



**Notification conforme à la Directive 2001/18/CE,
Partie B, demande d'autorisation pour expérimentation au
champ pour le maïs
génétiquement modifié MON 89034
France**

TABLE DES MATIERES

ANNEXE IIIB conformément aux exigences de la Directive Européenne 2001/18/CE. Ce dossier décrit la modification génétique des lignées et de variétés hybrides de maïs génétiquement modifiés (PSGM).		10
A.	INFORMATION D'ORDRE GENERAL	10
1.	Nom et adresse du notifiant (société ou institut)	10
2.	Noms, qualifications et expérience des scientifiques responsables	10
3.	Titre du projet	10
B.	INFORMATION CONCERNANT (A) LES PLANTES RECEPTRICES OU (B) (SI APPROPRIE) LES PLANTES PARENTALES	11
1.	Nom complet :	11
(a)	Nom de famille: Poaceae (Anciennement Gramineae)	11
(b)	Genre: <i>Zea</i>	11
(c)	Espèce: <i>mays</i> (2n=20)	11
(d)	Sous-espèce: N/A	11
(e)	Cultivar / lignée: événement MON 89034	11
(f)	Nom usuel: maïs	11
2.		
(a)	Informations concernant la reproduction	11
(i)	Mode(s) de reproduction	11
(ii)	Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la reproduction	12
(iii)	Temps de génération	12
(b)	Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces végétales sauvages ou cultivées, y compris la répartition en Europe des espèces compatibles	12
(i)	Fécondation croisée avec les variétés cultivées <i>Zea</i>	12
(ii)	Fécondation croisée avec des variétés sauvages <i>Zea</i>	12
3.	Capacité de survie	13
a)	Capacité à former des structures de survie ou de dormance	13
b)	Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la capacité de survie	13
4.	Dissémination	13
a)	Forme et étendue de la dissémination	13
b)	Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la dissémination	14
5.	Distribution géographique de la plante	14
6.	Pour les espèces végétales qui ne poussent pas habituellement dans les Etats Membres, description de l'habitat naturel de la	14

plante, y compris les informations sur les prédateurs naturels, les parasites, les concurrents et les symbiotes	15
7. Autres interactions potentielles, pertinentes pour l'OGM, de la plante avec des organismes dans l'écosystème habituel ou ailleurs, y compris les informations sur la toxicité pour l'homme, les animaux et autres organismes	15
C. INFORMATION CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE.....	16
1. Description des méthodes utilisées pour la modification génétique.....	16
2. Nature et source du vecteur utilisé.....	16
3. Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion.	18
D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE.....	22
1. Description du ou des caractères et des caractéristiques qui ont été induits ou modifiés	22
2. Information sur les séquences réellement insérées ou délétées	23
a) Taille et structure de l'insert et méthodes utilisées pour sa caractérisation, avec indication des parties de vecteur induites dans la plante supérieure génétiquement modifiée ou de tout ADN vecteur ou étranger restant dans la plante supérieure génétiquement modifiée.....	23
b) En cas de délétion, taille et fonction des régions supprimées	24
c) Nombre de copie de l'insert	24
d) Localisation de l'insert dans les cellules de la plantes (intégré au chromosome, aux chloroplastes ou aux mitochondries, ou sous forme non intégré), et méthodes utilisées pour sa détermination	24
3. Informations concernant l'expression de l'insert.....	24
a) Informations concernant l'expression évolutive de l'insert durant le cycle de vie de la plante et les méthodes utilisées pour sa caractérisation.....	24
b) Parties de la plante où l'insert est exprimé (par exemple les racines, la tige, le pollen, etc.).....	30
4. Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice	30
5. Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante supérieure génétiquement modifiée.	31
6. Toute modification de la capacité de la plante supérieure génétiquement modifiée à transférer du matériel génétique à d'autres organismes.....	31

7.	Information concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultant de la modification génétique sur la santé humaine.	32
8.	Information concernant la sécurité de la plante supérieure génétiquement modifiée pour la santé des animaux notamment en ce qui concerne tout effet toxique, allergisant ou autre effet nocif résultant de la modification génétique, lorsque la PSGM est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux.....	35
9.	Mécanisme d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant).....	35
10.	Modifications potentielles des interactions de la plante supérieure génétiquement modifiée avec les organismes non-cibles résultant de la modification génétique.....	36
11.	Interactions potentielles avec l'environnement abiotique.	37
12.	Description des méthodes de détection et d'identification de la plante génétiquement modifiée.....	38
13.	Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée.....	38
E. INFORMATION CONCERNANT LES SITES DE DISSEMINATION (SEULEMENT POUR LES NOTIFICATIONS SOUMISES SUIVANT LES ARTICLES 6 ET 7).....		38
1.	Localisation et étendue des sites de dissémination	38
2.	Description de l'écosystème des sites de dissémination, y compris le climat, la flore et la faune.....	39
3.	Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces cultivées végétales sexuellement compatibles	39
4.	Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées.....	40
F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION (SEULEMENT POUR LES NOTIFICATIONS SOUMISES SUIVANT LES ARTICLES 6 ET 7).....		40
1.	Objectifs de la dissémination	40
2.	Date(s) et durée prévues de l'opération	41
3.	Méthode de dissémination envisagée	41
4.	Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et les modes de récoltes	42
5.	Nombre approximatif de plantes (ou de plantes par mètre carré)	42
G. INFORMATION SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, de contrôle, ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES		

DISSEMINATION (SEULEMENT POUR LES NOTIFICATIONS SOUMISENT SUIVANT LES ARTICLES 6 ET 7).....

43

1. Précautions prises :..... 43
 - a) Distance(s) des autres espèces végétales sexuellement compatibles, espèces parentales sauvages et cultivées..... 43
 - b) Mesures visant à minimiser ou à empêcher la dissémination de tout organe reproducteur de la plante supérieure génétiquement modifiée (par exemple pollen, graines, tubercules) 43
2. Description des méthodes de traitement du site après dissémination..... 44
3. Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets 45
4. Description des plans et des techniques de surveillance 45
5. Description des plans d'urgence..... 45
6. Méthodes et procédures de protection du site 46

H. CONCLUSIONS CONCERNANT LES INCIDENCES POTENTIELLES SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA DISSEMINATION OU DE LA MISE SUR LE MARCHE DU OU DES OGM 46

Cette analyse du risque environnemental suit le plan de l'annexe II (Directive 2001/18/CE) 46

1. Probabilité que les PSGM deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels..... 46
2. Avantages ou désavantages sélectifs conférés aux PSGM..... 48
3. Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation de la PSGM et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales..... 49
4. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement (le cas échéant)..... 50
5. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et des organismes non cibles (compte tenu également des interactions d'organismes avec les organismes cibles), notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes (le cas échéant), parasites et agents pathogènes..... 52
6. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles

entre les PSGM et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les PSGM disséminées ou se trouvant à proximité.....	55
7. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquences pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de l'OGM ou de tout produit dérivé s'il est destiné à être utilisé en tant qu'aliment pour animaux	56
8. Incidences immédiates et/ou différées que les processus biogéochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de l'OGM et des organismes cibles et non cibles à proximité du ou des OGM disséminés	57
9. Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte utilisées pour les PSGM peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées	58
Liste des références	60

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte détaillée du plasmide PV-ZMIR245.....	17
Figure 2. Représentation schématique des domaines de similarité de la protéine Cry1A.105 et des protéines Cry1Ac, Cry1Ab, et Cry1F.....	18

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. résumé des éléments génétiques avant l'insertion.....	20 21
Tableau 3. Résumé des niveaux de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans les échantillons de feuilles du maïs provenant des essais au champ conduits aux U.S.A. en 2005	26
Tableau 4. Résumé des niveaux de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans les échantillons de tissus de racines du MON 89034 obtenus en 2005 dans des essais au champ aux U.S.A.	27
Tableau 5. Résumé des niveaux de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans les échantillons de tissus de plantes entières, de fourrage, et de la paille du MON 89034 obtenus en 2005 dans des essais au champ aux U.S.A.....	28
Tableau 6. Résumé des niveaux de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans les échantillons de soies, pollen et grains du MON 89034 obtenus en 2005 dans des essais au champ aux U.S.A.	29

Liste des abréviations

Abbreviations		Abréviations	
~	Approximately	~	Approximativement
ADF	Acid Detergent Fiber		Résidu détergent acide
bp	Base pair	pb	Pair de base
Bt	Bacillus thuringiensis	Bt	Bacillus thuringiensis
CEW	Corn earworm	CEW	Chenille des épis du maïs
Cry	Proteins from <i>Bt</i>	Cry	Protéines de <i>Bt</i>
CTP	Chloroplast transit peptide	CTP	Chloroplaste transit peptide
dw	Dry weight	ps	Poids sec
DNA	Deoxyribonucleic acid	ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
ECB	European Corn Borer	ECB	Pyrale du maïs
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA	essai d'immuno-absorption enzymatique
ERA	Environment Risk Assessment	ERA	Evaluation du Risque Environnemental
E.U.	European Union	U.E.	Union Européenne
F	Filial generation	F	Génération fille
fw	Fresh weight	pf	Poids frais
GMHP	Genetically Modified Higher Plant	PSGM	Plante Supérieure Génétiquement Modifiée
GMO	Genetically Modified Organism	OGM	Organisme Génétiquement Modifié
H	Hybrid	H	Hybride
IPM	Integrated Pest Management	IPM	Lutte Intégrée
IRM	Insect Resistance Management	IRM	Gestion de la Résistance aux Insectes
kb	Kilobase	kb	Kilobase
kDa	Kilodalton	kDa	Kilodalton
mRNA	Messenger RNA	ARNm	ARN messenger
MW	Molecular weight	PM	Poids Moléculaire
NDF	Neutral Detergent Fiber	NDF	Résidu de détergent neutre

OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OSL	Overseason leaf	OSL	Feuilles collectées à différents stades de développement du maïs
OSR	Overseason root	OSR	Racines collectées à différents stades de développement du maïs
OSWP	Overseason whole plant	OSWP	Plantes entières collectées à différents stades de développement du maïs
PCR	Polymerase chain reaction	PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PV-ZMIR245	Plasmid vector used to develop MON 89034	PV-ZMIR245	Plasmide vecteur utilisé pour développer MON 89034
RNA	Ribonucleic acid	ARN	Acide Ribo-Nucléique
R ₀	Transformed plant		
RP	Recurrent plant		
SD	Standard deviation	ET	Ecart Type
spp.	Species	spp	Espèces
T-DNA	Transferred DNA	ADNt	ADN de transfert
T-DNA I	Transferred DNA containing the <i>cry1A.105</i> and <i>cry2Ab2</i> expression cassettes	T-ADN I	ADN de transfert I contenant les cassettes d'expression <i>cry1A.105</i> et <i>cry2Ab2</i>
T-DNA II	Transferred DNA containing the <i>nptII</i> expression cassette	T-ADN II	ADN de transfert II contenant la cassette d'expression <i>nptII</i>
TI	Trait integration		
TDF	Total Dietary Fiber	TDF	Fibres Alimentaires totales
U.S.A.	United States of America	U.S.A.	Etats Unis d'Amérique

* [Standard abbreviations, e.g., units of measure, will be used according to format described in "Instructions to Authors" in the *Journal of Biological Chemistry*]

ANNEXE IIIB conformément aux exigences de la Directive Européenne 2001/18/CE. Ce dossier décrit la modification génétique des lignées et de variétés hybrides de maïs génétiquement modifiés (PSGM).

A. INFORMATION D'ORDRE GENERAL

1. Nom et adresse du notifiant (société ou institut)

MONSANTO AGRICULTURE France SAS
Europarc du Chêne
1, rue Jacques Monod
69673 Bron Cedex

2. Noms, qualifications et expérience des scientifiques responsables

L'ensemble des données présentées dans ce dossier ont été produites sous la supervision de scientifiques reconnus sur le plan international dans les laboratoires de Monsanto aux Etats-Unis.

La rédaction de ce dossier a été réalisée par l'équipe des affaires réglementaires de Monsanto Europe, dont les responsables possèdent une longue expérience dans le domaine des biotechnologies végétales.

Au sein de Monsanto France, les responsables du projet, ingénieurs et techniciens d'expérimentation, peuvent faire état de plusieurs années d'expérience en matière d'essais au champ avec des plantes génétiquement modifiées, notamment dans le domaine du maïs transgénique.

3. Titre du projet

Programme d'expérimentation annuel (2007), pour le développement de lignées et d'hybrides de maïs transgéniques MON 89034, protégés contre certains insectes nuisibles lépidoptères, tel que la Pyrale du maïs (ECB, *Ostrinia nubilalis*).

MON 89034 a été développé par Monsanto Company.

**B. INFORMATION CONCERNANT (A) LES PLANTES RECEPTRICES
OU (B) (SI APPROPRIE) LES PLANTES PARENTALES**

1. Nom complet :

- (a) **Nom de famille: Poaceae (Anciennement Gramineae)**
- (b) **Genre: *Zea***
- (c) **Espèce: *mays* (2n=20)**
- (d) **Sous-espèce: N/A**
- (e) **Cultivar / lignée: événement MON 89034**
- (f) **Nom usuel: maïs.**

Le maïs appartient à la tribu des Maydeae, qui est inclus dans la sous-famille des Panicoideae de la famille des Gramineae. Les genres de la tribu des Maydeae sont *Zea* et *Tripsacum* dans l'hémisphère Ouest et *Coix*, *Polytoxa*, *Chionachne*, *Schlerachne*, et *Trilobachne* en Asie.

2.

(a) Informations concernant la reproduction

(i) Mode(s) de reproduction

Le maïs (*Zea mays* L.) est une plante à reproduction sexuée. Le maïs est une espèce pollinisée par le vent, monoïque possédant deux inflorescences distinctes, les fleurs mâles (groupées en panicules) et femelles (soies) qui participent et favorisent la pollinisation du maïs en grande partie par fécondation croisée.

- les fleurs mâles, groupées en panicule au sommet de la tige, ne portent que des étamines entourées de glumelles. Elles apparaissent les premières (protandrie).
- les fleurs femelles, groupées en un ou plusieurs épis à l'aisselle des feuilles, n'apparaissent que par leurs longs styles appelés 'soies' sortant des bractées ou spathes entourant chaque épi. Chaque fleur contient un ovaire unique.

Ce sont les mouvements du vent à travers un champ de maïs qui permettent au pollen de la fleur mâle (panicule) d'une plante de se déposer sur la fleur femelle (soie) de la même plante ou d'une plante voisine.

L'autofécondation conduit à l'homogénéité des caractéristiques génétiques à l'intérieur d'une seule plante alors que la fécondation croisée combine les caractéristiques génétiques de plusieurs plantes.

(ii) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la reproduction

Le développement des panicules et des soies ainsi que la pollinisation sont les étapes les plus critiques du développement du maïs. Par conséquent, l'humidité et des problèmes de fécondation peuvent fortement impacter le rendement. En conditions de fortes température (Herrero and Johnson, 1980) et de dessiccation (Hoekstra *et al.*, 1989), la viabilité du pollen du maïs se mesure en minutes ; ces conditions peuvent souvent détériorer les panicules sans qu'aucun pollen viable ne soit émis (Lonnquist and Jugenheimer, 1943). Des conditions plus modérées peuvent augmenter la durée de vie du pollen au champ à quelques heures (Jones and Newell, 1948).

(iii) Temps de génération

Le maïs est une plante annuelle ayant un cycle de culture allant du semis à la récolte estimé environ à 7-8 mois (Shaw, 1988). Le semis en France a lieu à partir des mois de mars-avril.

(b) Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces végétales sauvages ou cultivées, y compris la répartition en Europe des espèces compatibles

(i) Fécondation croisée avec les variétés cultivées *Zea*

Le maïs est une plante pollinisée par le vent. Les distances parcourues par le pollen dépendent des vents dominants, de l'humidité et de la température ambiante. Tous les espèces de maïs peuvent s'inter-féconder, à l'exception de certaines variétés de maïs popcorn et d'hybrides qui ont un des facteurs gamétophyte des séries alléломorphe *Ga* et *ga* sur le chromosome 4 (OECD, 2003). Le pollen d'un hybride spécifique peut être transporté par le vent pour féconder d'autres hybrides de maïs denté, de maïs doux et de maïs popcorn, si celui-ci ne possède pas le facteur gamétophyte stérile (Hallauer, 1995). De plus, le pollen du maïs se déplace librement à l'intérieur d'une même région, des mêmes terres sur les soies d'une même variété ou de différentes variétés, et germe presque immédiatement après la fécondation.

(ii) Fécondation croisée avec des variétés sauvages *Zea*

Il n'existe pas d'espèce sauvage proche du maïs en Europe. Il n'y a pas d'hybridation interspécifique possible en France du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément sur le territoire français.

3. Capacité de survie

a) Capacité à former des structures de survie ou de dormance

Le maïs est une plante annuelle qui se reproduit par graines et ne présente pas de moyens de reproduction végétative en conditions naturelles en Europe.

b) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Le maïs est une plante qui ne peut pas survivre sans l'aide de l'homme et n'est pas capable de survivre comme une espèce sauvage, et ceci en raison des étapes de sélection réalisées autour de son évolution.

Le maïs ne se retrouve pas en tant qu'adventices dans les fossés, bordures de route.

Bien que les semences de maïs d'une année de culture précédente peuvent survivre dans des conditions d'hiver doux et conserver une capacité de germination l'année suivante, il n'y a pas de repousses à la suite d'une culture de maïs (Hallauer, 1995; OECD, 2003).

La repousse du maïs d'une année sur l'autre est rare en Europe.

En Europe, les quelques repousses de maïs sont tuées en hiver par le froid et sont facilement gérées par les pratiques agricoles courantes dont le travail du sol et l'utilisation des herbicides sélectifs.

La survie des grains de maïs dépend de la température, de l'humidité des semences, du génotype, de la protection grâce aux spathes et de son stade de développement (Rossman, 1949).

Les faibles températures ont un effet inverse sur la germination des semences de maïs et ont été identifiées comme un risque majeur dans la production des semences de maïs (Wych, 1988). Les températures approchant des 45°C provoquent également un préjudice considérable pour la viabilité des semences de maïs (Craig, 1977).

4. Dissémination

a) Forme et étendue de la dissémination

La dissémination peut se produire par dispersion de graine et de pollen. La dispersion des grains de maïs cultivés est fortement limitée par la structure en épis regroupant les grains et protégés par des spathes.

En raison de sa masse et taille relativement importantes (90 – 100 µm), la grande majorité du pollen de maïs ne se déplace pas à plus de quelques mètres en quantité significative de son lieu de production.

La plupart du pollen de maïs se répartit à moins de cinq mètres du bord du champ (Pleasant *et al.*, 2001; Sears and Stanley-Horn, 2000). Hansen, (1999) a montré qu'entre 0,1 et 3 m d'un champ de maïs *Bt*, le

dépôt du pollen retrouvé sur les feuilles voisines décroît très significativement. Les études Sears et Stanley-Horn ont montré que 99% du pollen de maïs total ont été mesurés à 50 m et que les 100% se retrouvaient dans les 100 m du lieu d'émission (Sears and Stanley-Horn, 2000).

Dans une étude portant sur la fécondation croisée du maïs en France (AGPM, 1999), le flux du pollen a été mesuré par le taux de réussite de la fécondation des maïs à proximité ; ce dernier décroît rapidement et atteint 1% à une distance de 10 m de la source d'émission du pollen.

Une autre étude confirme que, en moyenne, presque tout le pollen du maïs ne se déplace pas à plus de 100 m bien qu'une distance précise de limite maximale ne soit pas facile à mettre en évidence (Devos *et al.*, 2005) tandis que le phénomène de pollinisation croisée est à peine détectable à 200 m (<0,1%) (Halsey *et al.*, 2005) et inexistant à 300 m (Luna *et al.*, 2001). Presque toute la pollinisation croisée se réalise dans les 30 m de la culture émettrice.

b) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la dissémination

A la différence des plantes sauvages, le maïs possède une floraison femelle avec de « multiples » fleurs sur un épi central. En conséquence, la dispersion des semences grain à grain ne peut survenir naturellement du fait de la structure des épis de maïs.

La dissémination des grains se fait par le biais de la mécanisation des récoltes et du transport, ou suite aux dégâts d'insectes ou des verses causées par les tempêtes provoquant la chute de grains sur le sol, où ils pourront échapper à la récolte.

Le matériel génétique peut être disséminé par le mouvement du pollen. La dispersion du pollen de maïs est influencée par la vitesse du vent, sa direction et ses turbulences. Le pollen du maïs est le plus gros de tous les pollens normalement disséminés par le vent, ce qui lui confère un faible niveau d'élévation. La dispersion du pollen de maïs est affectée par son importante taille et un besoin d'installation rapide (Raynor *et al.*, 1972). En plus de ces facteurs de dissémination, la durée de vie du pollen peut être affectée par un dessèchement causé par de fortes températures au moment de l'anthèse.

5. Distribution géographique de la plante

Le maïs, de par ses différentes variétés, pousse sous des conditions climatiques très variées. La plupart des cultures de maïs sont produites sous des latitudes entre 30° et 55°, et il y a relativement peu de maïs cultivé dans le monde à des latitudes supérieures à 47° (Shaw, 1988). La majorité de la production de maïs se trouve dans les zones où les mois les plus chauds ont

une température entre 21 et 27°C ainsi qu'une saison sans gel qui dure entre 120 et 180 jours.

Un niveau de précipitation estivale de 150 mm environ est la limite inférieure pour la production de maïs non irrigué. Il n'y a pas de limite supérieure de précipitation pour la croissance du maïs bien qu'un niveau de précipitation excessif diminuerait les rendements.

6. Pour les espèces végétales qui ne poussent pas habituellement dans les Etats Membres, description de l'habitat naturel de la plante, y compris les informations sur les prédateurs naturels, les parasites, les concurrents et les symbiotes

Le maïs pousse largement en Europe et représente une part importante de la production mondiale. Les régions européennes où la production de maïs est significative, s'étendent du bassin du Danube au sud-ouest de l'Allemagne jusqu'à la mer noire et également du sud de la France jusqu'à la vallée du Pô au nord de l'Italie.

7. Autres interactions potentielles, pertinentes pour l'OGM, de la plante avec des organismes dans l'écosystème habituel ou ailleurs, y compris les informations sur la toxicité pour l'homme, les animaux et autres organismes

Comme d'autres plantes, le maïs cultivé est connu pour interagir avec plusieurs catégories d'organismes dans l'environnement, dont des micro-organismes, la faune sauvage et de nombreux invertébrés résidents du sol ou des plantes. De plus, le maïs est sensible à plusieurs catégories de maladies fongiques et subit des attaques de ravageurs tels que des nématodes, des insectes et des acariens. Parce que le maïs est une bonne source de nourriture, les interactions avec la faune sauvage vertebrée sont très bien connues, comme celles avec les oiseaux et les mammifères qui résident ou prospectent dans les champs agricoles, en bordure de champ, dans les haies ou les fossés.

La sécurité alimentaire du maïs en tant que nourriture pour les hommes et les animaux a pu être mesurée dans le temps. L'OCDE décrit dans un document (OECD, 2002) que des substances non nutritives sont présentes dans le maïs (phytic acid; 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one ; raffinose et à des niveaux faibles des inhibiteurs de la trypsine et de la chymotrypsine) mais sans qu'aucune d'entre-elles ne puisse être considérée comme des éléments nutritifs significatifs nécessaires à la santé humaine (White et Pollack, 1995). A propos des allergies, le maïs n'est pas considéré comme une nourriture communément allergène (OCDE, 2002) et très peu de cas de réactions allergiques suite à une consommation de produits à base de maïs n'ont été mentionnés. En conclusion, la toxicité et le risque

allergique suite à la consommation de maïs ou de produits dérivés semblent être très faibles.

C. INFORMATION CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE

1. Description des méthodes utilisées pour la modification génétique

Le maïs MON 89034 a été développé en utilisant la technique de transformation par *Agrobacterium* à partir de tissus d'embryons immatures de maïs. La technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* est un processus bien documenté de transfert et d'intégration d'ADN exogène dans le génome des plantes. La souche ABI d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant le plasmide PV-ZMIR245 (plasmide Ti), a été utilisée pour transformer les cellules embryonnaires de maïs. Elle contient un plasmide Ti désactivé, sans bordure et gène codant pour la biosynthèse de phytohormones, mais qui permet le transfert de l'ADN de transfert (T-ADN) porté par le plasmide PV-ZMIR245.

Le PV-ZMIR245 est un vecteur possédant deux T-ADN indépendants (Matthews *et al.*, 2001). Chaque ADN de transfert est encadré par une bordure droite et une bordure gauche qui contiennent des séquences facilitant la transformation.

Le premier ADN de transfert (T-ADN I) contient les cassettes *cry1A.105* et *cry2Ab2*. Le second ADN de transfert (T-ADN II) possède le gène marqueur *nptII* qui permet d'identifier les cellules transformées. La cassette *nptII* est ensuite ségréguée des cassettes *cry1A.105* et *cry2Ab2* par utilisation de méthodes de sélection traditionnelle. Ce processus est bien documenté et a été utilisé avec succès pour la transformation du maïs (Miller *et al.*, 2002).

2. Nature et source du vecteur utilisé

La carte détaillée du plasmide PV-ZMIR245 est présentée en figure 1.

Le PV-ZMIR245 possède deux ADN de transfert : T-ADN I qui contient les cassettes *cry1A.105* et *cry2Ab2* tandis que T-ADN II possède la cassette *nptII* dont la description est faite dans le chapitre C.3.

La partie du plasmide PV-ZMIR245 (présente entre les 2 T-ADN) qui n'a pas été intégrée dans le génome du maïs lors de la transformation contient deux origines de réplication (*ori*) nécessaires à la réplication et au maintien du plasmide dans la bactérie. De plus, elle possède un gène marqueur *aad* qui code pour une enzyme qui modifie certains aminoglycosides tels que spectinomycine et streptomycine et par conséquent confère la résistance à ces mêmes antibiotiques.

La présence des séquences codantes *cry1A.105* et *cry2Ab2*, l'absence de la séquence codante *nptII* et des séquences à l'extérieur des T-ADNs, dans MON 89034 ont été confirmées par des analyses Southern blot (voir D. 2.a.).

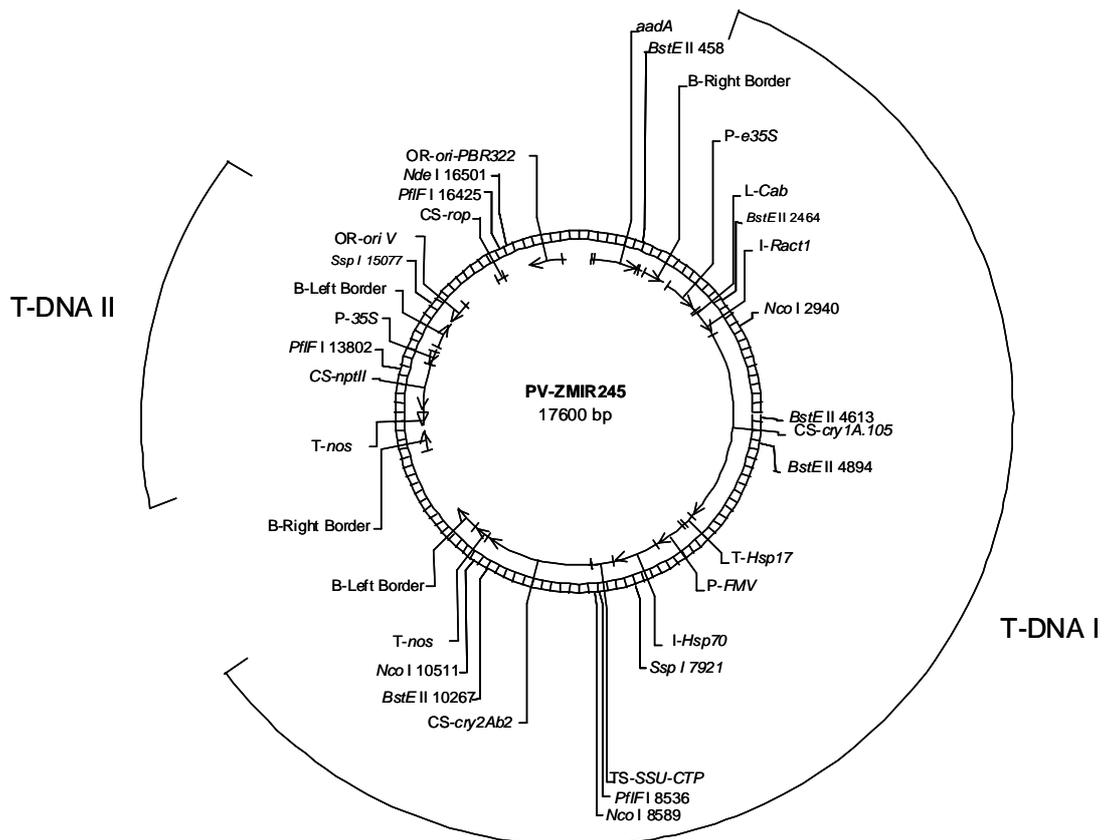


Figure 1. Carte détaillée du plasmide PV-ZMIR245

Le plasmide vecteur PV-ZMIR245 contient deux ADN de transfert (T-ADN I et T-ADN II). Seul l'ADN compris entre les bordures droite et gauche sera transféré dans les cellules hôtes du maïs.

3. Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion.

T-DNA I

La séquence codante *cry1A.105* et la protéine Cry1A.105

La cassette *cry1A.105* dont l'expression a été optimisée chez les monocotylédones, possède la séquence codante *CS-cry1A.105* qui code pour la protéine insecticide Cry1A.105. Cette protéine de 133 kDa confère une protection au maïs contre les dégâts causés par des lépidoptères ravageurs. La protéine Cry1A.105 est une protéine modifiée de la protéine Cry1A de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) qui possède des séquences amino-acides identiques pour 90 % à la protéine Cry1Ac, 93,6 % à la protéine Cry1Ac et 76,7 % à la protéine Cry1F. La protéine Cry1A.105 est composée en grande partie des domaines I et II des protéines Cry1Ab et Cry1Ac (100% des séquences amino-acides dans les domaines I et II sont identiques pour ces deux protéines), du domaine III de Cry1F et de la partie terminale (domaine terminal C) en provenance de la protéine Cry1Ac (figure 2).

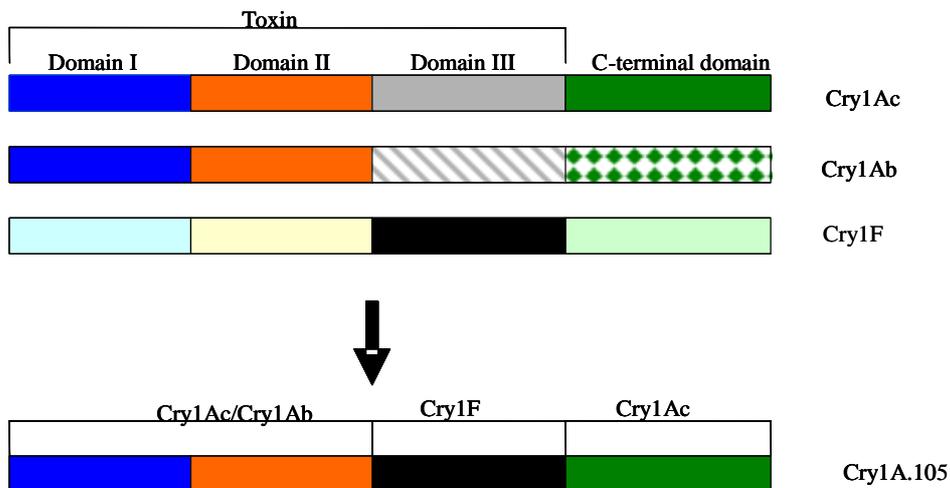


Figure 2. Représentation schématique des domaines de similarité de la protéine Cry1A.105 et des protéines Cry1Ac, Cry1Ab, et Cry1F

Les séquences régulatrices de *cry1A.105*

La séquence codante de *cry1A.105* est soumise à la régulation du promoteur et de la séquence de tête (*P-e35S*) du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) 35 S RNA (Odell *et al.*, 1985) contenant une région amplificatrice dupliquée (Kay *et al.*, 1985), le leader *Cab* de la protéine constituant la

chlorophylle a/b/ du blé (*L-Cab*) (Lamppa *et al.*, 1985), l'intron *Ract 1* du gène de l'actine du riz (*I-Ract1*) (Mc Elroy *et al.*, 1991) et la séquence de terminaison de la transcription (*T-Hsp17*). Cette dernière représente une région 3' non traduite de la séquence codant pour la protéine de choc thermique 17-3 du blé, qui termine la transcription et donne le signal de polyadénylation des ARNm (McElwain and Spiker, 1989) (Figure 1).

La séquence codante *cry2Ab2*, chloroplaste transit peptide et protéine *Cry2Ab2*

La protéine *Cry2Ab2* présente dans le maïs MON 89034 fait partie de la classe des protéines *Cry2Ab* dont elle possède à l'identique plus de 95 % des séquences amino-acides (Crickmore *et al.*, 1998). Il s'agit d'une variante de la protéine originelle *Cry2Ab2* isolée de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Elle est codée par la séquence synthétique CS-*cry2Ab2* (Donovan, 1991 ; Widner et Whiteley, 1989) qui est fusionnée à la région CTP d'une petite sous-unité de la ribulose 1,5-biphosphate carboxilase incluant le premier intron (TS-SSU-CT) (Matsuoka *et al.*, 1987).

Les séquences régulatrices de *cry2Ab2*

La séquence codante de *cry2Ab2* est soumise à la régulation du promoteur *FMV* du virus de la mosaïque « Figwort » (Rogers, 2000), de l'intron *Hsp 70* provenant du gène de la protéine de choc thermique 70 du maïs (Brown and Santino, 1995) et de la séquence de terminaison de transcription *nos* (*T-nos*). Cette dernière est une séquence de terminaison 3' de transcription d'une région codant (Cette dernière est une région 3' non transcrite de la séquence codant) pour la nopaline synthase issue de l'ADN-T, d'*A. tumefaciens* qui stoppe la transcription et induit la polyadénylation (Bevan *et al.*, 1983) (Figure 1).

T-DNA II

Séquence codante *nptII* et la protéine NPTII

La séquence codante *nptII* (CS-*npt II*) code pour la protéine NPTII (néomycine phosphotransférase II) qui confère la résistance à la néomycine et la kanamycine (Beck *et al.*, 1982) en les inactivant par phosphorylation. La cassette exprimant *nptII* a été utilisée au début du processus de sélection juste après la transformation pour sélectionner les cellules contenant les gènes insecticide. Ce gène a été ségrégué par la suite en utilisant la sélection traditionnelle afin d'obtenir des maïs protégés aux attaques des lépidoptères sans ce marqueur.

La séquence régulatrice de *nptII*

La séquence codante *nptII* est sous le contrôle de séquences régulatrices de l'expression (P-35S) du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) 35S RNA (Odell *et al.*, 1985) et de la séquence *nos* de terminaison de la transcription (Figure 1).

Bordures de l'ADN de transfert

Le plasmide vecteur PV-ZMIR245 possède des séquences qui sont nécessaires au transfert de l'ADN de transfert dans la cellule de la plante. Ces séquences sont situées dans les bordures (bordure droite et bordure gauche) qui encadrent chaque ADN de transfert (T-ADN I et T-ADN II) et permettent d'insérer indépendamment chaque T-ADN dans le génome de la plante pendant la transformation.

Ces régions ne sont pas totalement dédiées à l'insertion mais visent à faciliter la transformation.

Les bordures contiennent des séquences de 24-26 bp qui généralement définissent la dimension de l'ADN devant être transféré dans le génome de la plante. La bordure droite présente dans le plasmide PV-ZMIR245 est une séquence de nucléotides (24 bp) qui provient à l'origine du plasmide pTiT37 isolé à partir d' *A. tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982). La bordure gauche du PV-ZMIR245 est une séquence de nucléotides (25 bp) provenant du plasmide pTiA6 (Barker *et al.*, 1983).

Une liste des éléments génétiques concernés pour l'insertion, mentionnant leur taille approximative, origine et fonction est proposée dans le tableau 1.

Tableau 1. résumé des éléments génétiques avant l'insertion

Eléments génétiques	Taille (~kb)	Fonction (Référence)
T-ADN I		
B¹-Right Border	0.36	Région ADN d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contenant la séquence de bordure droite de 24 bp utilisée pour le transfert de l'ADN-T (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
P²-e35S	0.62	Promoteur et séquence de tête du virus de la mosaïque du chou-fleur (Odell <i>et al.</i> , 1985) contenant une région amplificatrice dupliquée (Kay <i>et al.</i> , 1987)
L³-Cab	0.06	Séquence de tête 5' non traduite de la protéine constituant la chlorophylle a/b/ du blé (Lamppa <i>et al.</i> , 1985)
I⁴-Ract1	0.48	Intron du gène de l'actine du riz (McElroy <i>et al.</i> , 1991)
CS⁵-cry1A.105	3.53	Séquence codante pour la protéine Cry1A.105 de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Monsanto données non publiées).
T⁶-Hsp17	0.21	Séquence de terminaison 3' de la transcription de la protéine de choc thermique 17-3 du blé qui termine la transcription et donne le signal de polyadénylation (McElwain and Spiker, 1989)
P-FMV	0.56	Promoteur 35S du virus de la mosaïque « Figwort » (Rogers, 2000)
I-Hsp70	0.80	Premier intron du gène de la protéine de choc thermique 70 du maïs (Brown and Santino, 1995)
TS⁷-SSU-CTP	0.40	Région ADN comportant la séquence de ciblage codant pour le peptide signal de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase ainsi que la séquence du premier intron (Matsuoka <i>et al.</i> , 1987)
CS-cry2Ab2	1.91	Séquence codante pour la protéine Cry2Ab2 de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Donovan, 1991; Widner and Whiteley, 1989). Cette séquence codante nécessite l'usage d'un codon modifié.
T-nos	0.25	Séquence de terminaison 3' de la transcription du gène de la nopaline synthase (<i>nos</i>) d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> qui termine la transcription et donne le signal de polyadénylation (Bevan <i>et al.</i> , 1983)
B-Left Border	0.44	Région ADN d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contenant la séquence de bordure gauche de 25 bp utilisée pour le transfert de l'ADN-T (Barker <i>et al.</i> , 1983)

T-ADN II		
B-Right Border	0.36	Région ADN d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contenant la séquence de bordure droite de 24 bp utilisée pour le transfert de l'ADN-T (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
T-nos	0.25	Séquence de terminaison 3' de la transcription de la séquence codante de la nopaline synthase (<i>nos</i>) d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> qui termine la transcription et donne le signal de polyadénylation (Bevan <i>et al.</i> , 1983)
CS-nptII	0.79	Séquence codante pour la protéine néomycine phosphotransférase II qui confère les résistances à la néomycine et la kanamycine (Beck <i>et al.</i> , 1982)
P-35S	0.32	Promoteur et séquence de tête du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) 35S RNA (Odell <i>et al.</i> , 1985)
B-Left Border	0.44	Région ADN d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contenant la séquence de bordure gauche de 25 bp utilisée pour le transfert de l'ADN-T (Barker <i>et al.</i> , 1983)

1. B - région de bordure. Cette région n'est pas totalement impliquée dans l'insertion mais est utilisée comme outil pour faciliter le transfert de l'ADN-T
2. P - promoteur
3. L – séquence de tête
4. I - intron
5. CS – séquence codante
6. T – séquence de terminaison de la transcription
7. TS – séquence de ciblage

D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE

1. Description du ou des caractères et des caractéristiques qui ont été induits ou modifiés

Le maïs MON 89034 exprime les protéines insecticides Cry1A.105 et Cry2Ab2 et est protégé des dommages causés par la pyrale du maïs (European Corn Borer (ECB) *Ostrinia nubilalis*) et d'autres insectes lépidoptères ravageurs.

Cry1A.105 est une protéine *Bt* Cry1A modifiée tandis que Cry2Ab2 est une protéine de type *Bt* subsp. *kurstaki*. La combinaison des protéines insecticides Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans une seule plante produit un meilleur contrôle sur l'insecte et offre un outil supplémentaire pour la gestion des phénomènes de résistance des insectes (IRM).

2. Information sur les séquences réellement insérées ou délétées

- a) Taille et structure de l'insert et méthodes utilisées pour sa caractérisation, avec indication des parties de vecteur induites dans la plante supérieure génétiquement modifiée ou de tout ADN vecteur ou étranger restant dans la plante supérieure génétiquement modifiée.

L'analyse moléculaire a été réalisée pour caractériser l'ADN inséré dans MON 89034. L'ADN génomique a été digéré en utilisant des enzymes de restriction et soumis aux analyses par Southern Blot pour déterminer :

- le nombre d'inserts (nombre d'insertions d'ADN à l'intérieur du génome du maïs),
- le nombre de copies (nombre de copies de l'ADN intégré à l'intérieur d'un locus)
- la présence en totalité de l'ADN de transfert T-DNA I qui contient les cassettes d'expression de *cry1A.105* et *cry2Ab2*,
- la présence ou l'absence des éléments de l'ADN de transfert T-DNA II qui contient la cassette d'expression de *nptII*
- la présence ou l'absence de la séquence codante *nptII*
- la présence ou l'absence des séquences encadrant les T-DNA sur le plasmide.

Des croisements traditionnels ont été utilisés pour isoler les plantes qui contiennent les cassettes d'expression de *cry1A.105* et de *cry2Ab2* (T-ADN I) et ne contiennent pas la cassette d'expression de *nptII* (T-ADN II).

Les cartes du plasmide vecteur PV-ZMIR245 annotées avec les sondes utilisées dans les analyses par Southern blot sont présentées en figures 3 et 4 de l'annexe jointe à ce dossier. Une représentation schématique de l'ADN linéaire dérivé de T-ADN I du vecteur PV-ZMIR245 inséré dans MON 89034 incluant les sites des enzymes de restriction et les fragments de restriction attendus est schématisée en figure 5 de l'annexe. Les analyses par Southern blot sont présentées sur les figures 6 à 17 de l'annexe. Une description des éléments génétiques insérés, mentionnant leur taille approximative, leur origine et leur fonction est fournie dans le tableau II de l'annexe.

Vous trouverez en annexe le détail des informations concernant ce chapitre 2 – a) ci-dessus.

b) En cas de délétion, taille et fonction des régions supprimées

Ce paragraphe n'a pas lieu d'être renseigné car il ne s'applique pas dans le cas de MON 89034.

c) Nombre de copie de l'insert

Des analyses moléculaires ont été réalisées pour caractériser le fragment d'ADN inséré dans le génome du maïs MON 89034. Celles-ci ont conclu que le génome du maïs MON 89034 ne comportait qu'une unique copie des cassettes d'expression de *cry1A.105* et *cry2Ab2* (voir chapitre D.2.a).

d) Localisation de l'insert dans les cellules de la plantes (intégré au chromosome, aux chloroplastes ou aux mitochondries, ou sous forme non intégré), et méthodes utilisées pour sa détermination

Les analyses des résultats de ségrégation effectuées sur les maïs MON 89034 confirment un site actif unique d'intégration de l'insert correspondant à la cassette d'expression des protéines *cry1A.105* et *cry2Ab2* dans l'ADN génomique. Les analyses Southern Blot ont par ailleurs démontré la stabilité des séquences insérées dans les maïs MON 89034 et cela à travers les générations selon la loi Mendélienne (voir chapitre D.5).

3. Informations concernant l'expression de l'insert

En 2005, plusieurs essais ont été conduits aux U.S.A dont les résultats sont présentés dans cette partie. L'objet des ces essais est de générer des données européennes sur l'expression de l'insert dans les maïs MON 89034.

a) Informations concernant l'expression évolutive de l'insert durant le cycle de vie de la plante et les méthodes utilisées pour sa caractérisation

Des méthodes immuno-enzymatiques ELISA ont été développées et validées afin d'évaluer les niveaux des deux protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans des échantillons de tissus de maïs MON 89034. Les échantillons de tissus ont été collectés sur des plantes provenant d'essais au champ dans cinq sites différents aux U.S.A. Les localisations de ces sites ont été choisies pour être représentatives des principales zones géographiques de la culture commerciale du maïs. Chaque site suit un dispositif de blocs de Fischer à trois répétitions randomisées composé de maïs MON 89034 et du témoin de maïs conventionnel. Les tissus suivants ont été collectés et analysés : des feuilles aux stades V2-V4, V6-V8, V10-V12 et pré-VT (OSL 1-4), des racines aux stades V2-V4, V6-V8, V10-V12 et pré-VT (OSR 1-4), des plantes entières aux stades V2-V4, V6-V8, V10-V12 et pré-VT (OSWP 1-4), du fourrage, de la paille, des racines, des racines

sénescentes, des soies, du pollen et des grains. Tous les niveaux de protéines ont été calculés dans les différents tissus en microgrammes (μg) de protéine par gramme (g) de tissus sur la base du poids frais (pf). La teneur en humidité a été mesurée dans les différents tissus et tous les niveaux de protéines ont été convertis et présentés sur base du poids sec (ps). Les résultats sont présentés dans les tableaux 3, 4, 5 et 6.

Tableau 3. Résumé des niveaux de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans les échantillons de feuilles du maïs provenant des essais au champ conduits aux U.S.A. en 2005

Type ¹ tissu (n=15)	Niveaux protéine Cry1A.105		Niveaux protéine Cry2Ab2	
	Moy (ET) ² Intervalle ³ (µg/g pf)	Moy (ET) Intervalle (µg/g ps)	Moy (ET) Intervalle (µg/g pf)	Moy (ET) Intervalle (µg/g ps)
OSL-1	85 (21) 56 – 130	520 (130) 380 – 850	29 (6.8) 19 – 43	180 (59) 94 – 270
OSL-2	28 (8.7) 12 – 45	140 (36) 80 – 200	32 (5.3) 23 – 44	170 (34) 110 – 230
OSL-3	16 (4.3) 9.4 – 24	72 (14) 47 – 89	29 (5.4) 23 – 41	130 (34) 85 – 200
OSL-4	30 (20) 6.3 – 59	120 (77) 27 – 240	37 (12) 11 – 56	160 (44) 48 – 210

1. Les échantillons de tissus OSL-1, OSL-2, OSL-3 et OSL-4 correspondent respectivement aux stades du maïs V2-V4, V6-V8, V10-V12 et pre-VT.

2. La moyenne et l'écart type (ET) sont calculés pour l'ensemble des sites.

3. Les valeurs minimum et maximum sont déterminées pour chaque type de tissus pour l'ensemble des sites.

Tableau 4. Résumé des niveaux de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans les échantillons de tissus de racines du MON 89034 obtenus en 2005 dans des essais au champ aux U.S.A.

Type ¹ tissu Type (n=15)	Niveaux protéine Cry1A.105		Niveaux protéine Cry2Ab2	
	Moy (ET) ² Intervalle ³ (µg/g pf)	Moy (ET) Intervalle (µg/g ps)	Moy (ET) Intervalle (µg/g pf)	Moy (ET) Intervalle (µg/g ps)
OSR-1	8.9 (1.3) 7.3 – 12	79 (17) 52 – 110	6.4 (1.6) 4.4 – 10	56 (17) 33 – 100
OSR-2	5.8 (1.6) 3.0 – 8.5	48 (11) 30 – 63	7.6 (4.2) 2.5 – 15	58 (18) 25 – 86
OSR-3	6.4 (1.8) 4.4 – 10	45 (10) 26 – 64	5.0 (2.7) 2.2 – 12	35 (17) 15 – 74
OSR-4	6.7 (0.63) 5.6 – 8.1	42 (10) 30 – 63	4.2 (1.2) 3.2 – 7.6	26 (7.7) 15 – 45
Ensilage	2.2 (0.35) 1.3 – 2.7	12 (3.1) 6.2 – 16	4.1 (1.4) 2.2 – 6.5	21 (5.9) 14 – 33
Fin de cycle	2.2 (0.36) 1.7 – 3.1	11 (1.4) 9.4 – 15	5.3 (2.0) 2.4 – 9.1	26 (8.8) 13 – 43

1. Les échantillons de tissus OSR-1, OSR-2, OSR-3 et OSR-4 correspondent respectivement aux stades du maïs V2-V4, V6-V8, V10-V12 et pre-VT.. Les stades ensilage et fin de cycle correspondent respectivement aux stades pré-maturité et après récolte.

2. La moyenne et l'écart type sont calculés sur l'ensemble des sites.

3. Les valeurs minimum et maximum sont déterminées pour chaque type de tissus sur l'ensemble des sites.

Tableau 5. Résumé des niveaux de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans les échantillons de tissus de plantes entières, de fourrage, et de la paille du MON 89034 obtenus en 2005 dans des essais au champ aux U.S.A.

Type ¹ tissu (n=15; excepté chaume, n=12)	Niveaux protéine Cry1A.105		Niveaux protéine Cry2Ab2	
	Mean (ET) ²	Mean (ET)	Mean (ET)	Mean (ET)
	Intervalle ³ (µg/g pf)	Intervalle (µg/g ps)	Intervalle (µg/g pf)	Intervalle (µg/g ps)
OSWP-1	40 (5.7) 30 – 52	380 (90) 230 – 570	13 (4.6) 5.2 – 21	130 (51) 52 – 230
OSWP-2	24 (3.7) 16 – 31	250 (52) 170 – 350	7.5 (1.8) 4.0 – 9.7	79 (18) 45 – 110
OSWP-3	11 (2.4) 7.0 – 15	100 (26) 58 – 160	4.2 (0.94) 2.4 – 5.8	40 (9.9) 22 – 61
OSWP-4	17 (3.7) 9.3 – 22	120 (29) 58 – 170	5.9 (2.6) 0.70 – 11	39 (16) 5.0 – 67
Fourrage	14 (3.6) 8.3 – 24	42 (9.4) 20 – 56	12 (4.0) 6.5 – 18	38 (14) 15 – 55
Chaume	17 (4.4) 9.5 – 26	50 (17) 26 – 85	22 (3.6) 17 – 29	62 (15) 46 – 97

1. Les échantillons de tissus OSWP-1, OSWP-2, OSWP-3 et OSWP-4 correspondent respectivement aux stades du maïs V2-V4, V6-V8, V10-V12 et pré-VT. Fourrage et chaumes correspondent respectivement aux stades pré-maturité et après récolte.

2. La moyenne et l'écart type sont calculés sur l'ensemble des sites.

3. Les valeurs minimum et maximum sont déterminées pour chaque type de tissus sur l'ensemble des sites.

Tableau 6. Résumé des niveaux de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans les échantillons de soies, pollen et grains du MON 89034 obtenus en 2005 dans des essais au champ aux U.S.A.

Type ¹ tissu (n=15)	Niveaux protéine Cry1A.105		Niveaux protéine Cry2Ab2	
	Moy (ET) ²	Moy (ET)	Moy (ET)	Moy (ET)
	Intervalle ³ (µg/g pf)	Intervalle (µg/g ps)	Intervalle (µg/g pf)	Intervalle (µg/g ps)
Soies	3.0 (0.57) 2.0 – 3.8	26 (3.9) 20 – 31	8.2 (3.6) 3.3 – 16	71 (35) 33 – 160
Pollen	6.4 (1.5) 3.8 – 8.8	12 (1.7) 8.5 – 16	0.34 (0.084) 0.21 – 0.47	0.64 (0.091) 0.49 – 0.79
Grain	5.1 (0.67) 4.1 – 6.0	5.9 (0.77) 4.7 – 7.0	1.1 (0.31) 0.67 – 1.8	1.3 (0.36) 0.77 – 2.1

1. Les tissus sont prélevés aux stades du maïs suivants : pour les soies et le pollen : lors de la pollinisation ; pour le grain : à la maturité physiologique.
2. La moyenne et l'écart type sont calculés sur l'ensemble des sites.
3. Les valeurs minimum et maximum sont déterminées pour chaque type de tissus sur l'ensemble des sites.

b) Parties de la plante où l'insert est exprimé (par exemple les racines, la tige, le pollen, etc.)

Les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 ont été mesurées dans les feuilles, les racines, les grains, le fourrage, la paille, les soies et le pollen collectés à différents moments du développement de la plante.

4. Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice

Sur la base de plusieurs siècles d'expérience avec du maïs conventionnel domestiqué en Europe, il y a un potentiel négligeable pour le maïs d'envahir les habitats naturels ou de persister dans un environnement agronomique sans l'aide d'une intervention humaine. En effet, le maïs est connu comme une plante n'ayant qu'un faible pouvoir concurrentiel, qui en dehors de sa mise en culture, n'a pas d'impact significatif sur l'environnement.

L'objectif de ces essais est de réaliser une évaluation comparative des caractéristiques phénotypiques, agronomiques et écologiques du maïs MON 89034 et du maïs conventionnel en Europe.

Ce type d'essais comparatifs au champ a déjà été réalisé aux U.S.A en 2004. Les témoins utilisés étaient des hybrides conventionnels de maïs au patrimoine génétique identique à ceux de MON 89034 à l'exception du caractère conférant la protection à certains lépidoptères. Ainsi vingt-trois variétés de maïs hybrides commerciaux sans le caractère permettant la protection contre des lépidoptères ont permis de définir les valeurs caractéristiques phénotypique et écologique les plus communes du maïs.

Les essais ont été conduits en 2004 sur cinq sites aux USA représentatifs des grandes régions productrices de maïs. L'expérimentation a été réalisée sur chaque site selon un dispositif à base de blocs de Fischer à trois répétitions randomisées par modalité. Le maïs MON 89034 a été statistiquement comparé au maïs témoin site par site et tous sites confondus pour les caractéristiques phénotypiques suivantes:

- la vigueur des plantules
- le comptage de pieds à la levée
- le nombre de jours à partir du semis pour que 50% des pieds émettent du pollen
- le nombre de jours à partir du semis pour que 50% des pieds présentent des soies
- la vitesse de maturité en fin de cycle
- la hauteur d'insertion des épis
- la hauteur des plantes
- l'éventuelle chute d'épis
- les tiges cassées à maturité et la verse racinaire

- comptage du nombre de plantes à la récolte
- la teneur en humidité
- le poids spécifique
- le rendement.

En complément, des observations comparatives basées sur des paramètres écologiques (facteurs de stress biotiques et abiotiques) ont été réalisées.

L'absence de différences significatives relevées dans ces essais sur les caractéristiques phénotypiques ou agronomiques, incluant la morphologie, la croissance, le développement, le rendement, la sensibilité aux espèces nuisibles ou des comportements modifiés vis-à-vis des conditions agronomiques et culturelles conventionnelles indique que l'introduction de la séquence génétique et les protéines encodées n'ont mise en évidence aucun effet inattendu biologiquement significatif. Il est dès lors hautement improbable, que les maïs MON 89034 deviennent plus persistants dans ou à l'extérieur des champs ou aient augmenté leur capacité de survie, leur potentiel à se développer comme mauvaises herbes, ou deviennent plus invasifs dans les habitats naturels que le maïs conventionnel.

En conclusion, d'un point de vue phénotypique, agronomique et environnemental, les hybrides MON 89034 sont identiques aux variétés de maïs conventionnel à l'exception du caractère introduit conférant la protection contre certains lépidoptères. De plus, les résultats n'indiquent pas de différence en terme de sélectivité qui se traduirait pas une augmentation de la présence de maïs MON 89034 en tant que mauvaises herbes comparée à des maïs conventionnels. Par conséquent, aucune différence significative n'est attendue dans le mode et/ou le taux de reproduction, la dissémination des graines de maïs et la capacité de survie.

5. Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante supérieure génétiquement modifiée.

Les analyses moléculaires permettant de conclure à la stabilité génétique de l'insert et à la stabilité phénotypique de la PSGM sont présentées dans la partie annexe de ce dossier.

6. Toute modification de la capacité de la plante supérieure génétiquement modifiée à transférer du matériel génétique à d'autres organismes.

Aucun élément génétique dans les maïs MON 89034 n'a une fonction de transfert génétique. Dès lors, on n'attend aucun changement dans la capacité de ces lignées de maïs ou du MON 89034 de transférer du matériel génétique aux bactéries.

En se basant sur l'observation que la morphologie de la reproduction et le rendement de MON 89034 sont inchangés en comparaison avec du maïs conventionnel, on n'attend aucun changement lié à la modification génétique

dans la production et la viabilité du pollen (voir chapitre D.4). En outre, la fréquence de croisement intraspécifique (avec d'autres variétés de maïs) ou interspécifique (avec des espèces sauvages apparentées qui n'existent pas en Europe) ne devrait pas être différente pour le MON 89034 lorsqu'on le compare avec d'autres variétés de maïs conventionnel.

7. Information concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultant de la modification génétique sur la santé humaine.

Le maïs MON 89034 exprime deux protéines *Bt* Cry1A.105 et Cry2Ab2. Le mécanisme général de l'activité insecticide des protéines Cry est bien connu. Entre les classes de protéines Cry on observe des domaines de fonctionnalité dans des régions communes à beaucoup de ces protéines. Par exemple, la séquence d'acide aminé des protéines Cry1A est très fortement comprise dans les domaines I, II et III. Des domaines de fonctionnalité ont été identifiés comme déterminant la spécificité des protéines Cry : il s'agit des domaines I, II et III constituant la portion toxine. Un domaine terminal C est séparé lorsqu'il entre dans l'intestin de l'insecte. Le domaine I intervient dans l'insertion de la membrane et la formation d'un pore tandis que le domaine II joue un rôle dans la reconnaissance et la fixation au récepteur spécifique comme des études de mutagenèse l'ont montré. Le domaine III joue un rôle dans la fixation au récepteur. La combinaison des domaines I et II a été identifiée comme déterminant la spécificité insecticide. Le domaine terminal C est impliqué dans la formation du crystal (De Maagd *et al.*, 2001). Seuls les insectes possédant des récepteurs spécifiques sont affectés et aucune toxicité n'a été observée chez des espèces ne présentant pas ces récepteurs (Crickmore *et al.*, 1998 ; De Maagd *et al.*, 2001). L'activation des protéines Cry requière des conditions physiologiques spécifiques dans l'intestin de l'insecte liées au pH, à la présence de protéases de l'intestin et des récepteurs des toxines. Cela permet d'expliquer qu'aucune protéine *Bt* ne soit toxique pour les mammifères. Les nombreuses activités des protéines Cry sur un grand nombre d'ordres d'insectes résultent de phénomènes naturels de recombinaison et de l'existence d'une grande diversité des séquences (De Maagd *et al.*, 2003).

Selon un phylogramme reconnu des protéines *Bt* crystal (Crickmore *et al.*, 1998), la protéine Cry1A.105 (produite dans MON 89034) appartient à la classe des protéines *Bt* Cry1A dont les séquences d'acides aminés sont identiques à celles des protéines Cry1Ab, Cry1Ac et Cry1F à hauteur respective de 90 %, 93,6 % et 76,7 %. Un seul acide aminé est différent entre la protéine Cry2Ab2 et sa forme sauvage produite par *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* ; c'est également le cas de la protéine Cry2Ab2 produite dans le coton MON 15985.

Des maïs exprimant les protéines Cry1Ab (maïs MON 810 et ses produits combinés, maïs BT 11 and maïs BT 176) et Cry1F (maïs 1507), aussi bien que le coton produisant la protéine Cry1Ac (seule dans le MON 531 et en combinaison avec Cry2Ab2 dans MON 15985) sont actuellement commercialisés. En 2005, la surface totale de maïs *Bt* exprimant les protéines Cry1Ab et Cry1F était estimée respectivement autour de 15 millions et 2 millions hectares. La même année, la surface totale de coton au niveau mondial exprimant la protéine Cry1Ac (seule ou en combinaison avec Cry2Ab2) était supérieure à 4 millions d'hectares.

Un historique de sécurité d'utilisation des protéines Cry a aussi été établi sur la base de la similarité avec les protéines de types sauvages présentes dans les pesticides *Bt* d'origine microbienne. Les préparations microbiennes de *Bt* ont été utilisées comme insecticides locaux depuis plus de 40 ans, et aucun effet négatif sur la santé humaine ou animale n'a été rapporté (Betz *et al.*, 2000). Au contraire, il a été montré que l'activité fonctionnelle de ces protéines dans ces insecticides acceptables pour l'environnement est spécifique des insectes ciblés et dès lors sans toxicité attendue sur les mammifères. Les bioinsecticides microbiens ont été développés sur le fait que les protéines *Bt* Cry ont la capacité naturelle à échanger leurs domaines fonctionnels afin d'améliorer leur spécificité insecticide et leur spectre d'hôtes. Les pesticides microbiens qui contiennent les protéines chimériques Cry1Ac/Cry1F ont été utilisés pour contrôler les ravageurs lépidoptères depuis 1997 (Baum, 1998; Baum *et al.*, 1999). Ces produits commerciaux comptent notamment les Dipel^{®1}, Biobit^{®4}, Javelin^{®2}, Lepinox^{®5} et Thuricide^{®5}.

Les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 sont présentes à de faibles taux dans la plante (voir chapitre D.3). L'innocuité de ces protéines introduites a précédemment été démontrée vis à vis de l'alimentation humaine et animale, elle se base notamment sur :

- a) une caractérisation approfondie de chaque protéine,
- b) l'absence d'homologie significative avec des toxines ou allergènes protéiques connus,
- c) leur rapide digestion dans des fluides gastriques ou intestinaux simulés,
- d) et la mise en évidence de l'absence de toute toxicité aiguë pour chaque protéine dans des études de gavage oral chez les rongeurs.

De plus, la composition des grains et du fourrage du maïs MON 89034 a été comparée avec la composition du maïs conventionnel utilisé comme contrôle

¹ Dipel and Biobit are a registered trademarks of Valent BioSciences Corporation.

² Javelin, Lepinox and Thuricide are registered trademarks of Certis.

dans les essais (maïs avec une base génétique similaire à l'exception des caractères introduits). Ces études analytiques approfondies ont été réalisées aux U.S.A en 2004. Les échantillons de différents maïs commerciaux conventionnels ont été utilisés comme référence afin d'obtenir des données pour développer un intervalle de confiance de 99% pour chaque composant analysé. Les localisations de ces essais pour ces études ont été choisies dans des zones adaptées à la culture du maïs et représentatives de production de maïs commerciaux aux U.S.A. Dans les cinq sites, les semences ont été semées selon un dispositif de blocs de Fisher à 3 répétitions randomisées. Un total de 77 différents composants analytiques (9 dans le fourrage et 68 dans le grain) ont été mesurés. Les composants analysés ont été sélectionnés sur base de recommandations spécifiques de l'OCDE (OECD, 2002). Les analyses de composition des échantillons de fourrage comprennent des éléments de base (protéines, graisses, cendres et teneur en humidité), le résidu de détergent acide (ADF), le résidu de détergent neutre (NDF), les minéraux (calcium et phosphore) et hydrates de carbones par calcul. Les analyses de composition des échantillons de grain comprennent les éléments de base (protéines, graisses, cendres et teneur en humidité), le résidu de détergent acide (ADF), le résidu de détergent neutre (NDF), les fibres alimentaires totales (TDF), les acides aminés, les acides gras (C8-C22), les vitamines (B1, B2, B6, E, l'acide nicotinique, et l'acide folique), les antinutritionnels (acide phytique et raffinose), métabolites secondaires (furfural, acide ferulique, et acide p-coumarique), les minéraux (calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium, et zinc), et les hydrates de carbone par calcul.

En se basant sur ces données, il peut être conclu que les graines de maïs et le fourrage provenant du MON 89034 sont de composition et nutritionnellement équivalents à ceux du maïs conventionnel. Dès lors, le maïs MON 89034 est aussi sûr et nutritif que le maïs conventionnel. Les quelques différences statistiques entre le maïs MON 89034 et le maïs témoin reflètent vraisemblablement la variabilité naturelle de ces composants puisque les valeurs du maïs MON 89034 sont dans l'intervalle de confiance de 99% calculé à partir des références (maïs commerciaux conventionnels) et dans les valeurs historiques de la base de données ILSI-CCD (Life Sciences Institute Crop Composition Database) et de celles de la littérature scientifique.

L'innocuité de chacune de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 a été démontrée séparément et la possibilité que des interactions aient lieu entre les protéines sont hautement improbables pour les raisons évoquées ci-dessous, telles que :

- les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 testées en combinaison dans des bio-essais sur substrat artificiel contre les ECB et CEW ont montré une activité additive mais pas d'effet synergique.

- Les protéines de type Cry1A et Cry2Ab2 possèdent un historique de sécurité d'utilisation à travers leurs consommations dans MON 531 et MON 810 (voir ci-dessus) ainsi que dans leur utilisation combinée dans MON 15985 (voir ci-dessus). Tous ces produits et leurs dérivés ont été manipulés et consommés sans qu'aucun effet néfaste sur la santé n'ait été relevé.

En conclusion, une évaluation complète de la sécurité des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 ainsi qu'une notation comparative de MON 89034 avec des maïs conventionnels montre qu'il est hautement improbable que les protéines introduites ne puissent causer un effet toxique, allergénique ou encore tout autre effet dangereux pour la santé humaine ou animale. L'absence d'effets négatifs sur la santé, confortée par la consommation de différentes plantes génétiquement modifiées contenant les protéines Cry1A et Cry2Ab2 sur de nombreuses années, confirme la sécurité sanitaire du MON 89034.

8. Information concernant la sécurité de la plante supérieure génétiquement modifiée pour la santé des animaux notamment en ce qui concerne tout effet toxique, allergisant ou autre effet nocif résultant de la modification génétique, lorsque la PSGM est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux.

L'innocuité du maïs MON 89034 et de ses protéines exprimées Cry1A.105 et Cry2Ab2 envers la santé animale a été discutée dans le paragraphe précédent D.7, simultanément à l'évaluation de risque pour la santé humaine.

9. Mécanisme d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant).

Les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 produites dans le maïs MON 89034 permettent à ce maïs d'être protégé des dégâts causés par un grand nombre d'insectes ravageurs de la famille des lépidoptères.

Le mécanisme d'action insecticide des protéines Cry est bien connu (voir chapitre D.7). Le mode d'action général des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 inclut les étapes suivantes :

1. ingestion de la protoxine sous forme cristalline par l'insecte
2. solubilisation du crystal dans l'intestin de l'insecte
3. traitement protéolytique de la protéine Cry par les enzymes digestives pour produire une toxine active dénommée delta-endotoxine
4. liaison de l'endotoxine aux récepteurs sur la surface des cellules épithéliales de l'intestin de l'organisme cible

5. formation d'un canal ionique au travers de la membrane ou pores avec comme conséquence une perturbation de l'homéostasie cellulaire (English, 1992).

Un déséquilibre électrolytique ou des changements de pH paralyse l'intestin, l'insecte arrête de se nourrir et meurt (Sacchi *et al.*, 1986).

10. Modifications potentielles des interactions de la plante supérieure génétiquement modifiée avec les organismes non-cibles résultant de la modification génétique.

Comme toute autre plante, le maïs cultivé est connu pour interagir avec une grande variété d'organismes dans l'environnement, incluant les microorganismes, la vie sauvage et les nombreux invertébrés colonisant les feuilles et le sol. En outre, le maïs est connu pour sa variété de maladies cryptogamiques, de nématodes, d'insectes ravageurs, que les agriculteurs cherchent traditionnellement à contrôler par l'application de produits de la protection des plantes ou par d'autres moyens agronomiques comme la rotation des cultures. Comme le maïs est une bonne source d'alimentation, les interactions avec les animaux vertébrés sont bien connues incluant celles avec les oiseaux, les mammifères qui résident dans des habitats agricoles à proximité des champs, des haies et des fossés.

Le maïs MON 89034 étant équivalent au maïs conventionnel, les interactions de MON 89034 avec les autres organismes de l'environnement peuvent être considérées comme identiques à celles relevées avec l'emploi d'un maïs conventionnel, à l'exception d'une nouvelle exposition directe des ravageurs herbivores du maïs aux protéines Cry exprimées dans la plante. A travers le transfert trophique et les processus de décomposition, d'autres organismes comme les prédateurs des ravageurs du maïs pourraient être exposés à de très faibles taux de ces protéines.

Dans la mesure où il a été démontré que le MON 89034 et le maïs conventionnel ne sont pas différents lorsqu'on examine leurs caractéristiques phénotypiques et agronomiques (à l'exception des caractères introduits de protection contre certains lépidoptères), il peut être conclu que les interactions écologiques du MON 89034 avec les organismes non-cibles dans l'environnement ne sont pas différentes de celles rencontrées avec le maïs conventionnel (voir Chapitre D.4).

Les interactions entre MON 89034 et les autres organismes dans l'écosystème sont similaires à celles du maïs conventionnel puisque :

- Les analyses de sécurité des protéines individuelles Cry1A.105 et Cry2Ab2 n'ont pas montré d'effets dangereux pour la santé humaine et animale (voir Chapitre D.7).
- Le maïs MON 89034 est équivalent aux variétés conventionnelles à l'exception du caractère de protection contre les lépidoptères. Aussi, il n'y a pas lieu de penser que ce maïs puisse interagir de manière différente que le maïs conventionnel avec les organismes non-cibles (voir chapitre D.4 et D.7).

En conclusion, les risques environnementaux résultant des interactions écologiques des organismes non-cibles avec le maïs MON 89034 sont négligeables. En effet, l'exposition avec des protéines nouvellement introduites ne présente pas de risque significatif d'effets toxiques ou d'impact en cascade sur les interactions intra- ou inter-espèces. Donc, le risque d'effets indirects significatifs sur les niveaux de population d'organismes non-cibles dans l'environnement récepteur ou leur fonctionnement dans les écosystèmes au-dessus ou en-dessous du niveau du sol dans le voisinage de la culture est tout aussi négligeable.

11. Interactions potentielles avec l'environnement abiotique.

Comme toute autre plante, le maïs cultivé interagit avec l'environnement abiotique (sol, eau et air), au travers notamment de l'enracinement dans le sol, l'absorption des nutriments et de l'eau et des échanges de gaz. La production de maïs en général a aussi un impact indirect sur les processus biophysiques et biogéochimiques dans le sol au travers des travaux de labours, des applications de fertilisants, et de la conduite éventuelle de monoculture dans certaines régions. Toutefois, toutes les pratiques agronomiques couramment utilisées pour cultiver le maïs conventionnel dans l'Union Européenne sont applicables dans le cas de la culture du maïs MON 89034 et aucune technique spécifique de culture, de gestion ou de récolte n'est requise.

Comme le maïs MON 89034 a été montré comme étant substantiellement équivalent aux maïs conventionnel (à l'exception du caractère introduit de protection contre certains lépidoptères), en terme de composition et caractéristiques phénotypiques et agronomiques, il n'y a pas lieu de penser que ce maïs MON 89034 soit différent du maïs conventionnel au regard de ses interactions avec l'environnement abiotique.

Aucune interaction négative n'est connue entre la famille des protéines *Bt* et l'environnement abiotique. En outre, les études de dégradation dans le sol de la protéine *Bt* ont montré que cette dernière est rapidement dégradée dans le sol et ne devrait dès lors pas affecter négativement le sol et l'eau (Palm *et al.*,

1996). Aussi aucun impact nuisible sur l'environnement abiotique ne devrait se produire suite à l'utilisation de MON 89034 en Europe.

12. Description des méthodes de détection et d'identification de la plante génétiquement modifiée.

Les techniques par Southern Blot sont utilisées pour la détection et l'identification des séquences de nucléotides héritées des gènes *cry1A.105* et *cry2Ab2* et la méthode ELISA pour la détection des protéines exprimées Cry1A.105 et Cry2Ab2.

13. Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée.

Le maïs MON 89034 a été testé au champ dans plusieurs localisations aux USA et en Argentine depuis 2002. Ces essais au champ ont été réalisés pour générer le matériel nécessaire pour les études réglementaires et pour évaluer la performance agronomique (efficacité, sélectivité, rendement). Il a également été testé au Canada en 2005 pour la caractérisation agronomique et des évaluations.

Les résultats des disséminations dans ces pays ont montré que les maïs MON 89034 ne causent pas d'effets nuisibles sur la santé des humains et des animaux et sur l'environnement.

E. INFORMATION CONCERNANT LES SITES DE DISSEMINATION (SEULEMENT POUR LES NOTIFICATIONS SOUMISES SUIVANT LES ARTICLES 6 ET 7)

1. Localisation et étendue des sites de dissémination

Les essais seront mis en place dans des champs localisés dans des zones françaises représentatives de la culture du maïs, en accord avec l'agriculteur exploitant de la parcelle. Un contrat bipartite sera ainsi signé par Monsanto et l'agriculteur dans lequel seront détaillées les opérations et les modalités de suivi de l'essai.

Les régions envisagées pour la conduite des essais en 2007 sont les suivantes : Rhône-Alpes, Midi-Pyrénées, Centre, Aquitaine, Lorraine, Poitou-Charentes.

Les communes concernées par les essais en 2007 sont citées dans le tableau ci-dessous :

Régions	Communes
Poitou-Charentes	Valvidienne (86)
	Civaux (86)
Lorraine	Beux (57)
	Allamont (54)
	Moulotte (55)
	Foameix-Ornel (55)
Centre	Yermenonville (28)
	Poinville (28)
Rhône-Alpes	St Maurice de Gourdans (01)
	Faramans (01)
	Bourgoin-Jallieu (38)
Aquitaine	Linxe (40)
	Magescq (40)
	Layrac (47)
Midi-Pyrénées	Fronton (31)
	Mauroux (32)
	Serignac (82)
	La Salvetat de Belmontet (82)
	Monclar de Quercy (82)

Les surfaces d'expérimentation maximales pour le maïs MON 89034 pour l'année 2007 sont résumées ci-dessous :

Année	Nombre de sites	Surface OGM par site (m ²)	Surface OGM totale (m ²)
2007	26	5000	130000

La surface totale en OGM (relatifs aux dossiers Monsanto) ne dépassera pas 5000 m² par site.

2. Description de l'écosystème des sites de dissémination, y compris le climat, la flore et la faune

Les essais seront mis en place dans des zones représentatives de la culture du maïs, de façon à prendre en compte le plus grand nombre possible de conditions pédo-climatiques différentes. Selon la localisation de chacun des essais, des variétés d'indice de précocité adapté seront utilisées.

3. Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces cultivées végétales sexuellement compatibles

Comme précisé dans le paragraphe B.2.b. du présent dossier, il n'y a pas d'hybridation interspécifique possible en France du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément sur le territoire français. Le genre *Zea* comprend le maïs et les téosintes ; ces dernières ne sont pas présentes en Europe.

4. Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées

Il convient de rappeler qu'il n'y a pas d'hybridation interspécifique du maïs possible en France et qu'aucune interaction significative avec des organismes non cibles n'est reportée dans la littérature. Ces essais seront implantés dans des zones de polyculture, hors de biotope officiellement reconnu ou de zone protégée qui pourraient être affectés par ces expérimentations. Avant implantation, chaque site d'expérimentation fera l'objet d'une pré-visite par les services de la Protection des Végétaux en charge du contrôle de ces essais : dans le cas où une zone protégée se situerait dans le périmètre de l'essai, les mesures de précaution et distances d'isolement prises seront de mesure à prévenir tout risque d'affectation de ces zones.

F. INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION (SEULEMENT POUR LES NOTIFICATIONS SOUMISES SUIVANT LES ARTICLES 6 ET 7)

1. Objectifs de la dissémination

Ces essais concernent du maïs génétiquement modifié pour être protégé contre un ravageur du maïs : la pyrale.

- C'est indispensable : les essais au champ permettent de valider les résultats obtenus en milieu confiné. L'efficacité d'une technique agricole dépend des conditions agronomiques locales (climat, pédologie, systèmes agronomiques). C'est avec de tels essais qu'il est possible de démontrer, au cas par cas, l'intérêt de l'amélioration apportée.
- C'est obligatoire : l'expérimentation en conditions réelles de culture fait partie des exigences même des réglementations européenne et française pour la constitution des dossiers d'autorisation de mise sur le marché.

Dans le cadre de ces essais, plusieurs objectifs seront poursuivis :

- a- La réalisation de croisements en vue de créer de nouvelles variétés,
- b- La production de semences à des fins d'expérimentation ultérieure (par exemple, pépinières de croisement, multiplication de lignées pour expérimentation, production des hybrides expérimentaux),
- c- La confirmation par des mesures qualitatives/quantitatives (rendements) de la performance agronomique de ce maïs transgénique pour les paramètres conventionnels des variétés de maïs et pour la résistance aux ravageurs.

- d- La vérification de l'équivalence agronomique de ce maïs transgénique avec le maïs conventionnel.
- e- La production d'échantillons de matériel végétal nécessaires à la réalisation de mesures analytiques,
- f- La vérification des performances agronomiques et du respect des règles de DHS des variétés de ce maïs transgénique en vue de leur inscription au catalogue des variétés autorisées.
- g- Des parcelles de présentation de ce maïs transgénique installées dans le cadre d'essai de démonstration technique.
- h- Le stockage et la préparation des semences transgéniques dans nos usines et laboratoires (tri, nettoyage, traitements de semence, ensachage..) ainsi que leurs expéditions vers les sites d'expérimentation.

2. Date(s) et durée prévues de l'opération

Le programme est prévu sur 1 an : campagne 2007.

L'expérimentation s'étendra de mars à décembre au plus tard.

3. Méthode de dissémination envisagée

Conformément aux modes opératoires internes de la société, la manipulation des semences nécessaires à la mise en place de ces essais sera effectuée par du personnel autorisé, qualifié et averti des mesures préventives à prendre pour éviter toute dissémination. Les semis seront effectués avec un semoir parfaitement vidangé. Les semences seront introduites dans l'appareil avec précautions pour éviter les pertes au sol : cette opération sera effectuée sur le site de l'essai. A la fin du semis, les graines restantes seront récupérées de façon à assurer une parfaite traçabilité de tout le matériel génétiquement modifié.

Au cours de l'expérimentation, le site sera régulièrement surveillé de façon à vérifier l'état des barrières polliniques, le respect du périmètre d'isolement et toutes les autres modalités décrites dans les protocoles.

De manière analogue au semis, les appareils de récolte seront nettoyés au champ. Les grains récoltés seront enfouis dans le sol, incinérés, mis en décharge ou échantillonnés dans des sacs parfaitement fermés en vue de la poursuite du programme de croisement ou d'expérimentations ultérieures. La plante entière restée au champ, ainsi que les grains tombés accidentellement au sol seront détruits par un moyen approprié, notamment par broyage mécanique au champ ou fauchage.

Les semences conservées pour une utilisation ultérieure (croisement, expérimentation ou mesures analytiques) seront transportées du site expérimental vers une station de recherche pour y être stockées. Certaines de

ces semences pourront éventuellement être exportées vers d'autres pays, avec les précautions nécessaires et les permis appropriés. Dans tous les cas, leur manipulation sera réalisée par du personnel qualifié, apte à en assurer une parfaite traçabilité.

4. Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et les modes de récoltes

Une préparation classique du sol sera effectuée avant le semis des plantes génétiquement modifiées.

La zone expérimentale sera conduite selon les pratiques agronomiques usuelles, y compris pour ce qui concerne la fertilisation, la protection fongicide et l'irrigation.

En cours de végétation, les traitements pesticides seront réalisés en fonction de l'objectif de l'essai ; dans certains cas, un désherbage manuel pourra être réalisé.

A maturité, les épis des plantes transgéniques seront récoltés manuellement ou mécaniquement et stockés dans des sacs étiquetés et fermés. Des graines pourront être conservées pour la poursuite du programme de croisement ou à des fins d'expérimentation ultérieure. Une partie de ces graines pourra également être exportée vers un autre pays avec les précautions nécessaires et les permis appropriés.

Après récolte, les épis non nécessaires pour des analyses ou usages ultérieurs seront détruits par enfouissement dans le sol, incinération ou mise en décharge autorisée. Les résidus végétaux seront broyés avec soin et enfouis dans le sol.

5. Nombre approximatif de plantes (ou de plantes par mètre carré)

La densité de semis variera entre 60 000 et 120 000 plantes/ha en fonction des zones de culture et donc des pratiques agricoles locales, ainsi que selon la précocité des hybrides expérimentaux utilisés.

G. INFORMATION SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTROLE, ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION (SEULEMENT POUR LES NOTIFICATIONS SOUMISENT SUIVANT LES ARTICLES 6 ET 7)

1. Précautions prises :

- a) Distance(s) des autres espèces végétales sexuellement compatibles, espèces parentales sauvages et cultivées**

Il n'existe pas en Europe d'espèces sauvages sexuellement compatibles avec le maïs cultivé : par conséquent, aucune précaution particulière vis à vis de telles espèces végétales n'a lieu d'être.

Concernant les mesures prises vis à vis des cultures de maïs qui peuvent se situer dans le périmètre de l'essai, deux cas de figure doivent être distingués en fonction de l'objectif poursuivi sur le site d'expérimentation.

Cas 1 : Essais détruits avant la floraison des panicules mâles.

Dans cette situation, les objectifs de l'essai sont atteints précocement dans la campagne, par conséquent l'essai implanté est détruit avant la floraison des panicules mâles ; aucune précaution particulière n'est requise du fait de l'absence d'émission de tout organe pollinisateur.

Cas 2 : Essais conduisant à la production de graines à des fins d'analyse ou d'évaluation.

Dans cette situation, l'essai implanté doit, pour les besoins de la recherche, être poursuivi jusqu'à la production de grains (étude du rendement), ou de semences (pépinière de lignées). En conséquence, soit les plantes de ce site d'expérimentation seront castrées ou ensachées, soit une distance d'isolement de 400 m de toute autre culture commerciale de maïs sera respectée de façon à éviter tout croisement, comme exigé dans les précédents permis d'expérimentation.

- b) Mesures visant à minimiser ou à empêcher la dissémination de tout organe reproducteur de la plante supérieure génétiquement modifiée (par exemple pollen, graines, tubercules)**

Comme détaillé dans les paragraphes 3 et 4 du chapitre F, les semences pour expérimentation seront manipulées par du personnel autorisé, qualifié et averti des mesures préventives à prendre pour éviter toute dissémination : une traçabilité scrupuleuse des semences avant, pendant et après semis sera réalisée.

Cas 1 : Essais détruits avant la floraison des panicules mâles.

La destruction de ces essais sera réalisée antérieurement à l'apparition de tout organe reproducteur. En conséquence, aucune mesure particulière n'est requise.

Cas 2 : Essais conduisant à la production de graines à des fins d'analyse ou d'évaluation.

En plus d'une des mesures présentées précédemment (castration, ensachage ou isolement de 400 m de toute autre culture de maïs commerciale), ces essais seront entourés d'une barrière pollinique de 4 rangs de maïs non transgénique servant de piège à pollen. Enfin, les produits de la récolte, à l'exception des échantillons prélevés pour analyse, seront détruits par enfouissement, incinération ou mis en décharge autorisée.

2. Description des méthodes de traitement du site après dissémination

Dans tous les cas, tous les produits du végétal issus de la parcelle expérimentale sont exclusivement destinés à l'expérimentation ou sont détruits au terme de l'expérimentation.

Ainsi, les plantes entières seront détruites par un moyen approprié, généralement par broyage mécanique et enfouissement dans le sol. En cas de récolte, les grains obtenus seront détruits par enfouissement dans le sol, incinération ou mise en décharge, une fois l'ensemble des données agronomiques générées. Certains échantillons pourront être prélevés à des fins d'analyses ou d'expérimentations ultérieures.

Cas 1 : Essais détruits avant la floraison des panicules mâles.

Ces essais, détruits en cours de végétation, avant toute production de grain, ne se trouvent pas exposés à la présence potentielle de repousses l'année suivante et donc ne nécessitent pas de suivi particulier.

Cas 2 : Essais conduisant à la production de graines à des fins d'analyse ou d'évaluation.

Pour ces essais poursuivis jusqu'à la production de grains ou de semences, un suivi l'année suivante sera effectué de façon à surveiller les repousses éventuelles et à les détruire avant leur floraison. De façon à pouvoir réaliser ce suivi efficacement, une rotation des cultures sera mise en place ; à l'exception où une nouvelle culture expérimentale de maïs, non destinée à une filière commerciale ou alimentaire serait implantée.

Pour les essais poursuivis jusqu'à la production de grains ou de semences, une surveillance sur les sites sera réalisée afin de détruire toutes repousses éventuelles de maïs l'année qui suit la fin de l'essai.

3. Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets

Tous les produits végétaux issus de ces expérimentations seront détruits à l'exception d'échantillons prélevés à des fins d'analyses ou d'expérimentations ultérieures. Ainsi les plantes entières seront détruites essentiellement par broyage mécanique au champ et enfouissement au sol, les produits de la récolte, s'il y a lieu, seront détruits par enfouissement au sol, incinération ou mise en décharge autorisée. Dans tous les cas, aucun produit végétal issu de ces essais n'intégrera une chaîne alimentaire humaine ou animale.

4. Description des plans et des techniques de surveillance

Des visites régulières seront effectuées sur chacun des sites d'expérimentation. Ce suivi régulier permettra d'identifier de façon précoce tout événement ou développement qui n'est pas souhaitable. Notamment, des visites auront lieu après semis et avant la floraison de façon à s'assurer du respect, s'il y a lieu, du périmètre d'isolement.

L'année qui suit la conduite des essais poursuivis jusqu'à la production de grains ou de semences, une surveillance sur les sites sera réalisée afin de détruire toutes repousses éventuelles de maïs. De façon à faciliter ce travail, la culture de la rotation sera différente d'une culture de maïs, excepté s'il s'agit à nouveau d'une expérimentation non destinée à une filière commerciale industrielle ou alimentaire.

5. Description des plans d'urgence

L'évaluation du risque environnemental (cf Annexe II – Evaluation du Risque Environnemental) indique que le risque environnemental lié à la mise en culture de ce maïs est négligeable. Par conséquent, les stratégies de gestion du risque du maïs MON 89034 n'ont pas lieu d'être différentes de celles du maïs conventionnel.

Cependant, en plus des observations des paramètres agronomiques qui sont la base de l'expérimentation planifiée, un plan de surveillance régulier sera mis en place tout au long de la conduite de l'expérimentation et permettra d'identifier précocement tout événement ou développement non souhaitable, dû à des phénomènes extérieurs comme les conditions climatiques défavorables. En conséquence de quoi, les essais peuvent être interrompus à tout moment par les moyens de destruction suivants :

- Destruction chimique : traitement avec un herbicide conventionnel non-sélectif du maïs (approprié à la destruction de l'OGM considéré)
- Destruction mécanique : manuelle ou fauchage et/ou travail du sol selon l'importance des repousses

Dès qu'un élément du plan d'urgence est mis en place, le Service de la Protection des Végétaux est immédiatement informé et consulté sur les suites éventuelles à donner.

A la fin de l'expérimentation au champ, un rapport sera rédigé et transmis aux membres de la Commission du Génie Biomoléculaire. Ce rapport détaillera, s'il y a lieu, tout effet néfaste environnemental non attendu qui aurait été observé dans le cadre de cette surveillance générale et les actions correctives qui ont été mises en place.

6. Méthodes et procédures de protection du site

Aucune procédure particulière de protection du site n'est envisagée. Certaines mesures pourraient éventuellement être prises, s'il y avait lieu, durant la conduite de l'expérimentation.

H. CONCLUSIONS CONCERNANT LES INCIDENCES POTENTIELLES SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA DISSEMINATION OU DE LA MISE SUR LE MARCHE DU OU DES OGM

Cette analyse du risque environnemental suit le plan de l'annexe II (Directive 2001/18/CE)

1. Probabilité que les PSGM deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels

Le maïs conventionnel, originellement introduit en Europe il y a plus de 500 ans, est une culture annuelle qui n'est pas par nature persistante ou invasive. Elle ne peut pas survivre sans l'intervention de l'homme et n'est pas apte à persister en tant que mauvaise herbe en raison de la sélection culturelle qui a été opérée au travers des siècles de culture.

Si les caractères introduits avaient modifié les capacités d'adaptation biologiques du MON 89034, cela pourrait résulter en une augmentation de la persistance ou de la capacité d'envahissement de ce maïs comparé aux variétés de maïs conventionnel. Donc, les caractères introduits conférant une protection contre les lépidoptères sont des caractéristiques de la PSGM qui peuvent, au moins en théorie, causer une nuisance environnementale.

Parmi les conséquences dommageables qui pourraient conceptuellement être envisagées, une augmentation de la persistance pourrait élever le maïs au statut de mauvaise herbe et pourrait conduire à une espèce invasive, se disséminant dans l'environnement. Cependant, de tels changements ou impacts seraient atypiques de la plante *Zea mays*, et n'ont pas été enregistrés

depuis des décennies de sélection, mutagenèse et autres techniques d'introduction de diversité génétique dans le maïs.

Les études des populations de plantes spontanées dans des champs de jachères en France (Bodet *et al.*, 1994 ; Mamarot and Rodriguez, 1994) ont mis en évidence l'absence de repousses de maïs. Cela résulte de la combinaison d'absence de dormance des semences, d'une faible capacité des semences à survivre dans les sols, de la sensibilité au gel des plantules de maïs et de la préparation du sol avant le semis des cultures de rotation (incluant aussi bien la destruction de la végétation présente que le travail du sol) (Hicks and Thomison, 2004; OECD, 2003; Shaw, 1988). La graine est la principale structure de survie du maïs et, on ne connaît pas aujourd'hui de phénomène de régénération naturelle à partir des tissus végétatifs. Bien que ces graines puissent hiverner dans des conditions climatiques tempérées et germer l'année suivante, le maïs ne présente pas la même capacité de survie qu'une mauvaise herbe (Hallauer, 1995; OECD, 2003).

Les observations présentées ci-dessus s'appliquent à l'identique pour MON 89034. Comme établi dans la section D.7 de cette notification, MON 89034 est équivalent en substance aux variétés conventionnelles de maïs, à l'exception des caractères introduits conférant la protection contre les lépidoptères. Les résultats des essais effectués au champ avec MON 89034 ont permis de mettre en évidence qu'il est peu probable que les caractéristiques phénotypiques, agronomiques, de reproduction, de survie et de dissémination de ces maïs soient altérées comparativement au maïs conventionnel (voir Section D.4). A supposer que les modifications génétiques ne conduisent pas à des différences phénotypiques significatives pouvant altérer la germination, la capacité de survie ou les capacités biologiques d'adaptation comparativement aux variétés conventionnelles, il est peu probable que le MON 89034 soit plus persistant ou plus invasif dans l'environnement naturel que le maïs conventionnel. Le caractère introduit (protection contre les lépidoptères) ne devrait pas conférer au maïs des avantages ou désavantages significatifs pouvant altérer la capacité de survie de ce dernier (voir point 2, ERA Section).

En conclusion, la probabilité d'une dissémination non intentionnelle de MON 89034 dans l'environnement non agricole est négligeable, étant donné que le maïs est non persistant et non invasif et que de plus ces paramètres ne sont pas altérés dans MON 89034 comparativement au maïs conventionnel. Dans le cas improbable de l'implantation d'une plante de MON 89034 dans un environnement non agricole, les caractères introduits devraient avoir des conséquences négligeables sur l'environnement. Ainsi le risque d'une dissémination non intentionnelle du MON 89034 par le biais d'une capacité de colonisation plus importante du maïs peut être considérée comme

négligeable. Dès lors, devant la faiblesse des risques identifiés, aucune stratégie de gestion de risque n'est identifiée comme pertinente.

2. Avantages ou désavantages sélectifs conférés aux PSGM

Vu la longue expérience de culture du maïs en Europe, il est difficile d'imaginer un mécanisme par lequel les plantes de maïs pourraient avoir un impact négatif sur la biodiversité en dehors du champ cultivé.

Si l'objectif des caractères introduits dans MON 89034 était d'obtenir un changement significatif des caractéristiques biologiques de MON 89034, cela pourrait théoriquement conduire à un avantage compétitif de ce maïs vis-à-vis des autres plantes étant donné que le maïs n'est pas connu pour être une plante compétitive dans l'environnement non agricole. Donc, les caractères introduits sont une caractéristique de la PSGM qui peut, au moins en théorie, causer une nuisance environnementale.

Si un avantage sélectif avait conféré au MON 89034 un statut de mauvaise herbe, la conséquence ultime serait de la transformer en espèce invasive dans l'environnement. En outre, comme discuté dans les sections D.4 et D.7, les séquences génétiques introduites dans MON 89034 n'ont pas conduit à des altérations biologiques significatives, telles que sur la croissance et le développement de la plante, la morphologie, les performances agronomiques, la composition, la valeur nutritionnelle et les caractéristiques de sécurité comparativement au maïs conventionnel. Par conséquent, l'évaluation de tous les avantages/désavantages compétitifs sera limitée aux caractères additionnels : protection contre les lépidoptères.

En comparaison du maïs conventionnel, la présence des gènes codant pour la protection vis à vis des lépidoptères conférerait seulement un avantage sélectif au champ où ces insectes nuisibles seraient présents en grand nombre et si aucun autre facteur, plus important, limitant la survie du maïs, n'était présent dans l'environnement agricole. En pratique, pourtant, les avantages compétitifs introduits sont uniquement pertinents dans les habitats agricoles et présentent un risque négligeable pour l'environnement non agricole, où de tels avantages seraient de courte durée et de conséquence limitée du fait de la faible capacité de survie du maïs dans les conditions climatiques européennes (voir point 1, ERA Section). En outre, les rares repousses sont rapidement contrôlées par des moyens mécaniques, ou par un des herbicides anti-graminées couramment utilisés.

En conclusion, le MON 89034 est dans son ensemble équivalent au maïs conventionnel, à l'exception des caractères introduits conférant une protection contre des lépidoptères nuisibles. Dès lors, le risque posé par

MON 89034 dans l'environnement agricole et non agricole est négligeable et aucune stratégie de gestion du risque n'est donc identifiée comme pertinente.

3. Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation de la PSGM et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales

MON 89034, comme tous les autres maïs, n'est sexuellement compatible avec aucune autre espèce de plante sauvage indigène ou introduite, présente en Europe. Par conséquent, le potentiel de transfert génétique et d'échanges avec d'autres plantes se limite à la pollinisation croisée avec d'autres plantes de maïs cultivées.

Toutes les cultures de maïs produites au sein de l'Union Européenne peuvent s'inter-polliniser. Ainsi, le pollen de maïs d'un hybride donné peut être disséminé sur de courtes distances par le vent et fertiliser d'autres cultivars présents aux alentours.

Dans le cas de plantes de maïs MON 89034 parvenant à maturité, produisant du pollen et fertilisant une culture avoisinante, les caractères introduits dans MON 89034 pourraient être transférés à la culture de maïs réceptrice, transfert incluant les gènes conférant une protection contre les lépidoptères, et seraient exprimés dans la descendance de la culture réceptrice.

Ce transfert potentiel des caractères introduits est une caractéristique de la PSGM qui peut théoriquement, causer un effet secondaire néfaste sur l'environnement.

Si le transfert des caractères introduits à des plantes sexuellement compatibles conférerait un avantage compétitif significatif et dès lors augmentait la capacité d'adaptation de la plante réceptrice, cette plante pourrait devenir une espèce invasive se disséminant dans l'environnement.

Comme présenté dans la section B.4, la probabilité de transfert du matériel génétique entre cultures de maïs est limitée en raison de la masse relativement élevée du pollen et dès lors à sa mobilité réduite (Hansen, 1999; Sears and Stanley-Horn, 2000). Le potentiel de fécondation croisée des gènes introduits entre cultures de maïs avoisinantes dépend d'avantage de la synchronisation de leur floraison, de la distance entre les champs, de la taille des champs et de leur orientation par rapport aux vents dominants durant la pollinisation (Devos *et al.*, 2005).

Comme établi pour la culture source MON 89034 elle-même, une fécondation croisée des caractères conférant la protection contre les lépidoptères donnerait un avantage sélectif au champ là où ces insectes nuisibles seraient présents en grand nombre et si aucun autre facteur, plus important, limitant

la survie du maïs n'était présent dans l'environnement agricole (voir point 2, ERA Section). C'est pourquoi, ces avantages ont simplement un intérêt agronomique et présentent un risque négligeable pour l'environnement non agricole, où de tels avantages seraient de courte durée et de conséquence limitée. Le potentiel pour qu'une graine résultante F2 contenant l'insert génétique ne germe et ne survive en tant que repousse de maïs et puisse être disséminée dans l'environnement est négligeable, comme discuté pour la culture source (Point 1, ERA section).

En conclusion, potentiellement il n'y a pas de transfert de gènes de MON 89034 vers des espèces de plantes sauvages et la probabilité de transfert à d'autres cultures de maïs est faible à négligeable, dépendant du vent, de la synchronisation des floraisons et de la distance entre les cultures. Dans le cas où il y aurait fécondation croisée des gènes introduits avec une autre plante de maïs, ce transfert aurait, dans tous les cas, des conséquences négligeables pour l'environnement. Etant donné que le risque est négligeable, aucune stratégie de gestion du risque n'est considérée comme nécessaire.

Cependant, comme spécifié dans les modes opératoires pour la conduite des essais OGM en plein champ, les essais actuellement planifiés incluront une barrière d'au moins 4 rangs de maïs conventionnel et une distance minimum d'isolement de 400m des autres cultures commerciales de maïs.

4. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement (le cas échéant)

Le maïs génétiquement modifié MON 89034 ne diffère du maïs conventionnel que par l'expression des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 qui confèrent une protection contre les lépidoptères nuisibles (voir section D.7).

Par conséquent, l'évaluation des nuisances possibles vis à vis de l'environnement suite à des interactions directes ou indirectes entre la PSGM et les organismes cibles ne portera que sur l'expression des protéines introduites conférant une protection contre certains insectes nuisibles.

L'activité insecticide des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 sur les larves des insectes cibles peut avoir un impact sur les niveaux de population de ces insectes et pourrait, au moins en théorie, affecter de manière indirecte les dynamiques de population des autres organismes qui inter-agissent avec ces insectes (par exemple : arthropodes non cibles, parasitoïdes, champignons pathogènes et toxiques).

Pour que les conséquences des effets directs sur les espèces cibles ou des effets trophiques indirects sur les organismes non cibles soient considérées comme significatives, ces effets devraient être comparés avec les effets de base causés par les systèmes de production des cultures conventionnelles sur ces mêmes organismes, tels que les effets dus aux insecticides traditionnels à large spectre d'action utilisés en maïs ou sur d'autres cultures.

Le maïs cultivé est connu pour interagir avec une grande diversité d'insectes nuisibles herbivores qui peuvent causer de sérieux dommages aux cultures, notamment la baisse de rendement ou une altération de la qualité de récolte. La pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) est un lépidoptère nuisible économiquement important, disséminé dans les principales régions maïsicoles. De part le comportement endophyte de la larve, un contrôle chimique traditionnel n'est pas efficace lorsque cette dernière a creusé une galerie dans la plante et devient dès lors inaccessible. En outre, le large spectre d'action de certains des insecticides appliqués cause des effets néfastes sur des organismes non cibles dans l'environnement, et rend ces produits moins appropriés ou même incompatibles avec les méthodes de contrôle biologique utilisés en lutte intégrée (IPM). L'utilisation du maïs exprimant les delta-endotoxines (la forme active de la protéine toxique) dérivée du *Bt* offre une stratégie rationnelle pour le contrôle de ces insectes nuisibles, en réduisant les coûts environnementaux associés à l'utilisation d'insecticides traditionnels (Rice and Pilcher, 1999).

Etant donné que le gène introduit dans MON 89034 a seulement une activité contre les larves de certains lépidoptères, les effets MON 89034 sur les organismes cibles sont limités à des conditions spécifiques au champ, à un espace réduit et de durée limitée. Etant donné que ces organismes cibles représentent des insectes nuisibles importants dans l'environnement agronomique, le contrôle direct des niveaux de leurs populations dans les champs de maïs est justifié d'un point de vue agronomique et n'est pas considéré comme un effet environnemental néfaste direct en lui-même.

En comparaison avec les pratiques courantes de contrôle des parasites, qui utilisent souvent des insecticides chimiques à large spectre d'action, les effets potentiels indirects et trophiques de la suppression des populations de ces organismes nuisibles sur les arthropodes interagissant dans l'environnement récepteur sont considérés comme insignifiants. Au contraire, comme la spécificité des protéines Cry (voir Section D.9) n'affecte pas directement les arthropodes utiles, l'utilisation de MON 89034 est hautement compatible avec les pratiques de lutte intégrée (IPM) et les systèmes d'agriculture durable. En outre, la combinaison des protéines insecticides Cry1A.105 et Cry2Ab2 dans une seule plante donne un meilleur contrôle insecticide et offre un outil additionnel pour la gestion des résistances (IRM). Un effet bénéfique

supplémentaire de l'interaction écologique de MON 89034 avec ses organismes cibles est une réduction indirecte de l'infestation secondaire par des pathogènes communs ou par des champignons toxiques, tels que *Fusarium* spp. (Bakan *et al.*, 2002; Magg *et al.*, 2002; Masoero *et al.*, 1999; Munkvold, 2002; Munkvold *et al.*, 1997; Wu, 2006). Par conséquent, ce maïs a le potentiel de contenir des niveaux plus faibles de certaines mycotoxines dangereuses, qui peuvent entraîner, lorsqu'elles sont présentes dans l'alimentation du bétail, de graves maladies et même la mort des animaux d'élevage (Etzel, 2002; Hussein and Brasel, 2001; Huwig *et al.*, 2001).

En conclusion, le maïs MON 89034 induit un risque négligeable envers l'environnement suite à son interaction avec les organismes cibles. Etant donné que le risque est négligeable, des stratégies de gestion de risque ne sont pas considérées comme nécessaires. La culture de ce maïs protégé contre certains lépidoptères offre d'importants bénéfices environnementaux tels que:

- un moyen fiable pour le contrôle de lépidoptères nuisibles spécifiques du maïs tout en permettant de maintenir les insectes bénéfiques
- un potentiel d'utilisation réduite des insecticides chimiques dangereux
- une excellente compatibilité avec la lutte intégrée (IPM) et les concepts d'agriculture durable
- une probabilité réduite pour les lépidoptères de développer une résistance aux protéines *Bt*
- des niveaux potentiellement réduits de mycotoxines telles que les fumonisines dans les grains de maïs, provenant du développement de champignons parasites de faiblesse, aux endroits où les insectes nuisibles se sont nourris.

5. Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les PSGM et des organismes non cibles (compte tenu également des interactions d'organismes avec les organismes cibles), notamment les incidences sur les niveaux de population des concurrents, herbivores, symbiotes (le cas échéant), parasites et agents pathogènes

Puisque le maïs MON 89034 se comporte de la même manière au champ que le maïs conventionnel (à l'exception des caractères introduits conférant une protection contre certains lépidoptères), l'interaction de ce maïs avec d'autres organismes dans l'environnement est considérée comme identique à celle du maïs conventionnel, à l'exception de l'exposition potentielle supplémentaire des nuisibles herbivores du maïs aux protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2. L'exposition potentielle des organismes non cibles dans l'environnement à ces protéines est une caractéristique des PSGM qui peuvent, en théorie, causer une nuisance à l'environnement. Par organismes non cibles on entend, tous les organismes, animaux et plantes, qui pourraient être non

intentionnellement affectés par un mécanisme spécifique ou non résultant de l'expression de ces nouvelles protéines.

Théoriquement, une conséquence du contact des organismes non cibles avec les protéines introduites (qui peuvent être toxiques pour ces derniers) peut avoir un impact sur les niveaux de ces populations.

La probabilité d'effets nuisibles sur l'environnement résultant de l'exposition des organismes non cibles aux protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 mentionnées ci-dessus, est considérée comme négligeable (voir Section D.10).

Le maïs MON 89034 exprime les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2, protégeant les plantes contre des insectes phytophages nuisibles du maïs. La spécificité insecticide des protéines Cry peut être déterminée à différentes étapes du mode d'action précédemment décrit dans les sections D.7 et D.9. La fixation aux récepteurs, en particulier, est une étape critique dans le mécanisme d'action des protéines Cry car, sans cela, aucun effet toxique ne peut être exercé. Une fixation irréversible des toxines sur les récepteurs de l'intestin semble corrélée avec la sensibilité de l'insecte. C'est un des facteurs clé dans l'innocuité des protéines vis-à-vis des organismes non cibles tels que les poissons, les oiseaux, les mammifères et les invertébrés non cibles. A ce jour, aucun récepteur de ces protéines n'a été identifié dans les cellules intestinales des mammifères (Noteborn and Kuiper, 1994; Sacchi *et al.*, 1986; Van Mellaert *et al.*, 1988).

Une série d'études alimentaires a été réalisée avec la protéine purifiée ou des échantillons foliaires lyophilisés du maïs MON 89034 pour caractériser le spectre insecticide de l'activité des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 contre une variété d'insectes agronomiquement importants de plusieurs taxons majeurs. Les études ont été réalisées avec des espèces représentatives d'insectes nuisibles et non nuisibles de cinq ordres.

Les espèces suivantes ont été testées avec la protéine Cry1A.105: dans l'ordre des coléoptères, le charançon de la capsule du coton *Anthonomus g. grandis* (Curculionidae), la chrysomèle maculée du concombre *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Chrysomelidae), la coccinelle maculée *Coleomegilla maculata* (Coccinellidae); dans l'ordre des lépidoptères, la noctuelle epsilon *Agrotis ipsilon* (Noctuidae), le ver de l'épi du maïs *Helicoverpa zea* (Noctuidae), le légionnaire d'automne *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae), la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Crambidae), la pyrale du maïs du sud-ouest *Diatraea grandiosella* (Crambidae); dans l'ordre des hémiptères, la punaise occidentale *Lygus hesperus* (Miridae), le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (Aphididae), la punaise orius *Orius insidiosus* (Anthocoridae); dans l'ordre des hyménoptères une guêpe parasite *Ichneumon*

promissorius (Ichneumonidae) et l'abeille domestique *Apis mellifera* (Apidae); et dans l'ordre des collembolés, une espèce de collembolés *Folsomia candida* (Isotomidae).

Les espèces suivantes ont été testées avec la protéine Cry2Ab2: dans l'ordre des coléoptères, le charançon de la capsule du coton *Anthonomus g. grandis* (Curculionidae), la chrysomèle maculée du concombre *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Chrysomelidae), la coccinelle maculée *Coleomegilla maculata* (Coccinellidae); dans l'ordre des lépidoptères, la noctuelle ipsilon *Agrotis ipsilon* (Noctuidae), le ver de l'épi du maïs *Helicoverpa zea* (Noctuidae), le légionnaire d'automne *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) et la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Crambidae); dans l'ordre des hémiptères, la punaise occidentale *Lygus hesperus* (Miridae), le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (Aphididae), la punaise orius *Orius insidiosus* (Anthocoridae); dans l'ordre des hyménoptères, des guêpes parasites *Ichneumon promissorius* et *Nasonia vetripennis* (Ichneumonidae) et une abeille domestique *Apis mellifera* (Apidae); et dans l'ordre des collembolés, une espèce de collembolés *Folsomia candida* (Isotomidae).

Une activité insecticide biologiquement significative a seulement été observée vis à vis d'espèces de l'ordre des lépidoptères

Les études évaluant les effets potentiels des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 sur les organismes non cibles ont démontré que comme avec les autres protéines *Bt* Cry, les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 ne montrent pas d'effet inacceptables sur l'espèce aviaire représentative testée (le colin de Virginie), les organismes aquatiques (Cladoceran, *Daphnia magna*) et les invertébrés terrestres bénéfiques (abeille, *Apis mellifera* L.; collembole, *Folsomia candida*; punaise, *Orius insidiosus*; coccinelle, *Coleomegilla maculata*; guêpe parasite, *Ichneumon promissorius*; et ver de terre). Les animaux représentatifs de ces espèces ont été exposés à des feuilles lyophilisées, à du pollen, ou des graines contenant les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2, ou à de hautes concentrations de protéines Cry1A.105 ou Cry2Ab2 purifiées produites par fermentation de *B. thuringiensis* ou *E. coli* sur un substrat artificiel.

En conclusion, en se basant sur le mécanisme bien caractérisé du mode d'action des protéines Cry, sur la sélectivité des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 pour certains lépidoptères, et sur le fait qu'aucun effet nuisible n'a été observé dans de nombreuses études, il est peu probable que le maïs MON 89034 soit nuisible pour les organismes non cibles. Etant donné que le risque d'effets nuisibles directes ou indirectes est négligeable, aucune stratégie de gestion du risque n'est identifiée comme nécessaire.

6. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles entre les PSGM et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les PSGM disséminées ou se trouvant à proximité

Il a été démontré que le maïs MON 89034 est équivalent au maïs conventionnel du point de vue de sa composition, de ses caractéristiques d'innocuité et, de ses caractéristiques agronomiques et phénotypiques, à l'exception des caractères introduits lui conférant une protection contre certains lépidoptères nuisibles. Ces caractères sont conférés par l'expression des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2. Théoriquement, un potentiel toxique et/ou allergène pourrait être associé avec ces protéines nouvellement exprimées dans une culture génétiquement modifiée. Donc, l'expression des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 est une caractéristique des PSGM qui peut, au moins en théorie, causer un effet nuisible sur des personnes en contact avec ces végétaux. Si les protéines introduites avaient un potentiel toxique ou allergène, cela pourrait dès lors entraîner un changement important du point de vue des aspects de sécurité lors des manipulations du maïs.

Puisque cette notification est soumise pour obtenir un accord pour cultiver MON 89034 dans des essais au champ, les seules personnes qui seront en contact avec ce maïs seront des scientifiques ou des techniciens réalisant ces essais. L'exposition de ces techniciens au maïs MON 89034 et ses graines ne sera pas différente de celle au maïs conventionnel.

Le potentiel d'effet nuisible sur la santé humaine dû aux protéines nouvellement exprimées dans le maïs MON 89034 a été analysé dans la section D.7. Il a été conclu que les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 sont sans risque pour la santé humaine sur les bases suivantes: a) leur caractérisation détaillée, b) le manque d'homologie avec des toxines protéiques et allergènes connus, c) leur rapide digestion dans les fluides gastriques et intestinaux simulés, et d) leur manque de toxicité aiguë, comme déterminé dans les études aiguës de gavage chez les rongeurs. Aucune des études n'a montré d'effet nuisible possible sur la santé humaine.

En outre, les données des essais au champ réalisés aux U.S.A., n'ont pas montré de danger particulier pour la santé humaine des professionnels manipulant le maïs MON 89034, danger résultant d'un potentiel toxique ou allergène suite à l'expression des protéines introduites

En conclusion, la probabilité d'effets néfastes sur la santé des individus entrant en contact avec le maïs MON 89034 n'est pas différente de celle du maïs conventionnel. En effet, ce maïs contient les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2, citées ci-dessus, protéines présentant un risque toxique ou allergène négligeable. L'incidence sur la santé des individus en contact avec

ce maïs étant négligeable, aucune stratégie de gestion du risque n'est identifiée comme pertinente.

7. Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé des animaux et conséquences pour la chaîne alimentaire résultant de la consommation de l'OGM ou de tout produit dérivé s'il est destiné à être utilisé en tant qu'aliment pour animaux

Le maïs MON 89034 est équivalent en substance au maïs conventionnel à l'exception de caractères introduits conférant une protection contre certains lépidoptères. Au cours des siècles d'expérience avec le maïs conventionnel, domestiqué en Europe, aucun effet néfaste sur la santé du bétail n'a été répertorié. Théoriquement, une toxicité potentielle ou une déficience nutritionnelle pourrait résulter des protéines nouvellement exprimées dans la culture, c'est-à-dire les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2. Si ces protéines introduites dans le maïs MON 89034 avaient un potentiel toxique ou allergène ou un effet néfaste sur la comestibilité de ce maïs, alors cela pourrait entraîner un changement important des aspects nutritionnels et sécurité alimentaire de ce maïs. Ce changement pourrait potentiellement conduire à l'altération des productions de l'animal tels qu'un changement de sa courbe de croissance, de sa capacité à se nourrir, de sa production de lait ou une altération de sa santé.

Puisque cette notification est soumise afin d'obtenir une autorisation de réaliser des essais au champ avec MON 89034 et n'inclut pas l'utilisation des récoltes dans l'alimentation animale, la probabilité d'observer des effets nuisibles dans la chaîne alimentaire humaine/animal résultant d'une exposition alimentaire des animaux d'élevages aux protéines introduites, est négligeable.

Comme précédemment discuté dans la section D.7, les protéines Cry1A et Cry2Ab2 exprimées ont un historique de sécurité d'utilisation. Les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 n'ont pas montré de signe de toxicité dans l'étude aiguë orale par gavage chez la souris, elles se dégradent rapidement dans les fluides gastriques et intestinaux simulés et aucune similarité structurelle biologiquement pertinente à des allergènes ou toxines humaines et animales n'a été observée. En outre, des études analytiques ont montré que MON 89034 est de composition et nutritionnellement équivalent au maïs conventionnel et est dès lors comme ce dernier aussi sûr que le maïs conventionnel pour l'alimentation humaine et animale.

En conclusion, la probabilité d'observer des effets nuisibles sur la santé des animaux nourris avec MON 89034 et pour les humains consommant ces animaux, est négligeable. De ce fait, le risque inhérent à ce maïs dans la

chaîne alimentaire humaine/animale est aussi négligeable et dès lors aucune stratégie de gestion du risque n'est considérée comme nécessaire.

8. Incidences immédiates et/ou différées que les processus biogéochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de l'OGM et des organismes cibles et non cibles à proximité du ou des OGM disséminés

D'une manière générale la production de maïs est connue pour avoir des impacts indirects sur les processus bio-géochimiques au travers du labour, de la fertilisation et de l'établissement de la monoculture dans une zone définie. Comme le maïs MON 89034 est de composition identique au maïs conventionnel et a des caractéristiques agronomiques et phénotypiques équivalentes (voir Sections D.4 et D.7), il n'y a aucune évidence montrant que ce maïs aurait une influence différente du maïs conventionnel sur les taux de nutriments dans le sol.

Théoriquement, l'expression des protéines introduites Cry1A.105 et Cry2Ab2 est une caractéristique des PSGM qui pourrait indirectement entraîner un effet environnemental nuisible sur les processus bio-géochimiques. Si les protéines introduites dans MON 89034 exerçaient potentiellement un effet nuisible sur les populations de bioréducteurs et/ou détritivores dans le sol, alors les processus biogéochimiques dans lesquels sont impliqués ces organismes pourraient être touchés, ce qui entraînerait un changement dans les cycles nutritionnels dans l'environnement.

En outre, puisque cette notification est soumise dans l'objectif d'obtenir une autorisation pour réaliser des essais au champ avec MON 89034, la probabilité d'avoir une exposition importante de l'écosystème du sol à ce maïs et un changement radical de sa composition est négligeable.

Bien que les protéines Cry présentes dans du MON 89034 en décomposition soient considérées comme des protéines nouvellement exprimées dans le maïs, ce ne sont pas de nouvelles protéines dans le sol. Les décomposeurs et détritivores interagissant dans le sol ont été historiquement exposés à une diversité de protéines *Bt* provenant du génome des bactéries du sol (*i.e.* *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp *kumamotoensis*). Dès lors, il n'y a pas *a priori* de raison de penser que les protéines Cry puissent avoir un effet néfaste sur les fonctions de décomposition.

En outre, il a été démontré que ces protéines sont rapidement dégradées dans le sol (Palm *et al.*, 1994; Pruett *et al.*, 1980; Sims and Holden, 1996; West, 1984; West *et al.*, 1984). Cette rapide dégradation confirme l'absence d'effets nuisibles des protéines Cry vis à vis des organismes impliqués dans la décomposition et sur les organismes non cibles vivant dans le sol en général.

Les toxines Cry ont un mécanisme d'action spécifique à certains lépidoptères nuisibles et il n'existe aucun site de liaison de cette toxine à des récepteurs chez les organismes non cibles (voir point 5, ERA Section).

En conclusion, les effets nuisibles sur les cycles des substances nutritives dans le sol, résultant des effets nuisibles potentiels des protéines introduites sur les organismes cibles ou non impliqués dans les processus biochimiques du sol, sont négligeables et il n'est dès lors pas nécessaire de mettre en place des stratégies de gestion du risque.

9. Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte utilisées pour les PSGM peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées

Comme le maïs MON 89034 est équivalent au maïs conventionnel (à l'exception des caractères introduits de protection contre les lépidoptères nuisibles, toutes les pratiques agronomiques actuelles utilisées pour la culture du maïs en Europe reste applicables au maïs MON 89034. Aucune nouvelle technique ou technique spécifique de culture, de gestion du risque ou de récolte n'est nécessaire.

On s'attend en fait à ce que la production du maïs MON 89034 améliore les pratiques agronomiques actuellement utilisées en culture du maïs et apporte des bénéfices aux agriculteurs et à l'environnement. Les bénéfices de la culture de ce maïs résultent, d'une part, des caractères introduits lui conférant une protection contre certains insectes et incluent:

- 1) un moyen fiable pour le contrôle de lépidoptères nuisibles spécifiques du maïs
- 2) un contrôle des insectes cibles tout en maintenant les insectes utiles
- 3) une utilisation réduite des insecticides chimiques dangereux (Rice and Pilcher, 1999) et une exposition réduite des utilisateurs à ces produits
- 4) une excellente compatibilité avec la lutte intégrée (IPM) et les concepts d'agriculture durable
- 5) une réduction potentielle des niveaux de mycotoxines telle que les fumonisines dans les grains de maïs (Masoero *et al.*, 1999; Munkvold *et al.*, 1999)
- 6) une probabilité réduite pour les lépidoptères de développer une résistance aux protéines *Bt*
- 7) pas d'exigences supplémentaires de travail ou d'équipement, permettant aux petits et gros exploitants de maximiser la production de ces hybrides.

En conclusion, aucune pratique culturale spécifique n'étant nécessaire à la culture du maïs MON 89034, ce dernier ne devrait pas causer d'effet nuisible sur l'environnement. C'est pourquoi, l'impact environnemental des techniques culturales, de gestion et de récolte appliquées dans les essais techniques n'est pas considéré comme différent de la culture d'un autre maïs. Comme le risque est négligeable, aucune stratégie de gestion du risque n'est identifiée comme pertinente.

Liste des références

- AGPM. (1999) Dispersion du pollen en production de maïs consommation. *Etude réalisée dans le cadre de comité de biovigilance.*
- Bakan, B., Mecion, D., Richard-Molard, D. and Cahagnier, B. (2002) Fungal growth and *Fusarium Mycotoxin* content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 728-731.
- Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V. and Kemp, J.D. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti Plasmid pTi15955. *Plant. Mol. Biol.*, **2**, 335-350.
- Baum, J.A. (1998) Transgenic *Bacillus thuringiensis*. *Phytoproction*, **79**, 127-130.
- Baum, J.A., Johnson, T.B. and Carlton, B.C. (1999) *Bacillus thuringiensis* natural and recombinant bioinsecticide products. *Methods in biotechnology*, **5: Biopesticides: use and delivery**, 189-209.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H. (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, **19**, 327-36.
- Betz, F.S., Hammond, B.G. and Fuchs, R.L. (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Reg. Toxicology and Pharmacology*, **32**, 156-173.
- Bevan, M., Barnes, W.M. and Chilton, M.D. (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 369-385.
- Bodet, J.M., Straebler, M. and Broucqsault, L.M. (1994) Type de jachère et couvert. *Receuil des communications du colloque "Jachères 94"*, 19-41.
- Brown, S.M. and Santino, C.G. (1995) Enhanced expression in plants. *United States Patent, Patent number 5.424.412.*
- Craig, W.F. (1977) Production of hybrid corn seed. *Corn and Corn Improvement*, 671-719.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Daen, D.H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 807-813.
- De Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. and Schnepf, H.E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 409-433.

- De Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Genetics*, **17**, 193-199.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 561-573.
- Devos, Y., Reheul, D. and De Schrijver, A. (2005) Review: The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross fertilization. *Environ. Biosafety Res.*, **4**, 71-87.
- Donovan, W.P. (1991) CryIIIB crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. *United States Patent*, **5.073.632**.
- English, L.H. (1992) Recovery of Bt endotoxin protein from lysed cell mixtures. *United States Patent*, **Patent number 5,173,409**.
- Etzel, R.A. (2002) Mycotoxins. *JAMA*, **287**, 425.
- Goss, J.A. (1968) Development, physiology and chemistry of corn and wheat pollen. *The botanical review*, 333-358.
- Hallauer, A.R. (1995) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn.
- Halsey, M.E., Remund, K.M., Davis, C.A., Qualls, M., Eppard, P.J. and Berberich, S.A. (2005) Isolation of maize from pollen-mediated gene flow by time and distance. *Crop Sci.*, **45**, 2172-2185.
- Hansen, L. (1999) Non-target effects of Bt corn pollen on the monarch butterfly (*Lepidoptera Danaidae*). *Abstracts from the 54th Annual meeting North Central Branch of the Entomological Society of America*.
- Herrero, M.P. and Johnson, R.R. (1980) High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Science*, **20**, 796-780.
- Hicks, D.A. and Thomison, P.R. (2004) Corn Management. *Corn: Origin, History, Technology, and Production*, **Chapter 3.2**, 481-522.
- Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. and Crowe, J.H. (1989) Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant. cell and environment*, **12**, 83-91.
- Hussein, S. and Brasel, J.M. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167**, 101-134.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O. and Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, **122**, 179-188.

- Jones, M.D. and Newell, L.C. (1948) Longevity of pollen and stigmas of grasses: buffalo grass, *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm, and corn, *zea mays* L. *Journal of Am. Soc. of Agronomy*, **40**, 195-204.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. (1987) Duplication of CaMV 35S Promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, **236**, 1299-1302.
- Kiesselbach, T.A. (1949) The structure and reproduction of corn. *Nebraska agricultural experiment station bulletin*, **161**, 1-66.
- Lamppa, G.K., Morelli, G. and Chua, N.H. (1985) Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1370-8.
- Little, T.M. and Hills, F.J. (1978) Analysis of counts. *Agricultural Experimentation*, 268-282.
- Lonnquist, J.H. and Jugenheimer, R.W. (1943) Factors affecting the success of pollination in corn. *Journal of the American society of agronomy*, 923-933.
- Luna, V., Figueroa, J.M., Baltazar, B.M., Gomez, R.L., Townsend, R. and Schoper, J.B. (2001) Maize pollen longevity and distance isolation requirement for effective pollen control. *Crop Sci.*, **41**, 1551-1557.
- Ma, B.L., Subedi, K.D. and Reid, L.M. (2004) Crop ecology, management & quality - extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. *Crop Sci*, **44**, 1273-1282.
- Magg, T., Melchinger, A.E., Klein, D. and Bohn, M. (2002) Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparts, and commercial varieties. *Plant Breeding*, **121**, 146-454.
- Mamarot, J. and Rodriguez, A. (1994) Etude du salissement des sols par la jachère en région Midi-Pyrénées. *Recueil des communications du colloque "Jachères"*, 107-111.
- Masoero, F., Moschini, M., Rossi, F., Prandini, A. and Pietri, A. (1999) Nutritive value, mycotoxin contamination and *in vitro* rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A(B)) grown in northern Italy. *Maydica*, **44**, 205-209.
- Matsuoka, M., Ka, Y., Tanaka, Y., Ozeki, Y. and Moto, N. (1987) Nucleotide sequence of cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from maize. *J. Biochem*, **102**, 673-676.

- Matthews, P.R., Wang, M.B., Waterhouse, P.M., Thornton, S., Fieg, S.J., Glubler, F. and Jacobsen, J.V. (2001) Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent 'twin T-DNA's on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Mol. Breeding*, **7**, 195-202.
- McElroy, D., Blowers, A.D., Jenes, B. and Wu, R. (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol Gen Genet*, **231**, 150-60.
- McElwain, E.F. and Spiker, S. (1989) A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 1764.
- Messeguer, J. (2003) Gene flow assessment in transgenic plants. *Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics*, **73**, 201-212.
- Miller, M., Tagliani, L., Wang, N., Berka, B., Bidney, D. and Zhao, Z.Y. (2002) High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. *Transgenic Research*, **11**, 381-396.
- Munkvold, G. (2002) Nontarget effects of Bt corn on pathogenic and toxigenic fungi. *Leopold Center for sustainable Agriculture*, **11**, 42-44.
- Munkvold, G.P., Hellmich, R.L. and Rice, L.G. (1999) Comparison of fumonisin concentrations in Kemels of transgenic Bt Maize hybrids and non-transgenic hybrids. *Plant disease*, **83**, 130-138.
- Munkvold, G.P., Hellmich, R.L. and Showers, W.B. (1997) Reduced Fusarium ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology*, **87**, 1071-1077.
- Noteborn, H.P. and Kuiper, H.A. (1994) Safety assessment strategies for genetically modified plant products: a case study of *Bacillus thuringiensis*-toxin tomato. *Biosafety of foods derived by modern biotechnology, BATS*.
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, **313**, 810-812.
- OECD. (2002) Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. *Organization of European Cooperation and Development, Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, OECD ENV/JM/MONO (2002)25*.
- OECD. (2003) Consensus Document on the Biology of *Zea Mays* Subsp. *Mays* (Maize). <http://www.oecd.org/>

- Palm, C.J., Donegan, K., Harris, D. and Seidler, R.J. (1994) Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Molecular Ecology*, **3**, 145-151.
- Palm, C.J., Schaller, D.L., Donegan, K.K. and Seidler, R.J. (1996) Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. *Can.J.Microbiol.*, **42**, 1258-1262.
- Pleasants, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E., Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, T.L. and Jones, G.D. (2001) Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11919-11924.
- Pruett, C.J.H., Burges, H.D. and Wyborn, C.H. (1980) Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **35**, 168-174.
- Raynor, G.S., Ogden, E.C. and Hayes, J.V. (1972) Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal*, **64**, 420-427.
- Rice, M.E. and Pilcher, C.D. (1999) Bt corn and insect resistance management: farmer perceptions and educational opportunities. *A poster presented at the 1999 meeting of the Entomological Society of America.*
- Rogers, S.G. (2000) Promoter for transgenic plants. *United States Patent, Patent number 6.018.100.*
- Rossmann, E.C. (1949) Freezing injury of inbred and hybrid maize seed. *Agronomy Journal*, 574-583.
- Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Lüthy, P. and Wolfersberger, M.G. (1986) *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺ - gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Letters*, **204**, 213-218.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual.
- Sears, M. and Stanley-Horn, D. (2000) Impact of *Bt* corn pollen on monarch butterfly populations. *6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms.*
- Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E. and Matilla, H.R. (2000) Impact of *Bt* pollen on 1st and 3rd instar monarchs in field studies. *Presented at the USDA Monarch Data Review, To be published.*
- Shaw, R.H. (1988) Climate requirement. *Corn and Corn Improvement*, 609-638.

- Sims, S.R. and Holden, L.R. (1996) Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissue. *Environmental entomology*, **25**, 659-664.
- Van Mellaert, H., Van Rie, J., Hofmann, C. and Reynaerts, A. (1988) Insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*: mode of action and expression in transgenic plants. *Conference on biotechnology, Biological pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management*.
- West, A.W. (1984) Fate of the insecticidal, proteinaceous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Soil Biol. Biochem*, **16**, 357-360.
- West, A.W., Burges, H.D., White, R.J. and Wyborn, C.H. (1984) Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. *J. Invertebr. Pathol.*, **44**, 128-133.
- White, P.J. and Pollack, L.M. (1995) Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition, and nutritive values. *Cereal Foods World*, **40**, 756-762.
- Widner, W.R. and Whiteley, H.R. (1989) Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J Bacteriol*, **171**, 965-74.
- Wu, F. (2006) Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Research*, **15**, 277-289.
- Wych, R.D. (1988) Production of hybrid seed corn. *Corn and Corn Improvement: Agronomy Monograph*, **18**, 565-607.