

Impacts environnementaux des plantes Bt - Résumé

Lilian Ceballos

Partie 1 : Rapport et Résumé exécutif

3

Ce dossier est la partie résumée d'un rapport complet qui sera édité au printemps 2008.

Au sommaire du dossier complet :

I- Historique

II- Mécanisme d'action des protéines Bt

III- Risques associés à l'évolution d'une résistance des organismes cibles

IV- Discussion et prospective

V- Bibliographie

Coordonnées de l'auteur :

Lilian Ceballos
3 rue Gustave Rouanet
11100 Narbonne
lilian.ceballos@gmail.com

Coordonnées de Rés'OGM Info :

8 quai Maréchal Joffre
69002 LYON
tél-fax : 04 78 42 95 37
resogminfo@free.fr
www.resogm.org

Objectif :

Evaluer les conséquences environnementales liées à l'introduction dans les agroécosystèmes des plantes génétiquement modifiées pour produire des toxines insecticides Bt. Les risques identifiables de ce déploiement sont :

- 1) risques sur les insectes non cibles et la biodiversité,
- 2) risques associés au flux génique et,
- 3) risques associés à l'évolution d'une résistance des organismes cibles (Snow & Moran-Palma 1997, Andow & Zwahlen 2006).

De manière classique, l'évaluation des risques comporte quatre étapes : identification du risque, évaluation de l'exposition, évaluation des effets et caractérisation du risque (NRC 1987, USDA 1990, EPA 1998). Dans le cas des cultures génétiquement modifiées, Andow & Zwahlen (2006) définissent le risque comme « *la probabilité que des effets adverses proviennent d'un risque environnemental (dans ce cas, la plante transgénique et le produit du transgène), et est classiquement composé de (1) la probabilité que l'environnement soit exposé au risque (évaluation de l'exposition) ; et (2) la probabilité conditionnelle que l'effet adverse se produise, suite à l'exposition (évaluation des effets)* ». Les cultures en plein champ de plantes Bt sur des surfaces de plus en plus considérables augmentent la probabilité d'exposition des organismes non cibles directement à la toxine ou indirectement via le flux génique, tandis que des effets adverses de ces cultures sur leur environnement immédiat ont été décrits.

Une évaluation pertinente doit dépasser le cadre de la toxicité aiguë pour garantir que ce déploiement ne présente pas d'impact significatif sur les populations d'insectes non cibles à moyen ou long terme (pollinisateurs, ennemis naturels des ravageurs et parasitoïdes). La mise en évidence de la persistance et de l'accumulation des toxines Bt au niveau du sol illustre la nécessité de caractériser les voies de diffusion possible de ces toxines dans l'environnement afin de pouvoir étudier l'impact des toxines sur les organismes exposés. Les connaissances acquises sur le devenir des toxines Bt sont donc essentielles afin de déterminer l'impact de ces toxines sur les compartiments écologiques et les organismes exposés.

Partie 1 : Impacts environnementaux des plantes Bt

I- Résumé exécutif:

Depuis 1996, des plantes génétiquement modifiées (PGM) sont cultivées en plein champ par plusieurs pays : les Etats-Unis, le Canada, l'Argentine et le Brésil, ainsi que la Chine ou l'Inde possèdent l'essentiel des surfaces de PGM cultivées. L'insertion par modification génétique d'un gène (souvent d'origine étrangère) dans l'espèce cultivée permet de lui conférer des traits agronomiques nouveaux et parfois absents du pool génétique de l'espèce. Cette nouvelle technologie a été développée pour transformer des espèces cultivées importantes (soja, maïs, coton, colza) auxquelles ont été conféré l'un des deux caractères agronomiques suivants : la tolérance à un herbicide ou la production de toxines insecticides (appelées aussi plantes Bt).

Bacillus thuringiensis est une bactérie du sol qui se rencontre dans plusieurs environnements riches en insectes. Elle produit toute une gamme de protéines dont l'activité insecticide est spécifique d'un groupe d'espèces (ordre) : les protéines Cry1 et Cry2 sont actives sur les Lépidoptères et/ou de Diptères, alors que les toxines Cry3 sont actives sur les Coléoptères et les toxines Cry4 sur les espèces de Diptères. Sécrétées par les bactéries sous forme de précurseurs inactifs ou protoxines, elles doivent subir un processus d'activation dans l'intestin de l'insecte cible. Grâce à leur spécificité d'action chez les insectes et à leur inactivité chez les vertébrés (EPA 2000 & 2001, Hilbeck & Schmidt 2006), les formulations combinant spores bactériennes et protéines Bt sont autorisées en agriculture biologique depuis les années 1970. Elles offrent donc une alternative aux insecticides chimiques à large spectre et sont devenues les insecticides biologiques les plus utilisées dans le monde. Aussi, l'agence américaine de protection de l'environnement a considéré que la spécificité et la faible toxicité des protéines Bt constituaient un « bien public » (EPA 1997 & 1998). C'est pour préserver l'efficacité de ces toxines et éviter l'évolution de résistance chez les insectes cibles que l'agence de protection de l'environnement (EPA 2000 & 2001b) exige maintenant l'adoption de la stratégie HDR (Hautes Doses/Refuges) pour toutes cultures Bt.

L'insertion du gène Bt dans les plantes cultivées a permis de développer des plantes dont l'activité insecticide est supposée ciblée en raison de la spécificité d'action des protoxines Bt (Monsanto 1998). Ces plantes « qui se défendent » ont été présentées comme un progrès significatif par rapport aux insecticides chimiques à large spectre et occupent des surfaces importantes dans les pays qui les cultivent. Cependant, un examen rigoureux de ces nouvelles plantes GM montre que la séquence du gène inséré est tronquée et que les toxines sécrétées par la plante ne sont pas identiques aux protoxines bactériennes, ce que précise d'ailleurs la documentation de Monsanto¹ sur la construction génétique du Mon810. En bref, (1) la séquence insérée dans le maïs est une séquence Bt modifiée et, (2) la protéine synthétisée par le maïs est la toxine activée.

¹ : « la séquence Cry1Ab insérée dans le maïs Mon810 a été isolée de la souche *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) HD-1 présente dans le biopesticide DIPEL®... Le plasmide PV-ZMBK07 contient la séquence codante cry1Ab, qui exprime la protéine Cry1Ab activée. Cette séquence codante cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* subsp. HD-1 (Fischhoff et al. 1987) a été modifiée pour augmenter les taux de la protéine Cry1Ab dans les plantes ». In : Monsanto 1998.

En fait, les bactéries synthétisent les protoxines sous forme de cristaux insolubles dont l'activité et la spécificité dépendent d'un mécanisme d'activation qui se déroule dans l'intestin de l'insecte cible. Solubilisées dans les conditions de pH intestinal de l'insecte cible puis activées par les enzymes protéolytiques de l'insecte cible, les toxines se fixent à des récepteurs et provoquent la formation de pores, ce qui entraîne la mort de l'insecte cible. Chez un insecte non cible (appartenant à un autre groupe), ce mécanisme d'activation est interrompu dès la première étape : la solubilisation de la protoxine n'a pas lieu à cause du pH intestinal. Le fait que les plantes Bt produisent les toxines végétales sous forme solubles et actives (voir figure 1) influe sur l'activité et la spécificité des protéines synthétisées puisque l'activation des toxines ne dépend plus des conditions intestinales spécifiques à l'insecte cible.

Ces différences biochimiques entre protoxines bactériennes et toxines végétales provoquent un élargissement du spectre d'activité des toxines Bt, ce qui peut avoir des répercussions sur l'abondance relative des groupes d'insectes dans les champs Bt. C'est notamment le cas de la toxine Cry1Ab du maïs Mon810 qui est active sur la pyrale et la sésamie alors que la protoxine bactérienne Cry1Ab est inactive sur la sésamie (Manacchini 2006). Début Janvier, le comité préfiguratif de la Haute Autorité sur les OGM a reconnu officiellement que la protéine synthétisée par le maïs Mon810 était différente de la protoxine bactérienne. Il s'ensuit que les risques du déploiement des PGM ne peuvent en aucun cas être déduits de l'innocuité de l'utilisation des formulations Bt au cours des décennies précédentes. De manière ambiguë, Monsanto (1998) affirme dans sa documentation que « la protéine Cry1Ab est insecticide seulement pour les insectes Lépidoptères » mais cite des études se rapportant à la spécificité des protoxines bactériennes (Höfte & Whiteley 1989, Huber & Lüthy 1981, Ignoffo 1973, Klausner 1984, Krieg & Langenbruch 1981).

L'évaluation des risques environnementaux des cultures Bt doit aussi prendre en compte les risques associés à l'évolution d'une résistance chez l'insecte cible, les risques associés au flux génique et les risques associés à une perte de biodiversité cultivée, en particulier à une diminution de l'abondance relative de groupes fonctionnels importants pour l'agriculture (prédateurs, pollinisateurs, détritivores). Chez les insectes cibles, l'apparition de résistance aux protéines insecticides est gérée par l'adoption de la stratégie Haute Dose/Refuge dont nous allons passer les implications en revue. Même si les conséquences du flux génique entre plantes cultivées et sauvages sont importantes à considérer, l'impact des cultures Bt sur la biodiversité cultivée reste essentiel pour l'évaluation de l'impact des plantes Bt sur les insectes bénéfiques. Malgré la prétendue spécificité d'action des toxines insecticides synthétisés par les plantes Bt (Monsanto 1998), des publications récentes montrent que la spécificité d'action des toxines synthétisées par les PGM est bien moindre que supposée (Rosi-Marshall 2007).

L'évaluation des risques environnementaux des cultures Bt sur les insectes non cibles reste problématique en raison de la complexité des interactions et des milieux. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'impact des cultures Bt sur les groupes d'insectes remplissant des fonctions écologiques essentielles comme la pollinisation, le contrôle biologique ou le recyclage de la matière organique. Ces fonctions constituent des « services écologiques gratuits » dont la perturbation aurait des conséquences économiques dramatiques sur l'agriculture (Klein et al. 2007). La pollinisation en particulier est capitale pour l'agriculture: les abeilles sont essentielles pour la pollinisation de plus de 90 cultures fruitières et maraîchères dans le monde. La valeur économique de l'abeille s'élève à plus de 14,6 milliards \$ aux U.S.A (Cox-Foster 2007).

Figure 1: les protéines insecticides produites par *B. thuringiensis*

Figure 1a : il existe une grande diversité de toxines protéiques appelées δ -endotoxines (335 δ -endotoxines ont été décrites). L'enchaînement linéaire des acides aminés qui forment la protéine dépend de la séquence nucléotidique du gène (Bt). La figure présente des exemples de la structure de plusieurs protoxines Bt : certains éléments se retrouvent dans plusieurs protéines (domaine I, II et III, De Maagd et al. 1996 a & b).

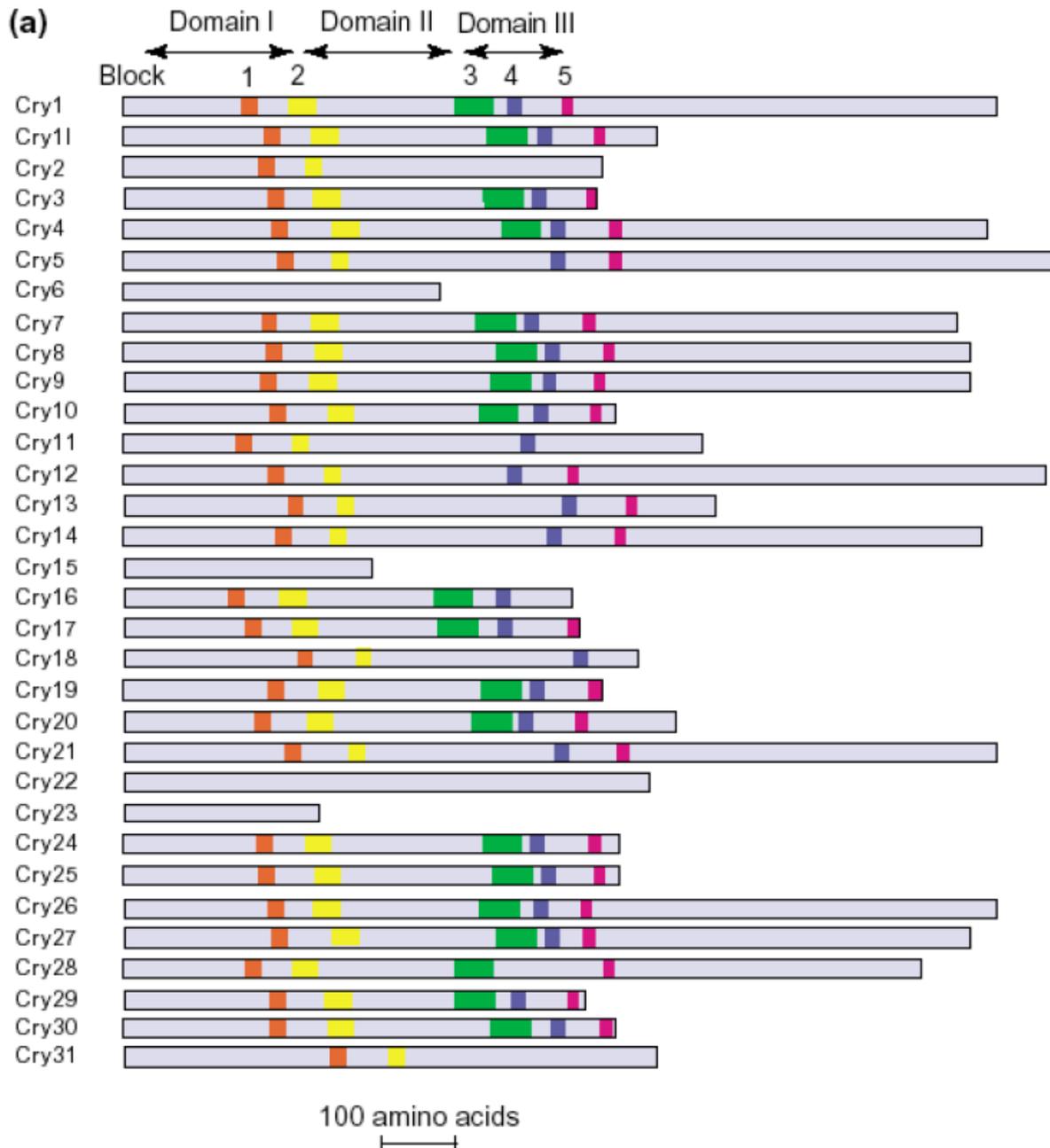


Figure 1b : la première structure est celle d'une protoxine Bt (la séquence en gris doit être clivée pour que la toxine soit activée). En bas, la séquence tronquée des toxines de PGM est similaire à la séquence de la toxine active (après solubilisation et clivage).

(b)

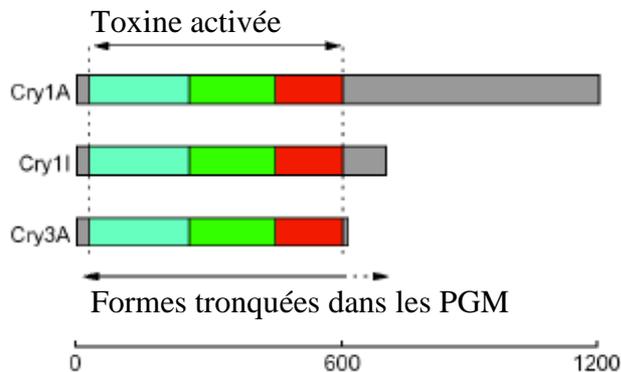


Figure 1b : structures de protoxine et toxine Bt (D'après de Maagd *et al.* 1999. Trends Plant Sci. 4:9-13).

Figure 1c : Spécificité de l'activité insecticide des protoxines Bt. La spécificité d'action est garantie par le fait que la protéine est sécrétée sous forme inactive (protoxine) par la bactérie. Cette protoxine doit être solubilisée dans des conditions de pH très précises et activée par clivage protéolytique. Ces conditions ne se rencontrent que dans l'intestin de l'insecte cible, ce qui garantit un spectre d'action étroit et spécifique (de Maagd *et al.* 2001 & 2004).

Spécificité des protoxines Bt

- Solubilisation des Protoxines au niveau de l'intestin de l'insecte
 - Lepidoptera, Diptera: pH alcalin
 - Coleoptera: pH neutre
- Spécificité de la Protéolyse
 - Lepidoptera, Diptera: Protéase à Serine
 - Coleoptera: Protéase à Cysteine, Aspartate
- Liaison au Récepteurs
 - Domaine I: "Qualité" du Pore

Figure 1c : Spécificité de l'activité insecticide des protoxines Bt

Figure 1d : les protoxines Bt se replient dans l'espace et adoptent une conformation spatiale définie par les interactions intramoléculaires. Cette conformation va influencer les interactions entre la toxine et le récepteur dans l'intestin de l'insecte cible (interaction clé-serrure). Même si le mode d'action des protoxines Bt sur les insectes cibles est connu, il y a peu d'informations sur l'interaction au niveau moléculaire (Knowles 1994; Schnepf *et al.* 1998), et en particulier sur la formation des pores.

(d)

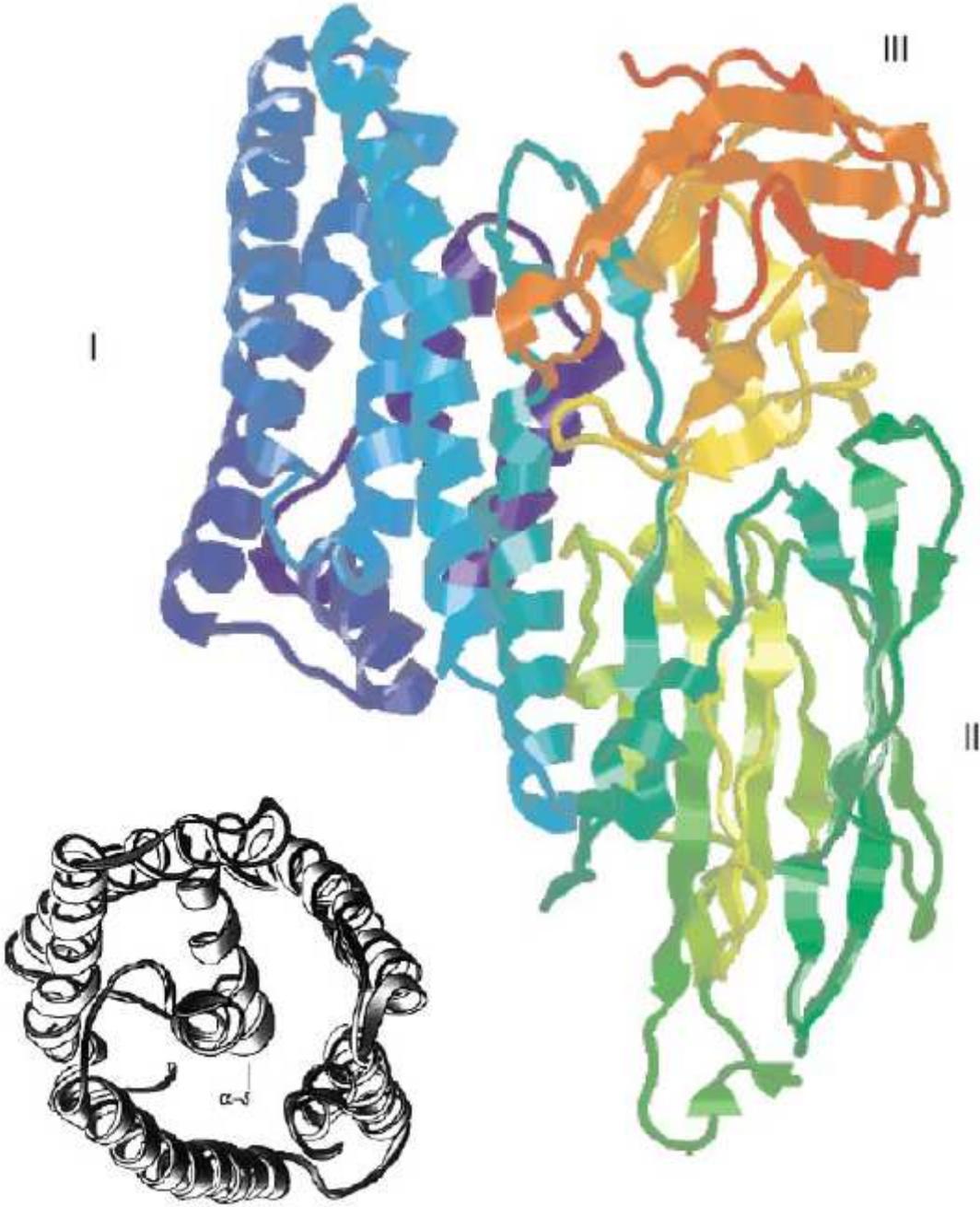
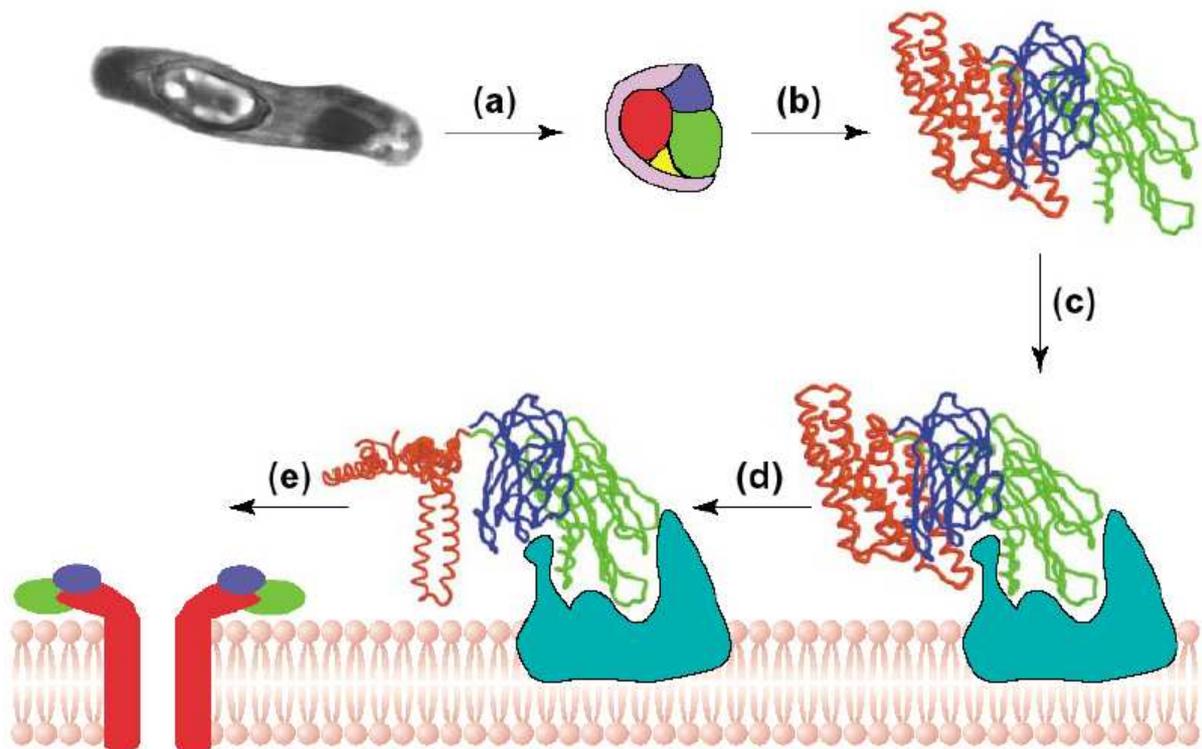


Figure 1e : après ingestion par un insecte susceptible, les protoxines Bt sont solubilisées et activées par protéolyse dans l'intestin de l'insecte. La toxine activée se lie à l'intestin, s'insère dans la paroi et forme un pore, conduisant à la destruction de la membrane intestinale et à la mort de l'insecte (Marroquin et al. 2000). Deux récepteurs candidats pour la liaison à la toxine et un candidat pour le clivage protéolytique ont été identifiés (Knight *et al.* 1994; Sangadala *et al.*, 1994; Vadlamudi *et al.* 1995; Oppert *et al.* 1997): cependant, les étapes de la cascade toxicologique reliant la formation des pores et les évènements en aval sont mal connus (D'après de Maagd *et al.* 2001. Trends Genet. 17:193-199).

(e)



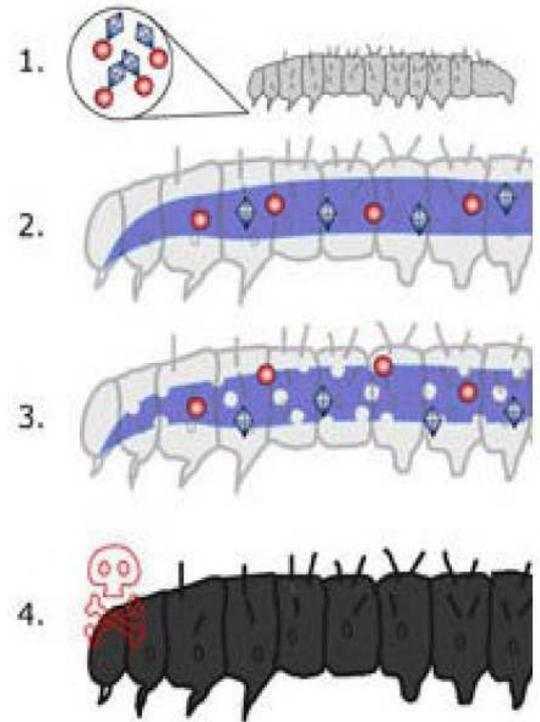
Mécanisme d'action des protoxines Bt bactériennes

1- Les insectes absorbent les cristaux Bt et les spores

2- Après solubilisation et activation, la toxine se lie à des récepteurs spécifiques et l'insecte cesse de s'alimenter

3- Les cristaux provoquent la rupture des parois intestinales, ouvrant l'accès aux spores et bactéries intestinales

4- L'insecte meurt puisque les spores et bactéries intestinales prolifèrent dans son corps



www.bt.ucsd.edu/how_bt_work.html

Figure 1f : schéma récapitulatif du mode d'action des toxines Bt

Dans un premier temps, en raison de l'absence relative d'impacts environnementaux des formulations Bt sur les insectes non cibles, les scientifiques ont estimé que les plantes Bt auraient un impact mineur sur l'entomofaune associée. Cependant, à la même époque, des publications sur les effets non intentionnels des cultures Bt sont apparues, ce que Hilbeck & Schmidt (2006) formulent ainsi: « *Fin des années 1990, fondée sur l'expérience des pulvérisations microbiennes Bt, la supposition commune était que les toxines Bt exprimées dans les PGM n'affecteraient aucun organisme en dehors de l'ordre de l'espèce cible du ravageur, c'est-à-dire Lépidoptères ou Coléoptères herbivores. La publication d'effets adverses des toxines Bt chez les larves de prédateurs (chrysopes) et les larves de papillon monarques ont surpris de nombreux scientifiques.* »

Notre revue bibliographique met en lumière les insuffisances et les lacunes de l'évaluation des risques environnementaux des cultures Bt : dans de nombreux tests, les insectes non cibles ne sont pas directement exposés aux toxines des plantes Bt. Comme nous l'avons vu, il existe des différences biochimiques entre toxines bactériennes et végétales, ce qui implique que l'utilisation de formulations bactériennes pour les tests se révèle trompeuse. Pourtant, nombre des études évaluées par l'EPA n'utilisent pas la source protéique appropriée : par exemple, l'EPA enregistre le maïs Bt11 sur la base d'études utilisant une source protéique bactérienne, tout en exigeant de Novartis « de soumettre une étude utilisant le matériel végétal plutôt que la protéine Cry1Ab d'origine bactérienne » (EPA 2001). Ainsi, alors qu'elle reconnaissait que les toxines Bt constituait un « bien public » et que le matériel végétal était la seule source protéique appropriée pour les tests, l'agence acceptait cependant que la substance test provienne d'une source alternative, à savoir de *Bacillus thuringiensis* ou d'une source industrielle (*Escherichia coli*). L'agence allait jusqu'à justifier l'utilisation de protéine d'origine bactérienne par les industriels en raison des « difficultés d'obtention de quantités suffisantes de protéine végétale pure ». Cette approche scientifique incohérente a beaucoup contribué à la confusion prévalant à l'impact des plantes Bt.

Par ailleurs, les modalités d'administration des toxines insecticides sont aussi différentes : contrairement aux PGM qui produisent constitutivement la toxine (même en l'absence du ravageur), les formulations ne sont appliquées par les agriculteurs que sur les plantes attaquées et les protoxines contenues dans les préparations biologiques sont rapidement dégradées par les UV. Donc, lors des applications en agriculture biologique, les concentrations libérées dans l'environnement sont considérablement plus faibles que celles produites par un champ de PGM. Des chercheurs ont ainsi calculé que le maïs Bt MON 810 produit 1500-3000 fois plus de toxine Cry1Ab que la dose de toxine Cry1Ab correspondant à un traitement unique avec DIPEL® (Skelacs et al. 2005 & 2006). De plus, les différences structurales entre protoxines bactériennes et toxines végétales ont des répercussions sur la décomposition de ces protéines qui est plus lente chez les PGM : la fixation des toxines végétales au complexe argilo-humique les protège d'une dégradation rapide, ce qui entraîne la rétention d'une activité insecticide dans les sols pendant plus de 284 jours (Stotsky 2004).

En ce qui concerne les insectes, le contact peut s'établir par plusieurs voies: par la consommation directe de tissus végétaux, par la consommation d'insectes herbivores cibles ou non cibles, ou par l'environnement (les toxines du sol persistent et conservent leur toxicité). L'eau et la voie fluviale participent aussi à la dissémination des toxines transgéniques Bt (Harwood et al. 2005, Douville et al. 2007), comme le montre la récente mise en évidence de l'impact du maïs Bt sur des environnements aquatiques adjacents aux champs de maïs Bt (Rosi-Marshall 2007). Cette étude montre que la consommation de dérivés

de maïs Bt (pollen, détrit) réduit la croissance et augmente la mortalité d'insectes non cibles des cours d'eau. Ces insectes sont d'importantes proies pour les prédateurs aquatiques, et les auteurs concluent que « *l'extension des cultures Bt a des conséquences inattendues à l'échelle de l'écosystème* » (Rosi-Marshall 2007).

Au niveau épistémologique, l'évaluation des risques environnementaux des PGM génère un débat virulent entre les deux positions extrêmes d'une évaluation étroite ou large de ces risques (voir figure 2). L'interprétation étroite se focalise exclusivement sur le trait inséré (ici, le gène Bt) et postule que le risque dépend du seul produit du transgène inséré (ici, la toxine Bt). Cette interprétation, soutenue par l'USDA, l'EPA et l'Agence Européenne de Sécurité des Aliments (AESAs), ignore l'effet des herbicides sur les plantes tolérantes à un herbicide et les effets inattendus de la modification génétique (pléiotropie, épigénétique...). Par exemple, les dossiers d'enregistrement des plantes Bt utilisent une source de protéine alternative, ce que l'EPA tolère sur la base d'une équivalence des protéines sans expliquer comment des protéines de poids moléculaires différents et différemment glycosylées pourraient être « biochimiquement et fonctionnellement équivalentes ». L'interprétation large, par contre, exige que l'on considère les effets indirects (effets non intentionnels, pléiotropiques...). Au niveau mondial, les différents organismes d'évaluation ont tous adoptés l'approche étroite qui est réductionniste par essence, ce dont pâtit l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux. L'argumentation développée par ces organismes a priori neutre rejette l'approche expérimentale : l'expérimentation est longue et coûteuse en moyens, l'impact des cultures GM est connu (par extrapolation des effets des préparations Bt), la technologie est sûre, rien ne s'est produit de grave depuis dix ans et une bonne gouvernance suffira à régler les éventuels problèmes. Leur conclusion suit logiquement : nul besoin de recherche supplémentaire, dérégulation immédiate des PGM, pas de contrôle nécessaire (EPA 2001). Ainsi, l'EPA justifie l'absence dans le dossier d'enregistrement des plantes Bt d'études portant sur la mutagénicité, la biologie du développement, la toxicité sub-chronique, l'exposition chronique et l'oncogénicité des protéines Bt exprimées (EPA 2001). De même, l'agence n'exige aucune donnée sur les résidus chimiques, ce qu'elle justifie par « l'absence de toxicité chez les mammifères suite à une exposition prolongée » (EPA 2001).

Cette perception pour le moins mécaniste du fonctionnement des écosystèmes souffre de nombreuses critiques et ne résiste pas à un examen approfondi des conséquences de l'introduction des PGM dans les milieux naturels. L'accent mis sur le produit isolé du transgène revient à appliquer une démarche écotoxicologique basée sur le modèle pesticide (voir figure 2). La stratégie consiste alors à exposer une espèce unique à des molécules dans une approche hiérarchisée, en commençant par des tests simples puis en mesurant la réponse toxicologique aigüe : des tests plus complexes (y compris toxicité chronique) ne sont mis en place qu'en cas de résultats inquiétants à un premier test. Ainsi, des organismes non cibles standards sont soumis à des tests suivant le « paradigme des pesticides » : le matériel utilisé est souvent la toxine activée produite par *Escherichia coli*, la durée de ces tests est trop courte, la toxicité à long terme est sous-évaluée. Des chercheurs comme Hilbeck ont fait remarquer que les PGM étaient des plantes, donc des organismes complexes entrant dans les chaînes trophiques et non un produit chimique isolé. De même, la controverse autour de l'impact du maïs Bt sur le papillon monarque démontre que la présence d'anthères (tissus végétaux contenant le pollen) sur la plante hôte du monarque augmente considérablement la toxicité du pollen Bt pour ce même monarque (Jesse & Obricky 2001, Hellmich et al. 2001, Anderson et al. 2004 & 2005, Prasifka et al. 2007). La seule considération de l'impact de la toxine ignore à plus forte raison le fait que la présence de tissus végétaux ou d'autres

molécules peuvent augmenter significativement la toxicité, ce qui aboutit à une sous-évaluation de cette toxicité.

a- Approche Toxicologique

Paramètres mesurés

Consommateurs de maïs
(herbivores, pollinivores)

Mortalité, toxicité directe



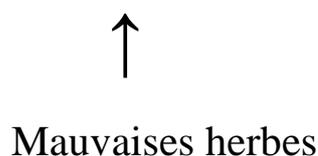
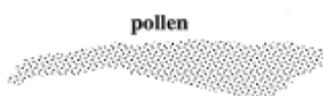
b- Approche Ecologique

Prédateurs

Parasitoïdes

Prédateurs

Parasitoïdes



Paramètres mesurés

Mortalité directe
Effets sub-létaux
Effets trophiques complexes

Figure 2 : Deux approches de l'évaluation des risques environnementaux des plantes Bt.

Une évaluation scientifique sérieuse de l'impact environnemental des PGM devrait donc intégrer tous ces aspects de la complexité des écosystèmes en étudiant les effets intertrophiques, la diffusion des toxines Bt par les déchets végétaux, les exsudats racinaires, la rétention de l'activité insecticide du sol. ... Par exemple, l'expression constitutive du gène dans les plantes Bt (dans tous les organes et à tous les stades de croissance) libèrent dans l'écosystème des toxines Bt de poids moléculaire variable (65, 69 et 91 kDa) ainsi que d'autres fragments (<50, 40 kDa) dont l'activité reste mal connue (Hilbeck & Schmidt 2006). De même, les conséquences inconnues de ces fragments sur les organismes non cibles et les chaînes trophiques ne sont pas étudiées (Figure 3) et la présence de ces fragments Bt dans l'écosystème (Figure 4) rend plausible un impact potentiel sur les organismes non cibles, et par extension sur les services écologiques dépendant de ces organismes (contrôle biologique, recyclage des nutriments...).

Fondamentalement, le problème principal de ces tests excessivement réductionnistes est que l'interprétation de l'évolution des paramètres biologiques suivis est souvent très délicate : le paramètre n'est parfois modifié qu'en fin d'expérience et la pertinence de ce changement est difficile à estimer. Cependant, plus de dix années de cultures Bt ont donné lieu à de nombreuses publications portant sur des effets non intentionnels de la modification génétique et sur les conséquences globales que ces cultures ont sur l'environnement. Ainsi, l'analyse de plusieurs études récentes montre que loin de n'atteindre que les insectes cibles, les cultures Bt ont des conséquences environnementales importantes sur des insectes non cibles (prédateurs, faune non cible des rivières). Des études approfondies (Lovei & Arpaia 2005) ont passé en revue les tests de laboratoire qui étudient l'impact des PGM sur les arthropodes ennemis naturels. Au total, 18 espèces de prédateurs et 14 espèces de parasitoïdes ont été testées, la plupart dans seulement quelques expériences. Certains groupes (Braconidae) ou espèces (*Chrysoperla carnea*) ont fait l'objet de nombreux efforts, alors que les représentants d'autres groupes, y compris des ordres entiers (Diptera), n'ont eu aucune espèce testée. Les tests sur le seul chrysope (Neuroptères) représentent 20% de tous les tests sur prédateurs. Ces auteurs concluent que « *les tests de laboratoire ne constituent en aucun cas un scénario 'catastrophe' et ne sont souvent pas écologiquement réaliste: ils fournissent typiquement de la nourriture ad libitum, pas de choix des proies, un seul type de proies, aucune combinaison de facteurs de stress et températures généralement uniformes* ». Rien de cela n'est représentatif des conditions au champ qui pourraient pourtant être mimées dans des tests de laboratoire plus complexes.

Au niveau statistique, la plupart (94.6%) de ces études n'indiquent pas le niveau de puissance requis pour détecter un impact. Les petites tailles d'échantillon et la grande variabilité des données constituent des facteurs qui masquent les différences d'effets potentiels, sauf si elles sont énormes. Pour les prédateurs, 126 paramètres ont été quantifiés : les plus communément mesurés sont la survie/mortalité (37 cas), le temps de développement (22), et la masse du corps/taille (20). Pour les parasitoïdes, 128 paramètres ont été quantifiés, la majorité concernant les lectines ou les inhibiteurs des protéases. Les mesures les plus fréquentes étaient: fécondité (23 expériences), longévité des adultes, taux de parasitisme (17 chacun), taille du corps, mortalité, et temps de développement larvaire (Tableau 4-8).

Pourtant, les tests statistiques reposent sur des hypothèses à vérifier qui influent sur la validité de leurs résultats (Andow & Hilbeck 2004). Il peut être utile de préciser la principale différence entre les tests paramétriques et non paramétriques. Les tests paramétriques, comme le test de Student (t-test), nécessite que les données aient une 'distribution normale' définie par moyenne et variance (courbe en cloche). Donc, ils représentent un choix correct si les 2

principales conditions sont satisfaites: (1) les données sont normalement distribuées et indépendantes, et (2) leur variance est homogène. Néanmoins, les tests paramétriques sont parfois utilisés pour mesurer la mortalité des insectes (Couty & Poppy, 2001; Duan et al., 2002), et il n'est pas évident que l'hypothèse de distribution normale soit satisfaite. Un nombre faible de réplifications rend moins probable la détection d'un effet. En particulier pour les parasitoïdes, le nombre d'individus est parfois extrêmement bas (Schuler et al., 2003; Pruetz & Dettner, 2004). L'augmentation de la taille des échantillons est la meilleure manière qu'ont les scientifiques de réduire les taux globaux d'erreurs des expériences (Marvier, 2002).

Parmi les lacunes relevées par Lovei et Arpaia en 2005, aucune étude de laboratoire n'a été publiée sur des groupes de prédateurs majeurs comme les staphylinidés, de prédateurs polyphages comme les araignées, ou des prédateurs sociaux comme guêpes et fourmis. En ce qui concerne les analyses statistiques, seules 2 des 14 revues publiées depuis 2000 ont discuté le protocole expérimental et l'analyse des données. Certains auteurs (Lundgren & Wiedenmann, 2002; Romeis et al., 2004) ont publiés des analyses de puissance rétrospectives. Cela est toutefois incorrect, à cause de l'interdépendance des types d'erreur I et II (Hoenig & Heisley, 2001). La pseudo réplification est un autre problème statistique qui se produit en matière de biosécurité des OGM. Des exemples de pseudo réplification dans des études de laboratoire avec *Chrysoperla carnea* sont discutés dans Andow & Hilbeck (2004).

Un point final qui mérite considération est le niveau de base acceptable de mortalité dans les contrôles d'expériences de laboratoire. Un certain niveau de mortalité, provoquée par les conditions artificielles du laboratoire, est inévitable. Un taux de mortalité d'environ 15 à 20% (Zwahlen et al., 2000; Burgess et al., 2002) peut être considéré comme acceptable, tandis que plusieurs expériences rapportaient une mortalité bien plus élevée des groupes contrôle (Down et al., 2003). Des différences peuvent exister même quand le même système biologique est utilisé. En laboratoire, la mortalité des larves de chrysope (*C. carnea*) consommant *Spodoptera littoralis* nourris de plantes contrôle varie entre 16% (Hilbeck et al., 1998a) et 27% (Dutton et al., 2003). Une mortalité élevée des groupes contrôle peut affecter l'issue des analyses statistiques et masquer un effet significatif.

De nombreuses études sur le chrysope *C. carnea* (Hilbeck et al., 1998b; Romeis et al., 2004) et celles sur la coccinelle *Adalia bipunctata* (Birch et al. 1999, Down et al. 2003) soulignent que des impacts significatifs ne peuvent pas être complètement explorés en suivant une approche écotoxicologique. Par exemple, les prédateurs au champ font l'expérience de températures variables, du choix des proies entre plusieurs types différents, de pénurie alimentaire, et des risques de prédation. Tous ces facteurs constituent des stress variables, et l'impact d'un stress potentiel additionnel (toxique ou proie suboptimale, comme conséquence de se nourrir sur une plante GM) est modulé par ces facteurs. Un 'scénario catastrophe' devrait inclure ces éléments importants des conditions au champ. En conclusion, nous devrions considérer que l'existence de stress multiples constitue la norme au champ, et non l'exception, que les organismes réagissent souvent de manière non linéaire à ces stress combinés (Stamp et al., 1997), et nous devrions au moins essayer d'imiter ces conditions en laboratoire. Lovei & Arpaia (2005) estiment que « *le biais global vers les impacts négatifs des PGM est un signal que l'on devrait considérer sérieusement. Ces impacts négatifs sont trop nombreux pour les rejeter comme non significatifs ou non pertinents. Nous ne pouvons pas rétrospectivement les découpler de la valeur sélective, prétendant qu'ils ne sont pas écologiquement importants* ».

Pour ces auteurs, « *le regroupement agrégatif (résumant tous les paramètres quantifiés) indique que les tests de laboratoire quantifient un nombre remarquable de cas (30% des prédateurs, 39.8% des parasitoïdes) dans lesquels les impacts des PGM étaient significativement négatifs. Bien que les paramètres, les organismes, les méthodes et les niveaux de significativité des tests varient, collectivement ces résultats indiquent que l'utilisation des cultures génétiquement modifiées peut mener à des effets négatifs sur les ennemis naturels des ravageurs de cultures* » (voir tableau 6-8).

Enfin, l'évaluation de l'impact environnemental des PGM sur l'abondance relative des groupes d'insectes en plein champ se fait souvent par comparaison avec un champ conventionnel traité par des insecticides chimiques, ce qui permet aux auteurs de conclure que l'abondance relative des insectes est plus grande dans les champs Bt. Ce résultat n'est pas étonnant puisque l'on sait pertinemment que les insecticides chimiques utilisés ont un spectre large et que leur impact sur les insectes est moins ciblé que celui des toxines Bt. Par contre, Marvier et al. (2007) soulignent que par rapport à des champs non traités, l'abondance relative des insectes non cibles est moins grande dans les champs Bt. Il y a donc bien un impact des toxines Bt produites par les PGM sur l'abondance des insectes au champ. La comparaison à un témoin nul (pas de traitement) est pourtant essentielle pour évaluer la biosécurité des plantes transgéniques : cette absence de témoin nul est méthodologiquement inacceptable d'autant que l'Institut Rodale montre depuis des décennies la validité des performances de l'agriculture biologique (Pimentel et al. 2005). Cette absence de témoin nul ne permet pas d'évaluer l'éventuelle toxicité intrinsèque des plantes GM mais seulement de la comparer à la toxicité de substances toxiques connues. Marvier et al. (2007) publient un index d'abondance dans les champs Bt que nous avons synthétisé (tableau 7-8) : ce tableau montre clairement que des groupes non cibles (hyménoptères par exemple), qui ne devraient pas être atteints par la toxine du maïs Bt, subissent cependant un impact négatif. La même conclusion est valable pour les trois variétés testées (maïs résistant à la pyrale, maïs résistant à la chrysomèle et coton résistant au ver rose du coton). De nombreux groupes d'insectes sont ainsi affectés alors qu'ils ne sont pas ciblés par la culture GM : cet état de fait pourrait bien être une conséquence de l'altération de la structure des protéines produites dans la plante Bt et des modifications d'activité qui en découlent.

La question de l'impact des plantes Bt sur les insectes est donc loin d'être résolue : les modifications structurales, la résilience des toxines Bt dans le sol exposent des organismes non cibles à ces substances insecticides. Ces organismes remplissent des fonctions écologiques capitales comme le contrôle biologique, la pollinisation ou le recyclage de la matière organique. Les tests écotoxicologiques effectués sur les abeilles par exemple ne peuvent pas exclure que les abeilles puissent être affectées par les toxines du maïs Bt : les situations de laboratoire sont difficilement extrapolables à la nature et surtout, les toxines Bt utilisées dans ces tests ne sont souvent pas la toxine active présente dans la plante GM. De plus, certaines études qui étudient l'impact de cultures Bt sur les abeilles utilisent des semences transgéniques enrobées de traitement insecticide et/ou fongicide, 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. Dans d'autres cas, les études sont effectuées sur une seule année, sans réplication qui permette de rendre compte de la variabilité interannuelle (densité des insectes, météorologie).

En conclusion, plus d'une décennie de cultures Bt ont révélé un certain nombre de points qui paraissent incontestables et qui devraient impérativement être pris en compte pour les futures évaluations :

- 1) Toujours utiliser la toxine pertinente pour les tests (en général, celle produite par la PGM),
- 2) Construire des protocoles scientifiques sérieux (protocole, durée de l'expérience, nombre d'échantillons, répétitions et traitements statistiques, puissance statistiques des tests...),
- 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).

Depuis l'introduction des PGM, en particulier des plantes insecticides, les impacts environnementaux de ces cultures ont été nié sur la base d'arguments fallacieux (la prétendue identité des toxines végétales et bactériennes) et plus choquant pour des scientifiques, sans expérimentation. Les résultats des rares expérimentations menées en laboratoire sont assez généralement interprétées comme preuves d'une absence d'impact : cette absence d'impact dans un essai limité est réinterprétée comme preuve d'une innocuité au champ des cultures Bt, alors que les protocoles de ces essais ne permettent pas de conclure en une absence d'effets au champ. D'ailleurs, des impacts réels constatés in natura devraient inciter à la prudence les organismes chargés de l'évaluation de ces PGM. Seul un suivi environnemental long et coûteux pourrait permettre d'évaluer avec rigueur l'impact de ces cultures GM sur la biodiversité et les processus écologiques irremplaçables, mais cela ne semble pas la préoccupation majeure des responsables des organismes d'évaluation qui homologuent la plupart des PGM mises sur le marché.

Le problème important est lié à l'évaluation scientifique des PGM. Tant au niveau environnemental que sanitaire, le concept d'équivalence en substance a été substitué à une évaluation toxicologique classique. « Si un nouvel aliment est substantiellement équivalent en composition et caractéristiques nutritionnelles à un aliment existant, il peut être considéré comme aussi sûr que l'aliment conventionnel » (SOT, 2003). Pourtant, comme le note Domingo (2007), « l'application du concept d'équivalence en substance n'est pas une évaluation de la sûreté en soi, il permet l'identification de différences potentielles entre les aliments existants et le nouveau produit, dont l'impact toxicologique devrait alors être étudié. C'est un point de départ plutôt qu'un point final (Kuiper et al. 2002) ». Dès l'introductions du concept, certains critiques ont jugé le concept comme indéfini et inacceptable: « l'équivalence en substance est un concept pseudo scientifique car c'est un jugement commercial et politique minant d'être scientifique. Il est, en plus, anti-scientifique de manière inhérente car crée essentiellement pour servir d'excuse à l'absence de tests biochimiques ou toxicologiques. Il sert donc à décourager et inhiber une recherche scientifique riche d'informations" (Millstone et al. 1999).

L'ambiguïté du concept n'a jamais convaincu la communauté scientifique : deux molécules déclarées équivalentes ne le sont que sur la base d'une comparaison limitée de certaines caractéristiques (composition et nutrition) et restent deux molécules différentes. Or, une stricte équivalence compositionnelle et nutritionnelle n'exclue pas que des constituants minoritaires du nouvel aliment puissent avoir une toxicité significative. Malheureusement, dans la plupart des cas, l'équivalence en substance est considérée par les organismes

d'évaluation comme le point final de l'évaluation, ce qui explique pourquoi Domingo (2007) trouve aussi peu de publications sur les risques sanitaires des aliments GM. Il conclue ainsi sa revue : « cette revue pourrait se conclure sur la question suivante : où sont les preuves scientifiques montrant que les plantes /aliments GM sont toxicologiquement sains? »