répliques qui permette de rendre compte de la variabilité interannuelle (densité des insectes, météorologie). La puissance des tests statistiques est rarement indiquée. Cette imprécision méthodologique a été éclairée par les critiques de Lovei & Arpaia (2005).

Les toxines sécrétées par les plantes Bt sont des formes altérées qui diffèrent sur des aspects biochimiques essentiels : les modifications structurales, la résilience des toxines Bt dans le sol et leur diffusion dans les chaînes trophiques exposent des organismes non cibles à ces substances insecticides. Ces organismes non cibles remplissent des fonctions écologiques capitales comme le contrôle biologique, la pollinisation ou le recyclage de la matière organique. Toute altération importante de ces services écologiques aurait des conséquences agricoles désastreuses. Dix ans de cultures Bt ont révélé un certain nombre de recommandations qui paraissent incontestables et qui devraient impérativement être pris en compte pour les futures évaluations:

- 1) Toujours utiliser la toxine pertinente pour les tests (produite par la PGM et telle qu'elle agit chez l'insecte),
- 2) Construire des protocoles scientifiques sérieux (durée de l'expérience, échantillon, répétitions et traitements statistiques...),
- 3) Dépasser l'approche écotoxicologique pour mettre en évidence des effets subtiles ou masqués (plan de suivi des populations naturelles),
- 4) Ne pas privilégier certains itinéraires agronomiques (comparaison unique avec les insecticides).

La question qui sous-tend l'évaluation de l'impact environnemental des cultures Bt consiste à déterminer si les cultures GM sont toxiques sur tel organisme (ou groupe d'organisme) et pas si tel autre produit (pesticides..) est plus ou moins toxique sur l'organisme considéré. Ces expérimentations ne visent pas à établir une échelle relative de toxicité des différents produits mais à déterminer dans les faits si une toxicité (directe ou indirecte, aiguë ou chronique...) est manifeste. Lors des études multicentriques qui visent à évaluer l'abondance relative des insectes, les cultures Bt sont comparées à des champs traités par insecticides ou à d'autres cultures génétiquement modifiées (inhibiteurs de protéases): l'itinéraire biologique est toujours absent. Pourtant, l'impact des cultures Bt sur la biodiversité cultivée est mise en lumière par l'analyse de Marvier (2007): *«L'indication générale de nos analyses est que si l'agriculture avec applications d'insecticides est le standard de comparaison et si l'adoption de cultures Bt réduit vraiment les applications d'insecticides, alors les cultures Bt pourrait augmenter l'abondance global des invertébrés non cibles. Par comparaison, si la comparaison est faite avec des systèmes de cultures sans insecticides, certains groupes non cibles sont significativement moins abondants dans les champs Bt que dans les champs contrôle...».*

Bibliographie

EPA. 1996. Ecological effects test guidelines OPPTS 850.3020 Honeybee acute contact toxicity test, EPA 712-C-96-147, Washington, DC.

EPA 1999. US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs. Biopesticide Fact Sheet. (2 Apr 2001; www.epa.gov/pesticides/biopesticides/factsheets/)

Huang Z. Y., Hanley A. V., Pett W. L., Langenberger M. & Duan J. J. 2004; Field and semi field evaluation of impacts of transgenic canola pollen on survival and development of worker honey bees. *J. Econ. Entomol.*, **97**(5): 1517-1523.

Mullin et al. 2005. Effets toxiques et comportementaux sur les Carabidae des traitements de semences utilisés sur le maïs Cry3Bb1et Cry1Ab/c. *Environ. Entomol.* 34(6) : 1626-1636.

Klein A. M., Vaissière B. E., Cane J. H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S. A., Kremen C. & Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B*, **274** : 303–313.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR & Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Molec Biol Rev* 62: 775–806.

Hilbeck & Schmidt. 2006. Another view on Bt proteins- How specific are they and what else might they do? *Biopestic. Int.*, 2: 1-50.

Rosi-Marshall E. J., J. L. Tank, T. V. Royer, M. R. Whiles, M. Evans-White, C. Chambers, N. A. Griffiths, J. Pokelsek, and M. L. Stephen. 2007. Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *PNAS* **104**(41): 16204-16208.

Vandenberg JD. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, **83**: 755–759.

Picard-Nicou AL, Grison R, Olsen L, Arnold CPG, Pham-Delegue MH. 1997. Impact of proteins used in plant genetic engineering: Toxicity and behavioural study in the honeybee. *Journal of Economic Entomology*, **90**: 1710–1716.

Pierre J. 2007. Impacts des OGM sur les abeilles : informations réelles et fausses rumeurs. Revue bibliographique. *Bull. Tech. Apic.*, **35** (1), 8-15.

Pilcher, C.D., Obrycki, J.J., Rice, M.E. & Lewis, L.C. (1997). Preimaginal development, survival and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environ. Entomol.*, 26, 446–454.

Hilbeck A, Baumgartner M, Fried PM & Bigler F (1998a) Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology* **27**: 480–487.

Losey, J.E., Rayor, L.S. & Carter, M.E. (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399, 214.

Pimentel DS, Raven PH. 2000. Bt corn pollen impacts on nontarget Lepidoptera: Assessment of effects in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 8198–8199.

Morse, R. & Calderone N.W. 2001. The value of honey bees as pollinators of U.S. Crops in 2000. *Bee Culture*, **128**: 1–15.

Keil S. et al. 2002. Les abeilles sont-elles menacées par l'utilisation de plantes transgéniques résistantes aux insectes. Agroscope Liebefeld-Posieux, centre suisse de recherches apicoles.

Girard C., Picard-Nizou A.L., Grallien E., Zacommer B., Jouanin L., Pham-Delègue M.H. (1998) Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinase of the honeybee. *Transgenic Res.*, **7**: 239–246.

Malone L.A., Burgess E.P.J., Stefanovic D. (1999) Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticides formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie*, **30**: 465–473.

Pham-Delègue M.H., Girard C., Le Métayer M., Picard-Nizou A.L., Hennequet C., Pons O., Jouanin L. 2000. Long-term effects of soybean proteinase inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. *Entomol. Exp. Appl.*, **95** : 21–29.

- Malone L.A., Burgess E.P.J., Gatehouse H.S., Voisey C.R., Tregidga E.L., Philip B.A. 2001. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie*, **32**: 57–68.
- Sims, S.R. (1995). *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CryIA(c)) protein expressed in transgenic cotton: Effects on beneficial and other non-target insects. *Southwest. Entomol.*, 20, 493–500.
- Sims SR, Martin JW (1997) Effect of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins CryIA(b), CryIIA, and CryIIIA on *Folsomia candida* and *Xenylla grisea* (Insecta: Collembola). *Pedobiologia* 41:412–416
- Arpaia, S. (1996) Ecological impact of Bt-transgenic plants: Part 1. Assessing possible effects of CryIIIB toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Genet. Breed.*, **50**, 315–320.
- Arpaia, S., Mennella, G., Onofaro, V., Perri, E., Sunseri, F. and Rotino, G.L. (1997) Production of transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) resistant to Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Theor. Appl. Genet.*, **95**, 329–334.
- Malone LA & Pham-Delegue MH. 2001. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, **32**: 287–304.
- 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** : 447–458.
- Brødsgaard H.F., Brødsgaard C.J., Hansen H., Lovei G.L. (2003) Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie*, **34**: 139–145.
- Malone LA, Todd JH, Burgess EPJ & Christeller JT (2004) Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie*, **35**: 655–664.
- Babendreier D, Kalberer N, Romeis J, Fluri P, Mulligan E & Bigler F (2005) Influence of transgenic Bt-Pollen, Bt-Toxin and Proteinase Inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal gland in honeybees. *Apidologie*, **36**: 585–594.
- Bourguet, D., Chaufaux, J., Seguin, M., Buisson, C., Hinton, J.L., Stodola, T.J. et al. 2003. 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**: 1225–1233.
- Andow DA, Zwahlen C (2006) Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecol Lett.*, **9**:196–214.
- Biao Liu et al. 2005. The impacts of the pollen of insect-resistant transgenic cotton on honey bees. *Biodiversity & Conservation*, **14**: 3487-3496.
- Uberlacker B., Klinge B. & Werr W. 1996. Ectopic expression of the maize homeobox *ZmHox1a* or *ZmHox1b* causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell*, **8**: 349-362.
- Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D. A. & Christou P. 1998. Transgene organization in rice engineered through direct DANN transfer support a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of recombination hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 7203-7208.
- Manachini, B. et al. 2006. Baseline susceptibility to Cry1Ab toxin of *Ostrinia nubilalis* Hb. (Lepidoptera: Crambidae) and *Sesamia nonagroides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae) from different European countries. In: I. Schuphan et al. 2006. Resistance management of Bt-maize in Europe: Abstracts. COST 862 Workshop, 6-8 April 2006, Aachen, Germany.

Marvier M., McCreedy C., Regetz G & Kareiva P. 2007. A meta-analysis of effects of cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science*, **316**: 1475-1477.

Kaatz H.H., 2006. Effects of Bt maize pollen on the honeybee. GMO Safety report. (www.gmo-safety.eu)

Broderick et al. 2006. Les bactéries intestinales nécessaires pour une activité insecticide Bt. *PNAS* 103 : 15196-15199.

Knowles BH. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins *Adv Insect Physiol.* **24**:275–308.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR & Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Molec Biol Rev.*, **62**: 775–806.

Haughton, A.J., Champion, G.T., Hawes, C., Heard, M.S., Brooks, D.R., Bohan, D.A. et al. (2003). Invertebrate responses to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops. II. Within-field epigeal and aerial arthropods. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**: 1863–1877.

Hawes, C., Haughton, A.J., Osborne, J.L., Roy, D.B., Clark, S.J., Perry, J.N. et al. (2003). Responses of plants and invertebrate trophic groups to contrasting herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**: 1899–1913.

Heard, M.S., Hawes, C., Champion, G.T., Clark, S.J., Firbank, L.G., Haughton, A.J. et al. (2003a). Weeds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. I. Effects on abundance and diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**: 1819–1832.

Heard, M.S., Hawes, C., Champion, G.T., Clark, S.J., Firbank, L.G., Haughton, A.J. et al. (2003b). Weeds in field with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. II. Effects on individual species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**: 1833–1846.

Roy, D.B., Bohan, D.A., Haughton, A.J., Hill, M.O., Osborne, J.L., Clark, S.J., Perry, J.N., Rothery, P., Scott, R.J., Brooks, D.R., Champion, G.T., Hawes, C., Heard, M.S. & Firbank, L.G. 2003 Invertebrates and vegetation of field margins adjacent to crops subject to contrasting herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **358** : 1879-1898.

Lovei GL, Arpaia S (2005) The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **114**: 1–14.

Crickmore 2006. Au-delà de la spore- développements passés et futurs de *B. thuringiensis* comme biopesticide. *J. of Applied Microbiology*, **101**: 616-619.

Pimentel D., Hepperly P., Hanson J., Douds D. & Seidel R. 2005. Environmental, Energetic, and Economic comparisons of Organic and Conventional Farming Systems. *BioScience*, **55**(7): 573-582.