



**Demande d'autorisation pour expérimentation
au champ avec des plantes transgéniques.**

Maïs transgénique (MON 88017 x MON 810)

**Programme d'expérimentation annuel pour le développement
de lignées et d'hybrides de maïs transgénique :**

- protégé contre la chrysomèle du maïs (*Diabrotica virgifera*),
- tolérant au glyphosate, matière active du ROUNDUP®*
- protégé contre la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) et la sésamie (*Sesamia spp*)

2007

**DEMANDE DEPOSEE EN NOVEMBRE 2006 PAR MONSANTO AGRICULTURE FRANCE SAS
IDENTIQUE A CELLE DEPOSEE EN DECEMBRE 2005**

SOMMAIRE

INTRODUCTION	5
PROBLEMATIQUE ET BENEFICES ATTENDUS DU MAÏS MON 88017 X MON 8108	
Préalablement à la présentation du dossier réglementaire, ce préambule présente les bénéfices attendus du maïs transgénique MON 88107 x MON 810 pour le désherbage de la culture de maïs ou la protection de celle-ci vis-à-vis de ravageurs.	8
<i>1) Description de l'événement de maïs MON 88017 x MON 810.....</i>	<i>8</i>
<i>2) Présentation des trois ravageurs cibles : la chrysomèle, la pyrale et la sésamie</i>	<i>8</i>
<i>3) Les moyens de lutte conventionnels contre ces trois ravageurs.....</i>	<i>17</i>
<i>4) Le maïs génétiquement modifié protégé contre des insectes ravageurs: maïs Bt</i>	<i>20</i>
<i>5) Le maïs tolérant au glyphosate.....</i>	<i>21</i>
A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL.....	26
1) Nom et adresse du notifiant.	26
2) Qualifications et expérience des scientifiques responsables.	26
3) Titre du projet.	26
B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES.	27
1) Nom complet.....	27
2) Informations concernant la reproduction.....	27
3) Capacité de survie.....	28
4) Dissémination.	28
5) Distribution géographique de la plante.....	28
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.....	29
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 sa toxicité pour les hommes, les animaux et d'autres organismes.....	29
C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE.	30
1) Description des méthodes utilisées pour la modification génétique.....	30
2) Nature et source du vecteur utilisé.....	30
3) Taille, origine des organismes donneurs et fonction recherchées de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion.....	31
D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE.	32
1) Description du ou des caractères et des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés.	32
2) Informations sur les séquences réellement insérées ou délétées.	33
3) Informations concernant l'expression de l'insert.	36
4) Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice.....	37
5) Stabilité génétique de l'insert et stabilité phénotypique de la plante supérieure génétiquement modifiée.....	38
6) Toute modification de la capacité de la plante supérieure génétiquement modifiée à transférer du matériel dans d'autres organismes.	38

7) Information concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultant de la modification génétique sur la santé humaine.....	38
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 plante supérieure génétiquement modifiée est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux.	40
9) Mécanisme d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant).....	40
10) Modifications potentielles des interactions de la plante supérieure génétiquement modifiée avec les organismes non cibles résultant de la modification génétique.	41
11) Interactions potentielles avec l'environnement abiotique.	42
12) Description des méthodes de détection et d'identification de la plante génétiquement modifiée.	42
13) Informations, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée.....	43
E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION.....	44
1) Localisation et étendue des sites de dissémination.....	44
2) Description de l'écosystème des sites de dissémination, y compris le climat, la flore et la faune.....	45
3) Présence d'espèces apparentées sauvages sexuellement compatibles ou d'espèces cultivées végétales sexuellement compatibles.....	45
4) Proximité des sites de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées.	45
F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION.....	46
1) Objectifs de la dissémination.....	46
2) Date(s) et durée prévues de l'opération.	47
3) Méthode de dissémination envisagée.	47
4) Méthode de préparation et gestion du site avant, pendant et après la dissémination, y compris les pratiques culturales et les modes de récolte.	48
5) Nombre approximatif de plantes (ou de plantes par mètre carré).....	48
G. INFORMATION SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTROLE ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION.....	49
1) Précautions prises	49
2) Description des méthodes de traitement du site après dissémination.....	50
3) Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris les déchets.	50
4) Description des plans et des techniques de surveillance.	51
5) Description des plans d'urgence.....	51
6) Méthodes et procédures de protection du site.....	51
AUCUNE PROCEDURE PARTICULIERE DE PROTECTION DU SITE N'EST ENVISAGEE. CERTAINES MESURES POURRAIENT EVENTUELLEMENT ETRE PRISES, S'IL Y AVAIT LIEU, DURANT LA CONDUITE DE L'EXPERIMENTATION.....	51
H. EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL ANNEXE II (DIRECTIVE 2001/18/CE).....	52

1) Probabilité que les plantes supérieures génétiquement modifiées deviennent plus persistantes que les plantes parentales ou réceptrices dans les habitats agricoles ou se propagent plus rapidement dans les habitats naturels.....	52
2) Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plantes supérieures génétiquement modifiées.....	54
3) Possibilité de transfert de gènes aux mêmes espèces ou à d'autres espèces végétales sexuellement compatibles dans les conditions de plantation de la plante supérieure génétiquement modifiée et avantages ou inconvénients sélectifs conférés à ces espèces végétales.....	56
4) Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes supérieures génétiquement modifiées et les organismes cibles, tels que prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes peuvent avoir sur l'environnement (le cas échéant)....	57
5) Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes supérieures génétiquement modifiées 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.....	59
6) Effets immédiats et/ou différés éventuels sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles entre les plantes supérieures génétiquement modifiées et les personnes travaillant ou entrant en contact avec la ou les PSGM disséminées ou se trouvant à proximité.....	64
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.....	65
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.....	66
9) Incidences immédiates et/ou différées, directes ou indirectes, que les techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte utilisées pour les plantes supérieures génétiquement modifiées peuvent avoir sur l'environnement lorsqu'elles sont différentes de celles utilisées pour des plantes supérieures non génétiquement modifiées.....	68
10) Détermination du risque global de l'OGM.....	69
BIBLIOGRAPHIE	70

INTRODUCTION

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 MON 88017 x MON 810 de façon à permettre l'évaluation de l'impact sanitaire et environnemental de leur dissémination en vue de la délivrance d'une autorisation d'expérimentation au champ pour l'année 2007.

Les variétés de maïs MON 88017 x MON 810 sont obtenues par croisement conventionnel de lignées de maïs transgéniques MON 88017 et MON 810 (*Figure 1*) :

- le maïs MON 88017 est protégé contre la chrysomèle, un ravageur coléoptère du maïs, et est tolérant au glyphosate
- le maïs MON 810 est protégé contre certains ravageurs lépidoptères (pyrale et sésamie)

Figure 1 : Présentation de MON 88017 x MON 810

	Lignées	Tolérance aux herbicides	Résistance aux insectes
Variété de maïs MON 88017xMON 810	Lignée MON 88017	Tolérance au Roundup	Efficace contre la chrysomèle
	Lignée MON 810		Efficace contre la pyrale et la sésamie

Le maïs MON 88017 x MON 810 a hérité d'une part des traits de protection contre la chrysomèle et de tolérance au glyphosate issu de MON 88017 et d'autre part, du trait de protection contre certains ravageurs lépidoptères cibles (pyrale et sésamie) issu du MON 810.

MON 88017 x MON 810 regroupe donc 3 traits :

1. L'expression de la protéine **Cry3Bb1 (événement MON 88017)** qui est une protéine *Bt* (issue de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*) conférant la protection vis-à-vis de la chrysomèle du maïs (*Diabrotica virgifera*). Cette protection est spécifique des ravageurs coléoptères du genre des chrysomélidés. La protéine Cry3Bb1 doit être ingérée par l'insecte pour avoir un effet insecticide (Huber and Lüthy, 1981). Dans l'intestin de l'insecte larvaire cible, elle est activée par des protéases (Wolfersberger *et al.*, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a). Chez les insectes cibles, la protéine activée reconnaît et se lie aux protéines spécifiques de la surface des cellules intestinales. L'intestin se trouve alors paralysé, causant l'arrêt de l'alimentation de l'insecte larvaire et sa mort. A noter qu'il n'y a pas de site de fixation pour la protéine *Bt* activée à la surface des cellules intestinales des mammifères ; par conséquent, l'homme n'est pas sensible à ces protéines (Hofmann *et al.*, 1988b; Noteborn and Kuiper, 1995; Sacchi *et al.*, 1986).
2. L'expression de la protéine **CP4 EPSPS (événement MON 88107)** qui confère la tolérance au glyphosate. Cet herbicide systémique, non sélectif est absorbé par les parties vertes des plantes. Dans du maïs non tolérant, le glyphosate (N-(phosphonométhyl)glycine) agit en inhibiteur de l'enzyme 5 énoypyruvyl-shikimate-3-phosphate synthétase (EPSPS). Cette EPSPS est un précurseur du chorismate, qui est à l'origine de la synthèse des acides aminés aromatiques, tryptophane, phénylalanine et tyrosine ainsi que de nombreuses hormones, des coumarines, des flavones et des lignines.

Ce blocage inhibe ainsi la synthèse protéique par la plante, essentielle à sa survie. Cette voie de biosynthèse existe chez toutes les plantes et beaucoup de micro-organismes, mais n'existe pas chez les animaux. La protéine CP4 EPSPS issue d'une bactérie du sol, n'est pas inhibée par le glyphosate. Son expression dans une plante transgénique permet à la plante de tolérer le traitement d'herbicides à base glyphosate.

3. L'expression de la protéine **Cry1Ab (événement MON 810)**, qui confère aux plants de maïs la protection contre certains insectes nuisibles lépidoptères, incluant la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) et la sésamie (*Sesamia* spp.). L'activité insecticide de la protéine Cry1Ab est spécifique aux attaques des larves de lépidoptères cibles. Elle agit comme la protéine Cry3Bb1 mais sur ces ravageurs lépidoptères.

Par conséquent, l'utilisation du MON 88017 × MON 810 permettra à l'agriculteur de contrôler efficacement certains nuisibles du maïs, garantissant ainsi une réalisation maximum du potentiel de rendement, tout en réduisant les charges de production, de conditionnement et de transports des insecticides, utilisés pour lutter contre la chrysomèle, la pyrale et la sésamie. De plus, l'usage de traitement au glyphosate permettra un désherbage efficace des parcelles avec un produit présentant un profil éco-toxicologique favorable.

En 2006, ce dossier de demande de permis sous partie B a déjà fait l'objet d'un avis de la CGB qui a conclu le 27 janvier que le maïs MON 88107 x MON 810 « ne présente pas de risque pour l'environnement et pour la santé publique ».

MON 810 a d'ores et déjà été autorisé à la mise sur le marché en Europe, consécutivement à une revue complète du dossier de notification (C/FR/95/12-02) sous les dispositions de la Directive 90/220/EEC (abrogée par la Directive 2001/18/EC).

En outre, deux autres maïs transgéniques exprimant chacun un des traits présents dans MON 88017 ont déjà fait l'objet de culture commerciale : MON 863, exprimant une protéine Cry3Bb1 et NK603 exprimant la protéine CP4 EPSPS (Cf. tab. 1).

La protéine Bt Cry3Bb1 exprimée par MON 88017 est quasi identique à la protéine exprimée dans le MON 863 (un acide aminé de différent sur les 653 de la protéine, homologie de 99,8 %). Les séquences contrôlant et favorisant l'expression de ce gène *Bt* dans la séquence insérée sont identiques. **MON863** est déjà homologué pour la culture et la consommation humaine aux USA depuis 2003. En application de la directive 2001/18/CE, MON 863 est autorisé pour l'import dans l'Union Européenne depuis 2005. Une demande d'autorisation d'import sous le règlement Novel Food est également en cours d'instruction.

MON 863 x MON 810 fait l'objet d'une demande d'autorisation pour l'import selon la directive 2001/18 et le règlement 1829/2003 GMFF. Préalablement, les maïs MON863 et MON 863 x MON 810 ont déjà fait l'objet d'avis jugeant de l'innocuité de ces maïs de la part de plusieurs agences en Europe (AFSSA (2004), CGB (2004), EFSA (2004)).

La tolérance au glyphosate est identique à celle exprimée par **NK603**. En application de la Directive 2001/18/CE, NK603 a reçu une autorisation d'importation dans l'Union Européenne en 2004. NK603 fait l'objet d'une demande d'autorisation de culture selon le règlement 1839/2003-GM/FF.

Tableau 1 : Présentation comparée des événements MON 88017 x MON 810, MON 88017, MON863, NK603 et MON 810.

	MON88017x MON810	MON 88017	MON863	NK603	MON 810
Protéines exprimées	Cry3Bb1 CP4 EPSPS Cry1Ab	Cry3Bb1 CP4 EPSPS	Cry3Bb1	CP4 EPSPS	Cry1Ab
Trait	Protection contre la chrysomèle, tolérance au glyphosate protection contre la pyrale et la sésamie	Protection contre la chrysomèle, tolérance au glyphosate	Protection contre la chrysomèle	Tolérance au glyphosate	Protection contre la pyrale et la sésamie
Statut réglementaire aux Etats Unis	Voir statut MON 88017	Soumis à l'USDA et au FDA en 2004	Commercialisé depuis 2003	Commercialisé depuis 1998	Commercialisé depuis 1996
Statut réglementaire dans l'UE	Soumission 2001/18/CE en 2005	Soumission 2001/18/CE en 2005	Autorisé import sous 2001/18, en 2005 Demande import sous Novel Food en cours	Autorisé sous 2001/18-import et « <i>Novel Food</i> » en 2004 Soumis pour la culture 1829/2003-GMFF	Commercialisé depuis 1998 (en Espagne)
Statut en France	Demande permis partie B : Avis innocuité 12 avril 2005 (<i>CGB 2005</i>)	Demande permis partie B : Avis innocuité 12 avril (<i>CGB 2005</i>)	Partie C import Avis innocuité de la CGB (<i>CGB 2004</i>) et de l'AFSAA (<i>Afsaa 2004</i>)	Partie C import Avis innocuité de la CGB (<i>CGB 2003</i>) et AFSAA (<i>Afsaa 2004-bis</i>)	Autorisé à la culture en France JO-3A098-AGPR9801536A

PROBLEMATIQUE ET BENEFICES ATTENDUS DU MAÏS MON 88017 x MON 810

Préalablement à la présentation du dossier réglementaire, ce préambule présente les bénéfices attendus du maïs transgénique MON 88107 x MON 810 pour le désherbage de la culture de maïs ou la protection de celle-ci vis-à-vis de ravageurs.

1) Description de l'événement de maïs MON 88017 x MON 810

Le maïs est une plante de première importance dans la nourriture humaine et animale. Ces 50 dernières années, les rendements de cette culture ont continuellement augmenté grâce à la sélection variétale (meilleures résistances au froid, à la densité, à la verse, au charbon,...) et à l'amélioration des techniques culturales qui permettent à l'agriculteur de protéger le rendement de sa culture.

Le maïs peut être exposé à différents types de nuisibles comme :

- des insectes ravageurs qui peuvent provoquer des pertes quantitatives et qualitatives importantes des récoltes.
- des mauvaises herbes qui entrent en concurrence avec la culture : dans le cas du maïs, le désherbage est d'autant plus important que cette plante est particulièrement sensible à la concurrence des mauvaises herbes dans le démarrage de la culture.

MON 88017 x MON 810 résulte d'un croisement conventionnel entre deux lignées génétiquement modifiées : MON 88017 (protégé contre la chrysomèle (famille des Coléoptères) et tolérant au glyphosate) et MON 810 (protégé contre la pyrale et la sésamie (famille des lépidoptères)) (*Figure 1*)

Les informations présentées dans ce document sont issues majoritairement de documents du POECB, d'Europabio, FREDEC, du GNIS, de l'INRA et de l'AGPM Technique ¹

2) Présentation des trois ravageurs cibles : la chrysomèle, la pyrale et la sésamie

Depuis 1992, la chrysomèle du maïs est apparue en Europe via les Balkans. Ce nouveau ravageur en Europe est déjà considéré par les experts comme très nuisible dans certains pays comme la Serbie, la Bosnie et la Hongrie. Les professionnels de l'Europe de l'Ouest sont très inquiets car la progression vers l'Ouest de ce coléoptère semble inéluctable.

¹ Dossier 2003 du POECB, Programme Opérationnel d'Evaluation des Cultures issues des Biotechnologies
Fiche technique de Europabio sur la pyrale -Septembre 2002

Fiche technique de la FREDEC (Fédération régionale de défense contre les organismes nuisibles des cultures) :
www.fredec-mp.com/accueil.htm (publication) -

Site du GNIS : www.gnis-pedagogie.org/pages/docbio/chap2/2.htm

Le HYPP diffusé par INRA Editions : www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/pa.htm

Le manuel de référence technique Maïs Grain - Maïs Fourrage de L'AGPM Technique

Le numéro 8 de *biotech actu* « spécial chrysomèle » - Nov -décembre 2003

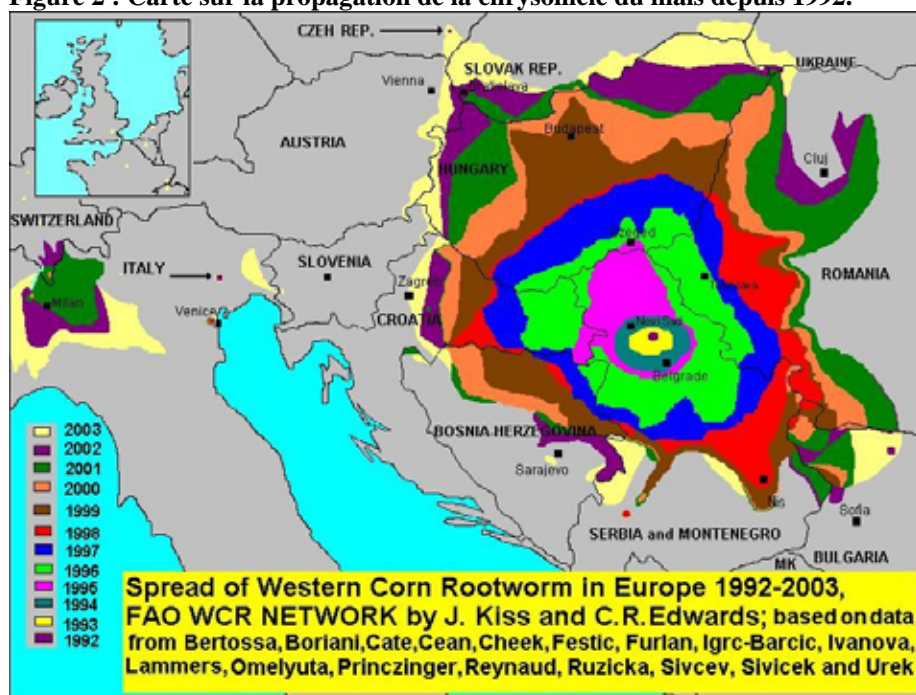
En Europe, la pyrale et la sésamie, deux insectes lépidoptères sont déjà considérés comme des ravageurs très nuisibles du maïs.

a) Zone de nuisibilité des trois ravageurs cibles

i) *La chrysomèle*

La chrysomèle du maïs, *Diabrotica virgifera* est un coléoptère originaire d'Amérique centrale, il a progressivement envahi l'Amérique du Nord. Aujourd'hui, il est le principal ravageur du maïs sur le continent américain. La lutte contre ce ravageur y est la principale utilisation d'insecticides sur le maïs.

Figure 2 : Carte sur la propagation de la chrysomèle du maïs depuis 1992.



La chrysomèle est signalée pour la première fois en Europe près de l'aéroport de Belgrade, en 1992. L'insecte s'est ensuite rapidement répandu dans les pays voisins (*Figure 2*). Un foyer a été détecté en Italie en 1998. En août 2002, l'insecte a été signalé pour la première fois en France, en région parisienne à proximité des aéroports d'Orly, de Roissy et du Bourget, grâce au dispositif de pièges à phéromone mis en place par les Directions régionales de l'Agriculture et de la forêt, les Services régionaux de la Protection des Végétaux (DRAF/SRPV) et par l'Association Générale des Producteurs de Maïs (AGPM). En juillet 2003, un nouveau foyer d'infestation a été identifié en Alsace, près de l'aéroport de Bâle-Mulhouse.

En 2004 et 2005, aucun vol n'a été observé en Alsace. Par contre, plusieurs nouveaux foyers ont été détectés en Ile de France. En 2005, pour la première fois, un foyer a été détecté dans le Sud de la Picardie, à Méru dans l'Oise.

ii) *La pyrale et la sésamie*

La pyrale est présente sur les trois quarts du territoire français alors que la sésamie est présente dans le quart sud-ouest (*Figure 3*). Un tiers des surfaces de maïs françaises est infesté par ces ravageurs et environ 15 % doivent être protégés par des traitements insecticides classiques ou biologiques pour parer aux dégâts potentiels.

On estime que le seuil de nuisibilité est atteint lorsque la population en culture de maïs-grain atteint 0.8 à 1 chenille par plante à la récolte.

Ainsi, en France, selon les régions et les années, les dégâts provoqués par la pyrale ou la sésamie peuvent occasionner des pertes de rendement atteignant 30%.

Figure 3 – Carte de présence de la pyrale et de la sésamie sur le maïs en France

ECB (*Ostrinia nubilalis*)

Sesamia (*Sesamia nonagrioides*)



b) Biologies et cycles de vie des ravageurs cibles

iii) *La chrysomèle ou Diabrotica virgifera virgifera Le Conte*

La chrysomèle, *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte est un coléoptère de la famille des chrysomélidés. S'il est moyennement nuisible au stade adulte (attaques de soies et de panicules), au stade larvaire (attaques sur racine), ce ravageur s'avère très nuisible pour la culture du maïs.

A la fin du mois d'août, les chrysomèles adultes (*Figure 5*) pondent de petits œufs blancs et ovales de moins de 0,1 mm de longueur. Les œufs hivernent dans le sol, ils passent l'hiver en diapause et résistent au froid. Les jeunes larves éclosent de mai à juin, dès que la température du sol atteint 12 à 13°C (*figure 4*). Les larves (*figure 6*), semblables à de petites chenilles, possèdent trois paires de pattes. Elles sont blanc jaunâtre, avec une capsule céphalique et une plaque anale foncées, et atteignent une longueur de 10 à 18 mm. Les chrysomèles des racines du maïs passent par trois stades larvaires (mue) avant de devenir adultes. Lorsque leur développement est complet, les larves mesurent environ 1,5 cm (fin juin, début juillet). Elles migrent dans le sol vers les racines des jeunes plants de maïs et se nourrissent de ces racines pendant une période de 3 à 4 semaines jusqu'à la mi-juillet à fin juillet environ.

Puis elles s'éloignent des racines et se construisent une petite cellule de terre dans le sol dans laquelle elles se transforment en pupes molles de couleur blanche. Les pupes prennent 1 ou 2 jours pour se transformer en adultes. Les adultes émergent des cases pupales et sortent du sol à partir de la fin du mois de juillet ou au début du mois d'août. Les éclosions peuvent s'échelonner jusqu'à fin septembre.

Figure 4 : Cycle de développement de la chrysomèle du maïs



Les jeunes adultes, qui mesurent 5 à 6 mm, ont des élytres jaune vert striés de noir (*figure 5*). Ils volent activement en début et en fin de journée. Ils se nourrissent des soies et panicules du maïs. Ils vivent 80 à 100 jours. Les femelles pondent entre 600 et 1000 œufs d'août à septembre. L'humidité du sol influe sur le nombre et l'emplacement des œufs pondus. Les chrysomèles pondent plus d'œufs dans un sol humide que dans un sol sec. Il n'y a qu'une génération de chrysomèles par année.



Figure 5 : Chrysomèle adulte

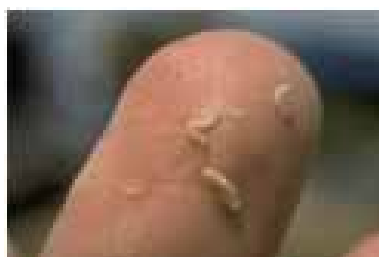


Figure 6 : Chrysomèle larve

iv) *La pyrale*

La pyrale, *Ostrinia nubilalis* de la famille des pyralidés, est un papillon de nuit qui est nuisible au maïs au stade larvaire.

A la ponte, les œufs de pyrales sont regroupés en ooplaques d'une vingtaine d'œufs déposés à la face inférieure des feuilles (*Figure 7*). La larve atteint 2 cm à son complet développement : elle est de couleur gris jaunâtre et présente sur chaque segment six plaques portant chacune une soie (*Figure 8*).



Figure 7 : Ooplaque de pyrale sous une feuille de maïs (Courtin R. / OPIE)



Figure 8 : Larve de pyrale (*Ostrinia nubilalis*)

A l'âge adulte, le papillon a une envergure de 2 à 3 cm : ses ailes antérieures sont larges, fines et jaune pâle avec de fines stries brunes, dentelées et transversales chez la femelle (*Figure 9*). Elles sont plus foncées chez le mâle : ocre à brun foncé (*Figure 10*).



Figure 9 : Adulte femelle sur une feuille de maïs (Courtin R / OPIE)



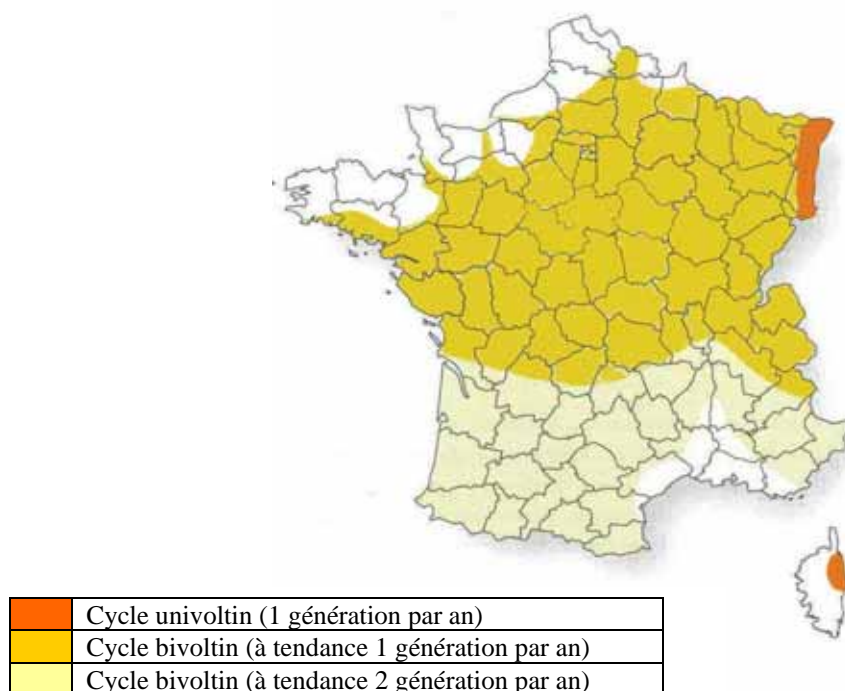
Figure 10 : Adulte mâle sur une feuille de maïs (Courtin R / OPIE)

Le développement embryonnaire de la pyrale dure 5 à 15 jours. Il est favorisé par une hygrométrie élevée, ce qui explique pour partie les niveaux d'infestation variables en fonction des conditions climatiques de l'année. A l'éclosion de l'œuf, les jeunes chenilles se dispersent sur plusieurs feuilles, pénètrent à l'intérieur des cornets des feuilles de maïs et s'installent à leur base pour s'alimenter aux dépens des feuilles enroulées : ceci occasionne des perforations caractéristiques, visibles ultérieurement lors du développement du maïs.

Ces chenilles s'installent ensuite sur la panicule mâle à l'intérieur du cornet. C'est à la floraison qu'elles migrent dans la tige au niveau de l'aisselle des feuilles : elles y creusent alors des galeries dans la tige, ainsi que dans le pédoncule de l'épi ou l'épi lui-même.

En Alsace, les pyrales sont de type univoltine (1 vol), c'est-à-dire qu'elle n'ont qu'un cycle par an quelles que soient les conditions météorologiques. Dans le reste de la France, on rencontre des pyrales de type bivoltine (2 vols) qui ont 2 voir 3 cycles par an selon les conditions météorologiques. Mis à part les années extrêmes comme 2003, dans les conditions météorologiques habituelles, ces larves bivoltines n'ont en général qu'un cycle dans le Nord de la France et souvent 2 cycles dans la partie Sud (*Figure 11*).

Figure 11 : Répartition géographique de la pyrale en fonction des cycles



v) *La sésamie*

La sésamie, *Sesamia nonagrioides*, de la famille des Noctuelles est un papillon de nuit qui est nuisible au maïs au stade larvaire

L'œuf de sésamie se présente sillonné, blanchâtre à la ponte puis rose crème : ces œufs sont déposés à la gaine des feuilles de maïs, en petits groupes de dizaines d'éléments ; l'éclosion a lieu au bout de 10 à 14 jours. La chenille vit quelques jours aux dépens de la gaine des feuilles avant de gagner la tige où elle y creuse une galerie. Le développement larvaire dure environ 45 jours. A son complet développement, la larve mesure 3 à 4 cm de long; sa couleur varie du jaunâtre au brunâtre avec le dos teinté de roux (*Figures 12, 13 et 14*).



Figure 12 : Larve de sésamie (*Sesamia nonagrioides*) grossie environ 3 fois (GNIS)



Figure 13 : *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Coutin R. / OPIE) Chenille dans un épi de maïs. L'axe de l'épi a été coupé en deux pour montrer la larve.



Figure 14 : *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Coutin R. / OPIE) Adulte au repos sur Maïs

c) Les dégâts occasionnés

vi) *La chrysomèle*

Dans le cas d'une attaque de chrysomèle, les larves se nourrissent de l'extérieur et de l'intérieur des racines entre la mi-juin et la mi-juillet (*Figure 15*), jusqu'à provoquer un déficit nutritionnel et, dans le cas de fortes attaques, déclencher la verse des plants (*Figure 16*). Les adultes se nourrissent du pollen et coupent les soies, ce qui nuit à la pollinisation. La chrysomèle adulte peut parcourir jusqu'à 40 kilomètres et plus selon le vent. Un champ attaqué par plus de 10 larves par pied de maïs peut voir sa récolte perdue à 80%.



Figure 15 : Dégâts sur racine par les larves de chrysomèle



Figure 16 : Dégâts dus à la chrysomèle dans un champ de maïs

vii) *La pyrale et la sésamie*

En France, selon les régions et les années, les dégâts provoqués par la pyrale et/ou la sésamie peuvent occasionner des pertes de rendements atteignant jusqu'à 30%. En effet, pyrale et sésamie sont des papillons dont les larves se nourrissent des tiges et des épis de maïs. Leurs larves forent des galeries dans les tiges de maïs et s'attaquent aussi au pédoncule de l'épi, provoquant ainsi sa fragilisation, voire sa cassure et sa chute. Même sans dégâts apparents, les galeries creusées dans la tige perturbent la circulation de la sève et le remplissage des grains, abaissant ainsi le volume mais aussi la qualité de la récolte. Cette qualité se trouve aussi directement dégradée lorsque les chenilles s'attaquent aux grains.

En résumé, les principaux dégâts directs et indirects, enregistrés suite à une attaque de pyrale ou de sésamie sont :

- La perturbation de la circulation de la sève, ce qui provoque un affaiblissement de la plante toute entière,
- Des risques accrus de maladies des tiges (fusariose par exemple),
- La rupture très fréquente de tiges et la chute d'épis avant leur maturité (*Figure 17*),
- Des pertes nettes de rendement (pertes d'épis, grains plus petits, attaque des grains par les insectes (*Figure 18*)).
- L'impossibilité de récolter le champ si la verse est trop importante

Les attaques sur les grains causent peu de pertes quantitatives. En revanche, elles augmentent considérablement le risque que les grains abîmés soient attaqués par des microorganismes pathogènes (*Figure 19*), dont certains sont connus pour produire des toxines dangereuses pour l'homme et les animaux (mycotoxines).



Figure 17 : Dégâts sur maïs suite à une attaque de pyrale : tige cassée au niveau de l'épi (Courtin R / OPIE)



Figure 18 : Dégâts dus à la pyrale dans un champ de maïs (GNIS)



Figure 19 : Dégâts de larves de pyrales sur épis

(Courtin R. / OPIE). Attaque sur épis de Maïs.

La chenille attaque de préférence l'axe de l'épi, ce qui entraîne la pourriture et le dessèchement des grains.

3) Les moyens de lutte conventionnels contre ces trois ravageurs

a) La chrysomèle

Dès la confirmation de la présence en France de ce ravageur du maïs, un arrêté a été publié en août 2002. Un plan d'action doit être entrepris dès sa détection par la pose de pièges à phéromone afin d'en tenter l'éradication.

Autour du foyer de détection, trois périmètres de luttés concentriques sont définis :

- ⇒ Zone focale (rayon de 5 Kms) : durant deux ans au moins, des traitements insecticides sont pratiqués et l'implantation de maïs est limitée à une année sur trois sur une parcelle donnée. L'année 1, les insecticides visent les insectes adultes pour limiter les pontes. L'année 2, la lutte vise larves et adultes. Terre, maïs frais et matériel agricole contaminé ne peuvent sortir de la zone.
- ⇒ Zone de sécurité (rayon 10 Kms) : traitements identiques à la zone focale mais rotation limitée à une année sur deux.
- ⇒ Zone tampon (rayon 40 Kms) : rotation conseillée une année sur deux.

Le rayon de ces zones d'intervention a été déterminé en fonction de la distance que peut parcourir l'insecte adulte (jusqu'à 40 Kms par an). Dans les trois zones, le piégeage par phéromone est accru et les producteurs sont informés.

Dans les différents pays touchés par ce ravageur, les deux principales stratégies de lutte sont la rotation des cultures et l'application d'insecticides.

1° la rotation des cultures :

Le cycle biologique de la chrysomèle s'étale sur près d'un an (une seule génération par an). La larve de chrysomèle se nourrit quasi exclusivement de racines de maïs. Le fait d'implanter, par exemple, du soja ou une céréale après une culture de maïs permet de faire chuter la population de chrysomèle de 98% l'année suivante. Cependant, les informations en provenance des pays fortement infestés ne sont pas rassurantes : l'insecte adapte son comportement à son environnement et donc aux cultures utilisées pour la rotation (ex : soja aux Etats-Unis).

2° l'application d'insecticide :

Aux Etats-Unis, la chrysomèle est la première cause d'utilisation d'insecticides sur maïs. L'essentiel des traitements vise à limiter les attaques de larves au niveau du sol. L'épandage de produits lors du semis donne cependant des résultats partiels, variant selon la nature du sol, le pH, l'humidité. Une alternative consiste à enrober les semences de maïs avec des insecticides qui créent un halo répulsif autour des jeunes racines. Cette protection au sol s'avère souvent insuffisante. Les pulvérisations aériennes contre les chrysomèles adultes tendent par ailleurs à se développer, afin de limiter les pontes.

Cependant, la lutte chimique ne fait que limiter les dégâts sur les racines du maïs car une proportion considérable de coléoptères survit du fait qu'il est impossible de traiter complètement un champ.

De plus, ces traitements ont un coût élevé. Chaque année aux Etats-Unis en vue de lutter contre la chrysomèle des racines du maïs, une surface de 6 millions d'hectares est traitée avec des insecticides ce qui représente un coût de 195 millions d'euros.

Associé à une rotation des cultures, le traitement insecticide permettrait de cantonner les dégâts de l'insecte à des niveaux économiquement tolérables.

3° la lutte biologique

Un parasite naturel de la chrysomèle est actuellement testé aux Etats-Unis. A moyen terme, des moyens de lutte biologiques sont aussi envisagés : introduction d'un parasite des larves d'origine mexicaine, sous l'impulsion d'une équipe suisse ; désorientation des femelles par le biais d'hormones afin de perturber les accouplements, en Hongrie. L'évaluation de ces approches devrait prendre plusieurs années.

b) La pyrale et la sésamie

Actuellement, deux périodes d'intervention peuvent être associées pour faire face à ces parasites : les interventions préventives et les interventions curatives.

1° Traitement préventif :

Les chenilles sont très résistantes au froid et sont ainsi aptes à passer l'hiver dans les débris de récolte de maïs. Ainsi, un broyage mécanique des résidus de récolte (tiges notamment) provoque un déchiquetage et donc la réduction du nombre de larves de pyrales ou de sésamies hivernantes. Ces pratiques sont un frein au développement des parasites l'année suivante mais s'avèrent nettement insuffisantes dans les zones fortement infestées.

2° La lutte chimique

La lutte chimique contre la pyrale et la sésamie, reste le procédé le plus fréquemment utilisé. Les insecticides employés, organophosphorés, benzoyl-urées et essentiellement pyréthriinoïdes, présentent une efficacité certaine. Ainsi, les pertes dans la culture du maïs, exprimées en pourcentage du rendement, peuvent atteindre 30% en l'absence de traitement insecticide. L'application du traitement réduit ces pertes de l'ordre de 5 à 10% maximum, en fonction du niveau d'infestation des populations larvaires et des conditions climatiques de pré-récolte.

Ces traitements restent imparfaits et relativement difficiles à gérer. En effet, le choix de la période de traitement est un facteur clé : une fois installées dans la tige, les larves d'insectes ne peuvent plus être atteintes. Or, les périodes de ponte sont étalées dans le temps et les traitements réalisés au-delà des deux premiers stades larvaires sont presque sans effet.

3° La lutte biologique

La lutte biologique peut s'exercer par le lâcher d'insectes parasites spécifiques de la pyrale ou par le traitement de la culture de maïs avec un insecticide à base de bactérie *Bacillus thuringiensis*.

- *La lutte par des insectes contre la pyrale* consiste en lâchers annuels de Trichogrammes dans les parcelles de maïs, à raison de 200 000 à 360 000 parasites par hectare. Les Trichogrammes, insectes quasi microscopiques parasitent les œufs de pyrales présents sur les feuilles de maïs (*Figure 20*) : là encore, le choix du moment de l'intervention est primordial pour garantir une efficacité optimale, intervention qui doit être réalisée quasi simultanément avec la période de ponte du lépidoptère. Un suivi des vols de pyrale est donc nécessaire ; il peut s'opérer au moyen de pièges contenant des phéromones notamment. Les Services de la Protection des Végétaux établissent aussi régulièrement des bulletins d'alerte et des avis d'intervention dans ce but.



Figure 20 : Oeufs de pyrale parasités par des Trichogrammes (GNIS)

Précisons que l'efficacité de ce traitement est très dépendante des conditions climatiques et que la charge en main d'œuvre est souvent un frein à son utilisation par les agriculteurs.

- *La lutte par des bactéries.*

Il existe à l'état naturel dans le sol une bactérie (*Bacillus thuringiensis* : *Bt*) sécrétant une protéine nuisible par ingestion pour les larves de pyrale et de sésamie. Cette bactérie, très répandue dans l'environnement, est utilisée comme insecte biologique depuis 60 ans, notamment par des jardiniers et des exploitants forestiers. Son activité insecticide est due à la synthèse d'une protoxine qui se présente sous forme de cristaux protéiques. Une fois ingérée, cette protoxine est transformée par les sucs digestifs des larves de pyrale et de sésamie, en une toxine qui bloque le fonctionnement de leur appareil digestif. Ce moyen de lutte n'a pas connu de développement en France sur le maïs du fait d'une efficacité insuffisante contre ces ravageurs.

4) Le maïs génétiquement modifié protégé contre des insectes ravageurs: maïs *Bt*

Aujourd'hui, les biotechnologies permettent d'utiliser des protéines *Bt* de façon efficace pour lutter contre ces trois ravageurs. Ainsi MON 88017 x MON 810 possède deux gènes *Bt*, introduits dans les cellules de maïs par transgénèse, qui lui permettent de produire deux protéines de façon continue et donc de s'auto protéger contre les attaques de ces insectes.

La première protéine, Cry3Bb1, exprimée par l'insert de MON 88017 est active uniquement contre la chrysomèle (coléoptère). La seconde protéine, Cry1Ab, exprimée par l'insert de MON 810 n'est active que sur les pyrales et les sésamies. La toxicité de ces deux protéines pour l'homme et pour les animaux non cibles est négligeable.

Cette technologie permettant la protection contre ces ravageurs présente de nombreux avantages.

Pour l'environnement :

- une diminution globale de l'utilisation des insecticides classiques,
- un moyen de lutte plus spécifique que les insecticides conventionnels qui permet de mieux respecter les espèces non cibles,
- une réduction de la consommation en énergie et en intrants nécessaires à la fabrication, à l'emballage, à la pulvérisation et au stockage des insecticides.

Pour l'agriculteur :

- l'utilisation des cultures *Bt* évite aux agriculteurs de manipuler des insecticides chimiques. Ces derniers sont toutefois sans danger s'ils sont employés correctement.
- le maïs *Bt* constitue une méthode de lutte efficace et simple pour l'agriculteur ;
 - o avantage 'pratique' : moins de temps consacré à détecter les attaques aux champs et à appliquer les insecticides ;
 - o amélioration de la qualité des grains : le taux de mycotoxines, en particulier sur fumonisines, du maïs *Bt* est inférieur à celui des variétés conventionnelles en cas d'attaque par les pyrales ou sésamies.

5) *Le maïs tolérant au glyphosate*

Outre la protection contre ces insectes ravageurs, MON 88017 x MON 810 est une culture tolérante au glyphosate.

Le glyphosate est un herbicide non sélectif, c'est-à-dire qu'il est efficace contre la plupart des plantes. La modification génétique du maïs permet ainsi à l'agriculteur de remplacer son traitement herbicide habituel sur cette espèce, qui comprend généralement une association de plusieurs herbicides différents, par un traitement à base de glyphosate. Cette substitution peut s'accompagner, au cas par cas, d'une diminution de la quantité de matière active herbicide appliquée à l'hectare. En plus de cette réduction, le glyphosate est plébiscité par les agriculteurs et la communauté scientifique depuis plus de 25 ans pour son efficacité et son excellent profil toxicologique et écotoxicologique.

Le maïs tolérant au glyphosate offre une solution supplémentaire de désherbage, alors que l'interdiction de l'atrazine fait ressortir beaucoup de difficultés de désherbage pour cette culture.

a) La matière active herbicide : le glyphosate

Cette molécule dont la structure est voisine de celle des acides aminés, constituants des protéines, a une formule chimique très simple sans cycle ce qui facilite sa dégradation par les micro-organismes.

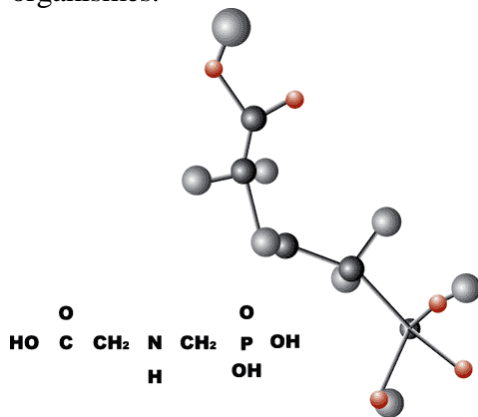


Figure 21 : Formule développée de la molécule de glyphosate

b) Le mode d'action du glyphosate

Le glyphosate pénètre par les feuilles et toutes les parties aériennes vertes de la plante. Après avoir franchi la barrière de la cuticule, il est transporté par la sève jusque dans les organes souterrains. Il se fixe et agit de manière spécifique aux niveaux des zones de croissance de la plante et la dévitalise de la feuille aux racines.

c) Le comportement du glyphosate dans l'environnement

Lorsqu'il atteint le sol, le glyphosate est absorbé sur le complexe argilo-humique et perd son activité désherbante.

En cas de forte précipitation immédiatement après son application, il peut ruisseler vers des eaux superficielles (rivières, lacs...) par entraînement des particules du sol.

Qu'il reste dans le sol ou qu'il soit transféré dans les eaux, le glyphosate se transforme petit à petit pour former des éléments simples qui pourront à leur tour être utilisés par les micro-organismes pour satisfaire leurs besoins en nutriments. Le glyphosate ne s'accumule pas dans l'environnement. Selon les conditions de température, d'humidité et le type de milieu, le glyphosate peut mettre de quelques jours à quelques semaines à se dégrader complètement.

d) Intérêt de la tolérance au glyphosate dans la culture du maïs

viii) Vis-à-vis de l'environnement :

Le glyphosate est un herbicide largement utilisé pour son efficacité contre les mauvaises herbes qui concurrencent les cultures.

Les herbicides sont très différents les uns des autres et leur comportement toxicologique et environnemental est appréhendé grâce à un certain nombre de paramètres : toxicités aiguë et chronique, dégradabilité par les micro-organismes du sol, mobilité dans le sol, persistance, solubilité, etc...

Si aucun herbicide n'est idéal au regard de l'ensemble de ces critères, il a été montré par de nombreuses études que le glyphosate présente un excellent compromis² en raison de son profil écotoxicologique, de sa faible mobilité et de sa faible persistance dans le sol.

ix) Vis-à-vis de l'homme et de la faune sauvage, terrestre comme aquatique

Avant toute autorisation de mise sur le marché d'un produit phytosanitaire, de nombreuses études sont réalisées notamment afin d'évaluer la toxicité aiguë comme la toxicité chronique.

La toxicité aiguë est mesurée par la DL50 (Dose Létale pour 50 % des animaux testés). Cette toxicité détermine la quantité de produit nécessaire pour déclencher des effets nocifs en une seule ingestion. Plus la DL 50 est élevée, plus il faut ingérer de produit pour constater un effet nocif et donc moins le produit est toxique. La DL50 du glyphosate est supérieure à 5 000 mg/kg. A titre de comparaison, le glyphosate est moins toxique que le sel de cuisine (figure 8).

² Le 20 novembre 2001, le glyphosate a été ré-homologué au niveau européen, à l'unanimité des états membres impliqués. Ce processus de ré-homologation des anciennes matières actives vise à examiner tous les dossiers à la lumière de la Directive européenne 91/414. Le 21 janvier 2002, la commission européenne a publié ses conclusions sur la ré-homologation du glyphosate et a conclu qu'il n'était ni génotoxique, ni cancérigène. En 1986 et 1994, un panel d'experts de la FAO (Food and Agriculture Organization) et de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ont examiné les données toxicologiques et environnementales du glyphosate et ont conclu qu'il n'était ni mutagène ni cancérigène

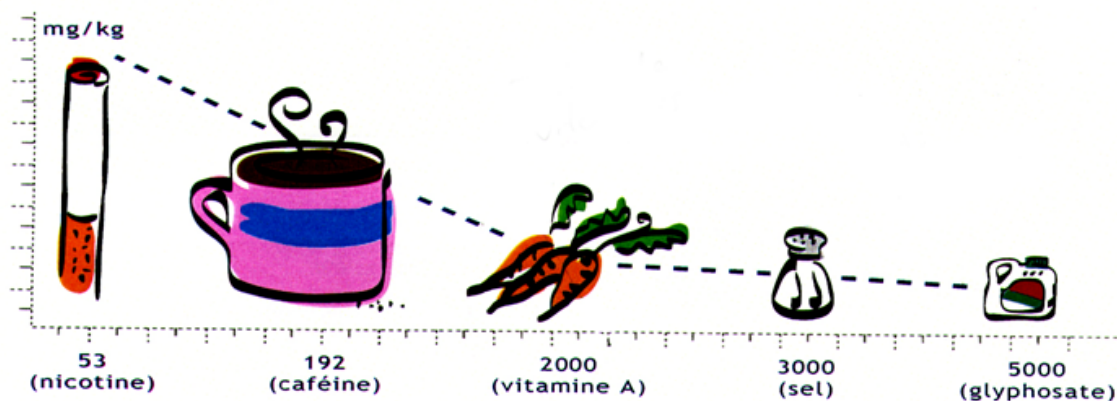


Figure 22 : Comparaison de la toxicité aiguë (Dose Létale pour 50 % des animaux testés) du glyphosate avec de composés courants

- Le mode d'action du glyphosate est spécifique du règne végétal : cette molécule bloque une enzyme utilisée par la plante pour fabriquer certains acides aminés essentiels. Chez les animaux et chez l'homme, cette enzyme n'existe pas (les acides aminés essentiels doivent être apportés par l'alimentation).
- La toxicité chronique est mesurée par la DJA (Dose Journalière Admissible) qui correspond à la dose maximale de substance active qui peut être ingérée tous les jours et pendant toute une vie, sans causer d'effet sur la santé. La DJA du glyphosate est de 0,3 mg/kg/j. Par exemple, un consommateur devrait boire plus de 5000 litres d'eau par jour contenant 0,3 µg/l et pendant toute sa vie pour ressentir un effet néfaste sur la santé lié au glyphosate.

Ainsi, les cultures tolérantes au glyphosate permettent de remplacer des matières actives herbicides par du glyphosate, qui présente un profil écotoxicologique plus favorable, associé à une efficacité reconnue.

Selon les infestations de mauvaises herbes, les stratégies de désherbage adoptées, les cultures tolérantes au glyphosate peuvent permettre de réduire la quantité d'herbicides utilisés. A titre d'exemples :

- les agriculteurs américains qui appliquent du glyphosate sur un maïs tolérant à un herbicide ont réduit leur utilisation moyenne³ d'herbicide de 30% par rapport aux agriculteurs qui cultivent du maïs conventionnel.⁴

³ Ce résultat peut varier d'une région de culture à l'autre et selon le type d'herbicide remplacé.

⁴ Arnold J C; Shaw D R; Medlin C R (1998). ROUNDUP READY® Programs versus conventional programs: efficacy, varietal performance, and economics. In: Proceedings of the Southern Weed Science Society 51:272-273. Gianessi L P; Carpenter J E (2001). Agricultural Biotechnology: Updated Benefit Estimates. January 2001. National Center for Food and Agricultural Policy.
Heimlich R E; Fernandez-Cornejo J; McBride W; Klotz-Ingram S J; Brooks N (2000). Genetically Engineered Crops: Has Adoption Reduced Pesticide Use? USDA Publication AER-786.
<http://www.ers.usda.gov/epubs/pdf/aer786/>.

- les maïsiculteurs américains utilisent en majorité des herbicides qui ont une activité résiduaire (c'est-à-dire qu'ils restent actifs dans le sol). En 2000, la majorité des agriculteurs qui ont choisi le maïs tolérant au glyphosate ont remplacé ces herbicides résiduaire par du glyphosate.

Une étude prospective⁵ analyse l'impact en Europe de l'introduction du maïs, du colza et de la betterave tolérants à des herbicides. La réduction de la quantité d'herbicides utilisée à l'hectare est estimée à 43 % pour le maïs, 65 % pour le colza et 37 % pour la betterave tolérante à des herbicides.

x) *Vis-à-vis de l'agriculteur :*

Le maïs tolérant au glyphosate offrira à l'agriculteur :

- un outil de contrôle des adventices dans les cultures de maïs à large spectre, incluant les mauvaises herbes vivaces difficiles,
- un nouveau mode d'action herbicide pour le désherbage du maïs, herbicide présentant un profil toxicologique et écotoxicologique favorable,
- une flexibilité accrue pour traiter les adventices sur la base du 'si nécessaire',
- une flexibilité accrue vis-à-vis du stade de développement des mauvaises herbes lors du traitement.
- un outil supplémentaire de contrôle des mauvaises herbes alors que l'atrazine (herbicide sélectif du maïs) a été récemment interdit et que déjà, on assiste au développement d'une flore jusque là contrôlée par l'atrazine et pour lequel il n'existe à ce jour que peu d'alternatives techniques

D'une manière générale, plusieurs études ont démontré que les plantes tolérantes à un herbicide simplifient le contrôle des mauvaises herbes dans la culture :

- le désherbage plus simple, demande moins de temps,
- les applications d'herbicides sont plus efficaces,
- la pression des mauvaises herbes est moins forte dans les cultures suivantes,
- il y a moins de matières indésirables, comme des graines de mauvaises herbes dans les récoltes,
- l'agriculteur peut plus facilement adopter les techniques de culture sans labour qui limitent l'érosion des sols et permettent de lutter contre les gaz à effet de serre.

⁵ R.H. Phipps and J.R.Park, Centre for Dairy Research, Department of Agriculture, The University of Reading, UK. Publication soumise à comité de relecture, dans *Journal of Animal and Feed Sciences*. Vol. 11(1), p 1-18 - Date : Janvier 2002

6) Conclusion :

MON 88017 x MON 810, en alliant les deux modifications génétiques des MON 88017 et MON 810 permettra à l'agriculteur de profiter simultanément des bénéfices de ces deux technologies que sont le contrôle de trois ravageurs du maïs (la chrysomèle, la pyrale et la sésamie), et le désherbage de la culture à l'aide du glyphosate, un herbicide foliaire, simple d'utilisation et présentant un profil toxicologique et écotoxicologique favorable.

A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL.

1) *Nom et adresse du notifiant.*

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

2) *Qualifications et expérience des scientifiques responsables.*

L'ensemble des données présentées dans ce dossier ont été produites sous la supervision des 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 d'un an (2007) pour le développement de lignées et d'hybrides de maïs transgéniques MON 88017 x MON 810 protégés contre la chrysomèle (*Diabrotica virgifera*), tolérants au glyphosate, matière active du ROUNDUP® ainsi que protégés contre la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) et à la sésamie (*Sesamia spp.*).

MON 88017 x MON 810 est obtenu par croisement conventionnel de lignées génétiquement modifiées :

- MON 88017 qui est protégé contre la chrysomèle, un ravageur coléoptère du maïs, et qui est tolérant au glyphosate
- MON 810 qui est protégé contre certains insectes nuisibles lépidoptères (pyrale et sésamie)

Aucune modification génétique supplémentaire n'a été impliquée dans l'obtention du MON 88017 x MON 810. Le croisement regroupant les traits MON 88017 et MON 810 peut se faire lors de la production de l'hybride commercial, chacune des lignées parentales portant un des deux évènements. Ce croisement peut se faire aussi antérieurement lors de la sélection d'une des lignées parentales. Dans ce cas une des deux lignées parentales de l'hybride regroupe les deux évènements.

MON 88017 x MON 810, MON 88017 et MON 810 ont été développés par Monsanto Company, St Louis Missouri.

B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES.

1) Nom complet.

- a) Nom de famille : *Graminae*
- b) Genre : *Zea*
- c) Espèce : *mays*
- d) Sous-espèce : *mays*
- e) Cultivar/lignée : - (événement MON 88017 x MON 810)
- f) Nom usuel : maïs

2) Informations concernant la reproduction

a) Informations concernant la reproduction.

i) Mode de reproduction.

Le maïs est une plante monoïque possédant deux inflorescences distinctes :

- 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.

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

La pollinisation du maïs en conditions naturelles se réalise principalement par fécondation croisée (supérieur à 95%). Un faible taux d'autofécondation est néanmoins possible (inférieur à 5%). Le maïs est une espèce typiquement allogame.

iii) Temps de génération.

Le temps de génération du semis à la récolte des grains peut être estimé à environ 7-8 mois. 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.

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. Les semences peuvent présenter un état de dormance mais leur viabilité est fortement limitée. Les semences sont en effet très sensibles aux maladies et au froid. En Europe, il n'y a en général pas de repousses à la suite d'une culture de maïs. En règle générale, seuls les épis non battus peuvent permettre aux grains de conserver éventuellement une capacité de germination l'année suivante.

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

Les graines ne présentent pas de dormance. Les conditions climatiques hivernales de manière générale ne permettent pas la repousse de cette plante. Les pratiques agricoles courantes conduisent également à la destruction des graines.

4) Dissémination.

- a) Forme et étendue de la dissémination.

Le maïs en Europe n'est qu'une espèce de grande culture, sa dissémination n'intervient que dans les espaces agricoles par semis.

- b) Le cas échéant, facteurs spécifiques affectant la dissémination.

La dissémination peut s'effectuer par l'intermédiaire du pollen et des graines :

- le pollen provenant de l'inflorescence mâle est dispersé par gravité et par le vent. Le début de la libération du pollen a lieu généralement deux ou trois jours avant l'apparition des soies des épis. La durée de floraison des fleurs mâles est de 6 à 10 jours.
- la viabilité des semences est fortement limitée car elles sont très sensibles aux maladies et au froid hivernal. C'est pourquoi, il n'y a en général pas de repousses de maïs.

5) Distribution géographique de la plante.

Le maïs est dépendant de l'homme pour sa dispersion géographique. Le maïs est utilisé, soit comme ensilage, soit pour sa production de grains. Il s'agit de la troisième culture céréalière du monde en terme d'importance. La production française de maïs est localisée principalement dans les régions suivantes:

- Aquitaine et Midi-Pyrénées
- Façade atlantique et notamment en Poitou-Charentes
- Est, Sud-est avec notamment les régions Rhône-Alpes et Alsace
- Zone Nord-Loire (Centre, Ile de France, Picardie, Champagne-Ardenne.....)

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 est une plante originaire d'Amérique centrale qui ne se développe pas en dessous de 9 - 10°C et qui a une température optimale de croissance de 30 - 33°C. En climat continental (Canada, Europe de l'Est), le maïs est cultivé jusqu'au 60ème parallèle.

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 sa toxicité pour les hommes, les animaux et d'autres organismes.

Certains ravageurs (atomaires, blaniules, scutigérelles, taupins, tipules, vers gris, cicadelles, noctuelles, sésamies, pyrales, pucerons) et certaines maladies (anthracnose, helminthosporiose, fusariose, charbon, mildiou) peuvent infester la culture.

La chrysomèle du maïs n'est pas encore un ravageur du maïs en France. Cependant, il est très probable que l'aire d'infestation de ce ravageur dans les pays à l'Est de l'Europe va s'étendre en France. Déjà, des individus ont déjà été détectés en France, principalement en Ile de France et en Alsace.

C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE.

Certaines des informations relatives à ce chapitre ont été communiquées en annexe aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire en charge de l'évaluation de cette demande.

1) Description des méthodes utilisées pour la modification génétique.

Les lignées MON 88017 et MON 810 qui ont été modifiées génétiquement, ont été ensuite rétroversées avec des lignées présentant une bonne valeur agronomique puis autofécondées pour les rendre homozygotes. MON 88017 x MON 810 est obtenu par croisement conventionnel de lignées génétiquement.

Aucune modification génétique supplémentaire n'a été impliquée dans l'obtention du MON 88017 x MON 810. Le croisement regroupant les traits MON 88017 et MON 810 peut se faire lors de la production de l'hybride commercial, chacune des lignées parentales portant un des deux évènements. Ce croisement peut se faire aussi antérieurement lors de la sélection d'une des lignées parentales. Dans ce cas un des deux lignées parentales de l'hybride regroupe les deux évènements.

2) Nature et source du vecteur utilisé.

Pour la production du maïs MON 88017 x MON 810 résultant d'un croisement conventionnel de lignées, aucun autre vecteur spécifique n'a été utilisé.

Les méthodes de modification génétique utilisées dans le développement de MON 88017 et de MON 810 sont distinctes :

- MON 88017 a été obtenu par transformation d'embryons immatures par des bactéries de type *Agrobacterium* souche ABI. Le vecteur de cette transformation est le plasmide PV-ZMIR39. La souche ABI contient un plasmide Ti désarmé et désactivé qui est incapable d'induire une prolifération cellulaire végétale car les gènes responsables, qui sont présents originellement dans la souche sauvage, ont été supprimés. Le PV-ZMIR39 contient à la fois les séquences de transfert d'ADN (T-DNA) droite et gauche afin de faciliter la transformation.

La partie du vecteur qui est insérée dans la plante (fragment inséré) contient les gènes d'intérêt suivants :

- Le gène *cry3Bb1* code pour une protéine dérivée de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* conférant une protection contre la chrysomèle du maïs.
 - Le gène *cp4 epsps* code pour l'enzyme CP4 EPSPS, qui confère à la plante la tolérance au glyphosate. L'EPSPS ou 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase a été isolée d'*Agrobacterium* sp. souche CP4.
- MON 810 autorisé à la mise sur le marché en Europe depuis 1998, a été produit par la technique d'accélération des particules appliquées à une solution d'ADN contenant deux plasmides : le plasmide PV-ZMBK07 contenant le gène *cry1Ab*, dérivé de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* et le plasmide PV-ZMGT10 contenant les gènes *cp4 epsps*

et *gox*. Un fragment du plasmide PV-ZMBK07, contenant la séquence ADN d'intérêt, *cryIAb*, a été intégré dans le génome du maïs. Aucune séquence du second plasmide, PV-ZMGT10, n'a été incorporée dans le génome de la plante. Les détails de la caractérisation moléculaire du MON 810 ont été décrits dans le dossier de notification (cf. dossier C/FR/95/12-02) sur base duquel l'autorisation de mise sur le marché a été accordée.

MON 88017 x MON 810 correspond à l'association par croisement conventionnel de deux événements distincts au sein d'une même plante de maïs. La nature et la source du vecteur utilisé pour chacun de ces événements sont donc déjà exposées dans leurs dossiers réglementaires :

- Le dossier 'partie B' de MON 88017 en vue de la demande d'autorisation pour expérimentation en plein champ déposé en France en 2005.
- Le dossier 'partie C' de MON 810, C/FR/95/12-02.

Dans ces dossiers, les caractérisations moléculaires détaillées de ces deux événements ont été transmises en annexe aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire en charge de l'évaluation des demandes.

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

MON 88017 x MON 810 résulte d'un croisement conventionnel entre les lignées de maïs MON 88017 et MON 810.

Le détail des informations relatives à la taille, l'origine et la fonction de chacun des éléments du fragment inséré dans MON 88017 et dans MON 810 a été transmis en annexe aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire en charge de l'évaluation de cette demande.

MON 88017 x MON 810 correspond à l'association par croisement conventionnel de deux événements distincts au sein d'une même plante de maïs. Les informations sur les régions envisagées pour l'insertion pour chacun de ces événements sont donc déjà exposées dans leurs dossiers réglementaires :

- le dossier 'partie B' de MON 88017 en vue de la demande d'autorisation pour expérimentation en plein champ déposé en France en 2006.
- Le dossier 'partie C' de MON 810, C/FR/95/12-02.
Pour ces deux événements, leurs caractérisations moléculaires détaillées ont été transmises en annexe aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire en charge de l'évaluation des demandes.

D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE.

Certaines des informations relatives à ce chapitre ont été communiquées en annexe aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire en charge de l'évaluation de cette demande.

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

Comme déjà évoqué à plusieurs reprises, MON 88017 x MON 810 consiste en la combinaison, par croisement conventionnel, de lignées génétiquement modifiées MON 88017 et MON 810. Ainsi, ce maïs transgénique a hérité d'une part, de MON 88017, le trait de protection à la chrysomèle et le trait de tolérance au glyphosate. D'autre part, il a également hérité de MON 810, le trait de protection contre certains insectes nuisibles lépidoptères.

Ainsi, de façon identique aux deux lignées de maïs portant respectivement les événements MON 88017 et MON 810, MON 88017 x MON 810 exprime trois protéines : Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab.

La protéine Cry3Bb1 confère à la plante une protection contre la chrysomèle. L'activité insecticide de la protéine Cry3Bb1 est spécifique aux attaques des ravageurs coléoptères du genre chrysomélidés. Par conséquent, l'utilisation du MON 88017 x MON 810 permettra à l'agriculteur de contrôler efficacement la chrysomèle du maïs, autorisant ainsi :

- une expression complète du potentiel de rendement,
- une protection plus fiable et plus simple à mettre en œuvre que l'usage d'insecticides,
- une protection du maïs compétitive vis-à-vis de l'utilisation des insecticides classiquement utilisés,
- enfin, il s'agit d'une méthode plus sûre pour l'agriculteur (évite l'exposition à un insecticide) et pour l'environnement (évite l'usage d'insecticides à spectre large actifs sur des organismes non cibles).

La protéine CP4 EPSPS confère la tolérance au glyphosate (N-phosphonométhyl-glycine). L'EPSPS est une enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques chez les plantes et les microorganismes, par la voie de l'acide shikimique. Il a été montré que les CP4 EPSPS présentent une affinité significativement réduite pour le glyphosate en comparaison à d'autres enzymes EPSPS. Cela lui permet de conserver son activité enzymatique en présence de l'herbicide. En conséquence, lorsque des plantes de maïs exprimant les protéines CP4 EPSPS sont traitées avec du glyphosate, ces plantes ne se trouvent pas affectées : l'action continue des enzymes tolérantes CP4 EPSPS assure à la plante ses besoins nécessaires pour la production des acides aminés aromatiques. Grâce à la tolérance au glyphosate, l'agriculteur pourra bénéficier d'avantages, parmi lesquels :

- un nouvel outil à très large spectre, de contrôle des adventices,
- un nouveau mode d'action herbicide pour le contrôle des adventices dans la culture du maïs,
- l'utilisation d'un herbicide au profil environnemental favorable,

- une flexibilité accrue pour traiter les adventices sur la base du principe du « tir à vue »,
- le contrôle des adventices à un coût compétitif,
- une technologie utilisable aussi bien par les agriculteurs de petites comme de grandes exploitations.

La protéine Cry1Ab confère aux plants de maïs la protection contre certains insectes nuisibles lépidoptères, incluant la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) et la sésamie (*Sesamia* spp.). L'activité insecticide de la protéine Cry1Ab est spécifique aux attaques des larves de lépidoptères cibles. Par conséquent, l'utilisation du MON 88017 x MON 810 permettra également à l'agriculteur de contrôler efficacement ces deux ravageurs du maïs.

2) Informations 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 introduites dans la plante supérieure génétiquement modifiée ou de tout ADN vecteur ou étranger restant dans la plante supérieure génétiquement modifiée.

MON 88017 x MON 810, obtenu par croisement conventionnel de MON 88017 et MON 810, a hérité des mêmes fragments présents dans ces deux lignées.

Si l'on considère l'ensemble des éléments listés ci-dessous, un changement significatif dans les caractéristiques moléculaires des insertions d'ADN héritées par MON 88017 x MON 810 est considéré comme fortement improbable car :

- Il n'y a pas de mécanisme connu par lequel deux inserts localisés sur des sites différents de différents chromosomes peuvent stimuler une recombinaison l'un de l'autre (s'ils n'expriment pas de protéine impliquée dans le schéma de recombinaison).
- Chez les eucaryotes supérieurs, comme le maïs, une recombinaison potentielle peut avoir lieu principalement durant la méiose (formation des gamètes). Cependant, si l'un ou l'autre des inserts dans MON 88017 x MON 810 était intrinsèquement instable pendant la méiose, cela aurait été détecté lors des études de stabilité génétique réalisées pour les traits génétiquement modifiés uniques de MON 88017 et MON 810 : or, aucun phénomène de cet ordre n'a été mis en évidence (Cf. évaluation de la stabilité des événements MON 88017 et MON 810 sur plusieurs générations).
- La recombinaison mitotique dans les plantes a lieu à une fréquence de $10^{-4}/10^{-5}$ dans le cas où des homologies significatives existent entre les cibles (c'est à dire > 500 nucléotides) *et* où les séquences pressenties pour cette recombinaison sont physiquement liées. En ce qui concerne le maïs MON88017 x MON810, où il y a absence de telles homologies significatives, et où les séquences ne sont pas liées, les risques pour qu'une recombinaison ait lieu sont d'une probabilité d'autant plus faible (Puchta, 1999). En conséquence, la fréquence de recombinaison mitotique entre les fragments d'ADN hérités de MON88017 et de MON810 est négligeable dans le maïs MON88017 x MON810. Enfin, dans l'hypothèse peu probable d'une telle recombinaison, pour qu'elle ait un effet significatif, elle doit s'effectuer à un stade très précoce de développement de la plante. En effet, plus elle aura lieu tardivement, plus le nombre de cellules affectées sera faible.

- Enfin, de telles recombinaisons fortement improbables, affectant les deux inserts qui sont localisés sur des sites différents de chromosomes différents, entraîneraient probablement une translocation chromosomique avec des conséquences létales, ou au moins certaines défaillances pour la plante entière (méiose) ou pour les descendants des cellules affectées (mitose).

Les caractéristiques moléculaires de MON 88017 et MON 810, en particulier les connaissances relatives à leur stabilité génétique et leur descendance, sont bien connues et bien documentées. Ces données constituent la meilleure source pour comprendre les aspects moléculaires des insertions d'ADN dans MON 88017 x MON 810 :

- le dossier 'partie B' de MON 88017 en vue de la demande d'autorisation pour expérimentation en plein champ déposé en France en même temps que ce dossier en 2005.
- Le dossier 'partie C' de MON 810, C/FR/95/12-02.

La répétition des analyses de laboratoires sur MON 88017 x MON 810 n'a donc pas été jugée nécessaire. Néanmoins, **des analyses par Southern blot** ont quand même été conduites sur MON 88017 x MON 810, MON 88017 et MON 810 **afin de confirmer l'identité de MON 88017 x MON 810**. Elles ont permis d'y confirmer la présence des séquences d'ADN issues de chacun des évènements. **Cette étude est présentée dans l'annexe de ce dossier.**

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 88017 x MON 810.

c) Nombre de copies de l'insert.

MON 88017 et MON 810 contiennent chacun un site d'insertion unique, contenant une seule copie, et qui ségrége de façon Mendélienne.

Etant donné que les lignées de maïs utilisées pour effectuer le croisement conventionnel sont homozygotes pour chacun des événements de transformation MON 88017 et MON 810, ces deux fragments sont hérités MON 88017 x MON 810, à savoir un premier fragment conférant la protection contre la chrysomèle et la tolérance au glyphosate et un second conférant une protection contre certains insectes lépidoptères. La présence de ces inserts dans MON 88017 x MON 810 a été confirmée au travers d'analyses par Southern blot (cf. paragraphe D.2. a)

Par conséquent, MON 88017 x MON 810 contient les deux inserts parentaux, de la même façon qu'ils sont présents individuellement dans MON 88017 et MON 810.

MON 88017 x MON 810 correspond à l'association par croisement conventionnel de deux événements distincts au sein d'une même plante de maïs. Les informations sur le nombre de copie de l'insert pour chacun de ces événements sont donc déjà exposées dans leurs dossiers réglementaires :

- le dossier 'partie B' de MON 88017 en vue de la demande d'autorisation pour expérimentation en plein champ déposé en France en même temps que ce dossier en France en 2006.
- Le dossier 'partie C' de MON 810, C/FR/95/12-02.

Pour ces deux événements, leurs caractérisations moléculaires détaillées ont été transmises en annexe aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire en charge de l'évaluation des demandes.

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

Les analyses des résultats de ségrégation effectuées sur MON 88017 et MON 810 confirment un site unique d'intégration des inserts respectifs dans le génome nucléaire des deux lignées. Des analyses par Southern blot ont par ailleurs démontré la stabilité des séquences insérées dans MON 88017 et MON 810 et dans leur descendance.

MON 88017 x MON 810 correspond à l'association par croisement conventionnel de deux événements distincts au sein d'une même plante de maïs. Les informations sur la localisation des inserts dans les cellules de plante pour chacun de ces événements sont donc déjà exposées dans leurs dossiers réglementaires :

- le dossier 'partie B' de MON 88017 en vue de la demande d'autorisation pour expérimentation en plein champ déposé en France en même temps que ce dossier en France en 2006.
- Le dossier 'partie C' de MON 810, C/FR/95/12-02.

Pour ces deux évènements, leurs caractérisations moléculaires détaillées ont été transmises en annexe aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire en charge de l'évaluation des demandes.

3) Informations concernant l'expression de l'insert.

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

Une étude a été conduite pour mesurer **les niveaux d'expression des protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab** présents dans les tissus de MON 88017 x MON810 cultivé dans trois essais au champ conduits en 2002 aux Etats-Unis.

Ces analyses menées par méthodes enzymatiques ELISA, ont été menées simultanément sur les maïs suivants:

- MON 88017 x MON 810,
- MON 88017,
- MON 810,
- Une variété de maïs non génétiquement modifié dont le matériel génétique est représentatif des variétés transgéniques analysées.

Les résultats confirment que :

- les quantités des protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS détectées dans les échantillons de fourrage comme dans les grains sont comparables pour le maïs MON 88017 et le maïs MON 88017 x MON 810.
- les quantités des protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS mesurées dans le maïs non génétiquement modifié se situent en dessous des limites de quantification.
- les quantités de protéine Cry1Ab détectées dans les échantillons de fourrage comme dans les grains sont comparables pour le maïs MON 810 et le maïs MON 88017 x MON 810.
- les quantités de protéine Cry1Ab observées dans le maïs non génétiquement modifié se situent en dessous des limites de quantification.

Cette étude est présentée dans l'annexe de ce dossier.

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

Les protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab s'expriment logiquement dans la plante entière puisque le promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur *e35S*, (gènes *cry3Bb1*, et *cry1Ab*) et le promoteur de l'actine du riz (gène *cp4 epsps*) ont été montrés comme conduisant à une expression constitutive de la protéine encodée dans la plante de maïs génétiquement modifié (Zhong *et al.*, 1996; Kay *et al.*, 1985; Odell *et al.*, 1985).

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

a) Mode(s) et / ou vitesse de reproduction.

b) Dissémination.

c) Capacité de survie.

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 hors de sa mise en culture, n'a pas d'impact significatif sur l'environnement.

Des variétés de maïs MON 88017, MON 810 et de maïs conventionnel ont par ailleurs fait l'objet d'une évaluation comparative au champ pour ce qui concerne leurs caractéristiques phénotypiques. Les essais conduits avec les maïs MON 88017 et MON 810 n'ont mis en évidence aucun effet inattendu, biologiquement significatif.

Les conclusions favorables de ces essais ont été par la suite confortées par les observations faites sur les productions commerciales où aucun effet non anticipé ou adverse n'a été identifié. MON 810 est cultivé sur plusieurs millions d'hectares dans le Monde depuis 1997. MON 863, exprimant Cry3Bb1, est commercialisé aux Etats-Unis depuis 2003. NK603, exprimant CP4 EPSPS est commercialisé aux Etats-Unis depuis 2001 (Cf. Tableau 1).

En conclusion, d'un point de vue agronomique et environnemental, MON 88017 et MON 810 sont équivalents au maïs conventionnel, excepté pour les traits introduits. MON 88017 x MON 810 étant obtenu par croisement conventionnel, il n'y a pas lieu de penser qu'il ne soit pas équivalent au maïs conventionnel. Par conséquent, aucune différence dans le mode ou le taux de reproduction, la dissémination des grains de maïs, la capacité de survie ou autres différences agronomiques ou phénotypiques n'est attendue.

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

Les analyses sur plusieurs générations de MON 88017 et MON 810 ont montré la stabilité des événements introduits dans ces maïs, à la fois dans les lignées et les hybrides. Les données de ségrégation pour les maïs MON 88017 et MON 810 confirment un site unique d'insertion dans l'ADN génomique, puisque le fragment qui contient le gène *cry3Bb1* présent dans la descendance du maïs MON 88017 et le gène *cry1Ab* dans la descendance MON 810 ségrégent dans des proportions Mendéliennes (cf. le détail des informations relatives à la descendance dans le génome du maïs MON 88017 qui ont été transmises en annexe aux experts de la Commission du Génie Biomoléculaire en charge de l'évaluation de cette demande). Pour le maïs MON 810 ces informations sont incluses dans le dossier C/FR/95/12-02).

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

Les observations ont démontré que la morphologie reproductive et les composantes de rendement de MON 88017 et MON 810 sont inchangées par la modification génétique. MON 88017 x MON 810 étant obtenu par croisement conventionnel, la production de pollen et sa viabilité sont comparables. Par conséquent, la fréquence de croisement avec d'autres variétés de maïs ou des espèces sauvages (qui ne sont pas présentes en Europe) n'a pas lieu d'être différente pour MON 88017 x MON 810 comparativement à celle de MON 88017 et MON 810, ou aux autres variétés de maïs conventionnel (cf. H - Evaluation du Risque Environnemental-Annexe 2).

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

MON 88017 x MON 810 est issu du croisement conventionnel des deux lignées de maïs génétiquement modifiées, MON 88017 et MON 810. Chacun des traits introduits dans ces lignées a été hérité par MON 88017 x MON 810 pour aboutir ainsi à l'expression conjointe des protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab. Ces protéines introduites sont présentes à de faibles niveaux dans la plante ; leurs innocuités respective vis-à-vis de l'alimentation humaine et animale ont été démontrées, elles se basent notamment sur :

- a) une caractérisation approfondie de chaque protéine,
- b) la comparaison de ces protéines à des toxines ou allergènes protéiques connus,
- c) la vitesse de 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.

Ces informations sont présentées dans des dossiers de demande de mise sur le marché des maïs MON 810 (C/FR/95/12-02) et MON 88017 (USDA # 04-CR-108U). Dans les deux cas, aucun effet nocif sur la santé humaine ou animale n'a été mis en évidence.

En Europe, des protéines produites par des événements en voie d'homologation et exprimant les traits de MON 88017 ont déjà été évaluées en détail : MON 863 et NK603 (cf. tableau 1). Le trait Bt contre la chrysomèle du MON 88017 permet l'expression d'une protéine Cry3Bb1 quasi identique à la protéine exprimée dans le MON 863 (un acide

aminé de différent sur les 653 de la protéine, homologie de 99,8 %). La protéine CP4 EPSPS de NK603 est identique à la protéine CP4 EPSPS du MON 88017. Dans les deux cas, aucun effet nocif sur la santé humaine ou animale n'a été mis en évidence.

Dans la descendance de deux plantes génétiquement modifiées, il peut être utile, dans certains cas, d'évaluer la possibilité que des interactions puissent avoir lieu entre les nouvelles protéines exprimées. Cependant, pour les raisons évoquées ci-dessous, de telles interactions sont très improbables dans le cas des protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab :

En effet,

- a) la protéine CP4 EPSPS a un mode d'action très différent de celui des protéines *Bt*, Cry3Bb1 et Cry1Ab.
- b) les Protéines Cry3Bb1 et Cry1Ab ont des modes d'actions identiques mais des spécificités différentes. Elles n'agissent pas sur les mêmes familles d'insectes.
- c) ces trois protéines ont été montrées comme étant inoffensives au terme de l'évaluation de sécurité conduite individuellement pour chacune d'elles,
- d) et sont présentes en très faibles quantités dans le maïs.

Par conséquent, les conclusions auxquelles ont abouti les évaluations individuelles de sécurité de chacune des protéines n'ont pas lieu d'être remises en cause.

De plus, la composition du maïs MON 88017 x MON 810 a été comparée à celle de MON 88017, MON 810 et à du maïs conventionnel d'origine génétique similaire. Ces variétés de maïs ont été cultivées dans les mêmes essais aux Etats-Unis. Les analyses ont porté sur 77 paramètres différents : humidité, teneur en protéine, acides aminés, glucides, matières grasses, fibres, vitamines, divers métabolites secondaires, minéraux et cendres. Aucun écart biologiquement significatif n'a été observé sur ces paramètres. Du point de vue de la composition, le maïs MON 88017 x MON 810, MON 88017 et MON 810 sont considérés comme étant équivalent au maïs conventionnel.

Enfin, des protéines de type Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab ont un historique de plusieurs années d'utilisation sans impact négatif recensé ; utilisation au travers de la consommation de MON863 (exprimant Cry3Bb1), de MON 810 et des cultures tolérantes au glyphosate (telles que NK603), individuellement et en mélange de grains (Cf. Tableau 1). Tous ces produits et dérivés ont été manipulés et utilisés dans la chaîne alimentaire sans qu'aucun effet néfaste chez les animaux ou chez l'homme ne soit documenté.

En conclusion, les évaluations complètes de la sécurité individuelle des Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab—établissent qu'il est fortement improbable que ces protéines puissent engendrer des effets nocifs sur la santé humaine ou animale.

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 plante supérieure génétiquement modifiée est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux.

La sécurité de MON 88017 x MON 810 et des protéines exprimées Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab envers la santé des animaux a été discutée dans le paragraphe précédent (D.7), simultanément à l'évaluation de la santé humaine.

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

Le spectre des organismes cibles de MON 88017 x MON 810 est la somme de celui de MON 88017 et MON 810. L'activité insecticide des protéines Cry3Bb1 et Cry1Ab, exprimées dans MON 88017 x MON 810, est spécifique de certains insectes nuisibles respectivement chrysomélidés (coléoptère) pour Cry3Bb1 et lépidoptères pour Cry1Ab.

Comme toutes les protéines Cry issue de souches de *Bacillus thuringiensis*, les protéines Cry3Bb1 et Cry1Ab doivent être ingérées par l'insecte pour avoir un effet insecticide (Huber and Lüthy, 1981). Sous sa forme cristalline, cette protéine est insoluble en solution aqueuse à pH neutre ou acide (Bulla, *et al.*, 1977). A l'inverse, le pH alcalin de l'intestin de l'insecte larvaire favorise sa dissolution ; elle est ensuite activée par des protéases dans l'intestin de l'insecte. Une fois active, diffuse au travers de la membrane péritrophique de l'insecte vers l'épithélium de l'intestin moyen (Wolfersberger *et al.*, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a). Chez les insectes cibles, la protéine activée reconnaît et se lie aux protéines spécifiques de la surface des cellules intestinales. L'intestin se trouve alors paralysé, causant l'arrêt de l'alimentation de l'insecte larvaire et sa mort. A noter qu'il n'y a pas de site de fixation pour la protéine activée des espèces de *Bacillus thuringiensis* à la surface des cellules intestinales des mammifères ; par conséquent, l'homme n'est pas sensible à ces protéines (Hofmann *et al.*, 1988b; Noteborn and Kuiper, 1995; 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.

Le maïs cultivé interagit avec de nombreux organismes dans l'environnement, dont les micro-organismes, la faune et la flore et de nombreux invertébrés résidant dans le sol ou sur les feuilles. De plus, le maïs est une culture sensible à de nombreuses maladies fongiques, à des nématodes, insectes et acariens nuisibles, que l'agriculteur contrôle traditionnellement par des applications de produits de protection des plantes ou par d'autres pratiques agricoles telles que la rotation des cultures. Parce que le maïs est une bonne source alimentaire, ses interactions avec les vertébrés sont bien connues, dont les oiseaux et les mammifères qui résident ou transitent à proximité des champs ou dans l'habitat agricole et les tours de champ, les haies ou fossés.

MON 88017 et MON 810 ont été montrés comme étant équivalents au maïs conventionnel (excepté pour les traits introduits). Il n'y donc pas de raison de penser que cela soit différent lorsqu'on regroupe ces deux événements par croisement conventionnel. Cette équivalence a d'ailleurs été vérifiée par l'analyse de la composition de MON 88017 x MON 810 (Cf. D.5). En conséquence, il n'y a pas lieu de penser que le maïs portant ces deux événements présente des interactions avec des organismes non cibles dans l'environnement qui soient différentes de celles du maïs traditionnellement cultivé.

Certes, les insectes herbivores du maïs peuvent être exposés aux protéines introduites. Cependant, MON 88017 et MON 810, ont été préalablement évalués pour leurs interactions potentiellement significatives avec ces organismes non cibles : les estimations de sécurité pour les protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab n'ont indiqué aucun risque environnemental. Sur la base de nos connaissances en terme de pratiques de sélection du maïs, des procédures de tests et de sélection des nouveaux hybrides il n'y a pas lieu de penser qu'une interaction de ce maïs ou des protéines nouvellement exprimées avec les organismes non cibles sera modifiée de manière significative, en comparaison avec les lignées MON 88017 et MON 810. De plus, il n'y a pas de mécanisme connu qui permette de croire qu'un des traits insérés (c'est-à-dire la protection contre certains ravageurs et la tolérance au glyphosate) puisse altérer l'interaction de l'autre avec les organismes non cibles, quand ils sont présents simultanément dans MON 88017 x MON 810.

L'absence d'effet adverse de MON 88017 x MON 810 ou de ses protéines introduites sur la santé des animaux non cibles vertébrés a été établie dans les sections D.7.

Enfin, depuis la première commercialisation de MON 810 en 1997, de MON 863 depuis 2003 et NK603 depuis 1998 en Amérique du Nord, aucun effet particulier sur les organismes non cibles n'a été mis en évidence. Il n'y a donc pas lieu de penser qu'avec l'expression de ces mêmes protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab, MON 88017 x MON 810 ait un effet sur les organismes non cibles.

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.

Or, toutes les pratiques agronomiques couramment utilisées pour cultiver le maïs conventionnel dans l'Union Européenne sont applicables dans le cas de la culture de MON 88017 x MON 810 : aucune technique spécifique de culture, de gestion ou de récolte n'est requise.

MON 88017 et MON 810 ont été montrés comme étant équivalents au maïs conventionnel (excepté pour les traits introduits) en terme de composition, comme pour ce qui concerne les caractéristiques morphologiques, de développement, de rendement, de reproduction, de dissémination, de sensibilité aux maladies, d'état sanitaire de la plante et de survie. Il n'y a donc pas lieu de penser que MON 88017 x MON 810 soit différent du maïs conventionnel au regard de ses interactions avec l'environnement abiotique.

Pour les protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab dont les gènes ont été introduits dans MON 88017XMON 810, aucune interaction négative n'est connue avec l'environnement abiotique.

Les familles de ces protéines *Bt* et EPSPS n'ont pas d'interaction négative connue avec l'environnement abiotique, et il n'y a donc pas lieu de penser que ces protéines exprimées par les maïs transgéniques se comportent différemment.

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

La détection et l'identification des séquences de nucléotides héritées des gènes *cry3Bb1*, *cp4 epsps* et *cry1Ab* ont été réalisées par Southern blot. La quantification des protéines exprimées Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab, a été réalisée par la méthode ELISA.

Alternativement, des plantes peuvent aussi être pulvérisées avec du glyphosate pour détecter le phénotype d'expression de la tolérance au glyphosate ou être utilisées dans des bio-essais pour déterminer la présence du trait de protection à l'insecte. Les espèces d'insectes lépidoptères sensibles telles que *Manduca sexta*, *Trichoplusia ni*, ou la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) peuvent être notamment utilisées pour identifier les plantes ayant intégré le trait d'expression de la protéine Cry1Ab.

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

MON 88017 x MON 810 a fait l'objet de dissémination à des fins expérimentales aux Etats-Unis mais pas encore en Europe.

Le maïs MON 810 a d'ores et déjà été autorisé à la mise sur le marché en Europe, consécutivement à une revue complète du dossier de notification (C/FR/95/12-02) sous les dispositions de la Directive 90/220/CE (abrogée par la Directive 2001/18/CE).

Il convient de remarquer que d'autres maïs portant des traits identiques ont déjà fait l'objet de larges disséminations :

-Le maïs MON 863 qui exprime la protéine Cry3Bb1 est autorisé à la culture aux Etats-Unis et au Canada ainsi qu'à l'import en Chine, au Japon, en Corée, au Mexique, en Russie, aux Philippines, à Taïwan et dans l'Union Européenne (sous 2001/18).

-Le maïs NK603 qui exprime la protéine CP4 EPSPS est autorisé à la culture aux Etats-Unis, au Canada, en Afrique du Sud, au Japon, en Bulgarie et aux Philippines. Il est autorisé à l'import en dans l'Union Européenne, au Mexique, en Australie, en Russie et en Taiwan.

E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION.

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, Poitou-Charentes, Midi-Pyrénées, Centre, Aquitaine, Lorraine.

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 88017 x MON810 pour l'année 2007 sont résumées ci-dessous :

Année	Nombre de sites	Surface OGM par site (m²)	Surface OGM totale (m²)
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. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION.

1) Objectifs de la dissémination.

Ces essais concernent du maïs génétiquement modifié protégé contre 3 ravageurs du maïs : la chrysomèle, la pyrale et la sésamie et tolérant au glyphosate :

- 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 européennes et françaises 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 prévus dans le schéma de création du maïs MON 88017 x MON 810, intégrant le caractère de protection contre la chrysomèle et la tolérance au glyphosate du maïs MON 88017 et le caractère de protection contre certains insectes nuisibles lépidoptères de MON 810,
- 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- L'étude des efficacités des programmes de désherbage du maïs impliquant différentes combinaisons de doses et de stades d'application de glyphosate,
- d- La confirmation par des mesures qualitatives/quantitatives (rendements) de la performance agronomique de ce maïs transgénique que ce soit pour les paramètres conventionnels des variétés de maïs, pour la résistance aux ravageurs ou pour la tolérance au glyphosate.
- e- La vérification de l'équivalence agronomique de ce maïs transgénique avec le maïs conventionnel.
- f- La production d'échantillons de matériel végétal nécessaires à la réalisation de mesures analytiques,
- g- La vérification des performances agronomiques et du respect des règles de DHS des variétés de ce maïs transgénique en vue de leur inscription catalogue des variétés autorisées.
- h- Des parcelles de présentation de ce maïs transgénique installées dans le cadre d'essai de démonstration technique.
- i- 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.

Chaque année, 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 récolte.

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 60000 et 120000 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.

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 transgéniques 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 ; excepté dans le cas 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 d'alimentation 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 de MON 88017 × MON 810 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 : manuel ou fauchage et/ou travail du sol selon le nombre de 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. EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL ANNEXE II (DIRECTIVE 2001/18/CE)

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

1) Probabilité que les plantes supérieures génétiquement modifiées 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. Ainsi, elle n'est pas présente dans l'environnement sans intervention humaine ; en raison de la sélection culturale qui a été opérée au travers des siècles, elle n'est en effet pas apte à survivre en tant que mauvaise herbe.

Le maïs ne se multiplie pas par régénération naturelle par voie végétative. Outre le grain de pollen, la principale structure de survie est la graine semence. Contrairement aux adventices, le maïs a une inflorescence femelle (soies) sur une pointe centrale rigide (épi) incluse dans une enveloppe (feuilles modifiées) : cette structure ne prédispose pas les semences à une dissémination naturelle. Néanmoins, elles peuvent être disséminées par les moyens mécaniques utilisés lors des récoltes, lors de dommages causés par des insectes ou par le vent, ou encore par des animaux sauvages traversant la culture. Chacun de ces événements peut entraîner la chute d'épis matures ou de semences, que l'on retrouve alors après la récolte. Bien que, dans des conditions tempérées, ces semences puissent en théorie se conserver dans le sol pendant l'hiver et germer l'année suivante, le maïs ne peut pas persister en tant que mauvaise herbe (Hallauer, 1995).

Ainsi, en dépit des 3,1 millions d'hectares cultivés en France et du transport des récoltes qui s'opèrent parfois sur plusieurs centaines de kilomètres par la route, le train ou les voies navigables, il n'a pas été répertorié de repousses de maïs aux abords des clôtures, des fossés ou des bords de routes. Les études de populations de plantes spontanées dans des champs de jachère en France (Mamarot et Rodriguez, 1994 ; Bodet *et al.*, 1994) ont mis en évidence l'absence de repousses de maïs.

De par leur nature, les graines de maïs n'expriment pas de dormance et sont extrêmement sensibles au froid. De ce fait, d'une manière générale, les graines tombant de l'épi sur le sol se mettront à germer, éclore et périront sous l'effet du gel en automne ou début de l'hiver de la même année. C'est pourquoi, dans les conditions européennes, les chances de conservation dans les sols des graines de maïs, et par voie de conséquence les risques d'apparition de repousses dans les cultures de la rotation sont très faibles.

Si toutefois ces graines parvenaient à hiverner, les repousses dans les cultures de la rotation seraient rapidement éradiquées par les pratiques agronomiques actuelles, que sont notamment la mise en place de la culture suivante et les pratiques de désherbage à base de divers herbicides sélectifs. Enfin, le maïs cultivé ne présente pas la même capacité d'adaptation et donc de survie que les mauvaises herbes (Hallauer, A.R., 1995).

Ainsi, dans les conditions climatiques françaises, l'apparition de maïs sauvage est inconnue : on ne rencontre pas de maïs sauvage comme des mauvaises herbes, aux abords des champs, des fossés, des trottoirs ou des jardins.

Le maïs transgénique a été cultivé sur 19.3 millions d'hectares en 2004, dont environ 11.2 millions de maïs résistants aux insectes (ISAAA, 2004), dans 16 pays. La culture de maïs transgénique a commencé dès 1996. Il n'a été rapporté aucune information indiquant une persistance accrue ou une propagation dans le milieu.

Outre les graines, le pollen de maïs peut également être considéré comme une structure de survie. Toutefois, sa capacité de survie est relativement limitée et ce, d'autant plus en fonction des conditions climatiques. D'une manière générale, le pollen du maïs peut se disperser alentour sur une courte distance, se déposer sur les fils de spathe de la même espèce ou d'une espèce différente, germer presque immédiatement après la pollinisation et terminer la fécondation dans les 24 heures. A température élevée, la capacité de survie de ce pollen de maïs n'est souvent que de quelques minutes (Herrero, M.P. and Johnson, R.R.; 1980) : il se dessèche rapidement (Hoekstra, F.A. *et al.*; 1989). Dans ces conditions, l'inflorescence mâle peut dépérir avant même la dissémination de pollen viable (Lonnquist, J.H. and Jungeneheimer, R.W.; 1943). A l'inverse, des conditions environnementales plus tempérées peuvent prolonger la viabilité du pollen de quelques heures (Jones, M.D. and Newell, L.C.; 1948).

Ces observations, valables dans le cas des cultures de maïs conventionnelles s'appliquent à l'identique aux MON 88017 et MON 810. En effet, il a été montré qu'à l'exception des traits introduits, ces maïs sont équivalents au maïs conventionnel. En effet, des essais au champ ont permis de valider que ses caractéristiques phénotypiques, agronomiques, de reproduction, de survie et de dissémination ne sont nullement différentes comparativement au maïs conventionnel.

Enfin, dans le cas où des grains de maïs de variétés hybrides MON 88017 × MON 810 (génération F2) seraient dispersés et parviendraient à germer dans l'environnement, la vigueur des plantes résultantes est attendue comme étant moindre que celle typique des cultivars hybrides commerciaux de maïs. Cette vigueur réduite résulterait du fait que, comme pour tout maïs hybride, le phénotype des plantes résultantes F2 est variable et très différent du phénotype homogène désiré des plantes hybrides F1. En conséquence, la croissance, le développement et le rendement de ces plants résultants F2 est variable et leur vigueur, leur morphologie ressemblent souvent à celle des lignées parentales moins vigoureuses à partir desquelles les semences F1 ont été produites.

En conclusion, puisque la modification génétique n'a pas entraîné de différences biologiques donnant un avantage significatif aux MON 88017 et MON 810 en comparaison au maïs conventionnel, il est fortement improbable que MON 88017 x MON 810 obtenu par croisement conventionnel soit plus persistant au champ ou plus invasif dans les environnements naturels que le maïs conventionnel. Les traits introduits lui confèrent seulement un avantage sélectif limité (protection contre des insectes nuisibles coléoptères et lépidoptères, tolérance au glyphosate) de courte durée, peu répandu dans l'espace et ayant des conséquences négligeables sur l'environnement.

2) Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux plantes supérieures génétiquement modifiées.

Présence de nouvelles caractéristiques.

Comparé au maïs conventionnel, les nouvelles caractéristiques introduites dans MON 88017 x MON 810 se limitent à :

- L'expression de la protéine Cry3Bb1 qui protège le maïs de la chrysomèle, un insecte coléoptère ravageur du maïs,
- L'expression de la protéine CP4 EPSPS ayant une affinité réduite pour le glyphosate et conférant à la plante une tolérance à cet herbicide
- L'expression de la protéine Cry1Ab qui protège le maïs de certains insectes nuisibles lépidoptères, la pyrale et la sésamie.

MON 88017 et MON 810 ont été montrés comme étant équivalents au maïs conventionnel (excepté pour les traits introduits). Il n'y donc pas de raison de penser que cela soit différent lorsqu'on regroupe ces deux événements par croisement conventionnel. Cette équivalence a d'ailleurs été vérifiée par l'analyse de la composition de MON 88017 x MON 810 (Cf. D.5). Par conséquent, dans la suite de ce développement, l'évaluation de tout avantage ou désavantage sélectif conféré à MON 88017 x MON 810 sera limité aux seuls traits introduits, à savoir la protection contre les insectes ravageurs et la tolérance au glyphosate.

Les protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab exprimées par MON 88017 x MON 810 sont bien connues et documentées.

- L'activité insecticide de la protéine **Cry3Bb1** (exprimée par MON 88017) est spécifique aux attaques des insectes chrysomélidés (famille des coléoptères), dont la chrysomèle (*Diabrotica virgifera*): Cette protéine n'affecte pas d'organismes non cibles dans l'environnement (cf. question 5 de ce chapitre d'évaluation du risque environnemental).
- Les protéines **CP4 EPSPS** (exprimée par MON 88017) sont membres d'une famille de protéines, les protéines EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), qui sont des enzymes connues pour être omniprésentes dans la nature, ne posséder aucune toxicité et ne conférer aucun avantage/désavantage sélectif aux plantes, algues, champignons, microorganismes qui les expriment. Ainsi, dans les environnements où l'absence d'application de glyphosate n'induit pas de pression sélective, le trait de tolérance au glyphosate ne conférera aucun avantage ou désavantage sélectif et ne sera pas d'une

importance compétitive directe pour les plantes sauvages, ni indirecte pour la faune et la flore interagissant avec ces plantes sauvages.

- L'activité insecticide de la protéine **Cry1Ab** (exprimée par MON 810) est spécifique aux attaques de larves de certains insectes nuisibles cibles lépidoptères des champs de maïs, dont la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) et la sésamie (*Sesamia* spp.) : elle n'affectera pas d'organismes non cibles dans l'environnement (cf. question 5 de ce chapitre d'évaluation du risque environnemental).

L'expression de ces protéines ne confère pas d'avantage ou de désavantage sélectif au maïs dans les environnements naturels puisqu'en aucun cas, MON 88017 x MON 810 n'est une plante envahissante comme les mauvaises herbes. En effet, pour les raisons décrites dans la question 1 de cette annexe II, la probabilité que MON 88017 x MON 810 se comporte comme une adventice ou survive dans les habitats naturels sous les conditions climatiques européennes est négligeable.

Dans les habitats agricoles, la tolérance au glyphosate du maïs MON 88017 x MON 810, en opposition à la sensibilité au glyphosate des adventices présentes dans la culture, fournit un avantage à ce maïs, mais cela constitue une caractéristique de base des systèmes agronomiques qui ne s'exerce que, lorsque la culture est désherbée avec un herbicide contenant la matière active glyphosate.

De la même façon, le trait de protection contre les ravageurs fournit un avantage sélectif à MON 88017 x MON 810 par rapport aux cultures de maïs conventionnel (non traités), mais ce, uniquement dans les champs où il y a une pression réelle herbivore par ces insectes nuisibles.

Ainsi, ces deux avantages compétitifs introduits ne sont d'intérêt que dans les habitats agricoles (c'est-à-dire les champs cultivés), sous certaines conditions et sont limités dans le temps depuis le semis jusqu'à la récolte, puisque la probabilité de persistance au champ d'un plant de MON 88017 x MON 810 éventuellement non récolté est négligeable (cf. question 1 de ce chapitre). Quand bien même, des repousses rares seraient observées, elles seraient rapidement contrôlées par les moyens mécaniques, ou par les pratiques de désherbage couramment utilisés dans les cultures de la rotation.

En conclusion, la probabilité que les traits introduits dans MON 88017 x MON 810 confèrent un avantage ou désavantage significatif compétitif d'importance pour les environnements naturels est négligeable.

A l'intérieur des champs de maïs commerciaux MON 88017 x MON 810, ces plants de maïs présenteront seulement un avantage sélectif vis-à-vis :

- des plants de maïs conventionnels non protégés contre les insectes en présence d'une pression réelle herbivore par des insectes nuisibles cibles.
- des adventices sensibles au glyphosate suite au traitement avec du glyphosate.

Ces avantages sont d'intérêts agronomiques et présentent un risque négligeable pour l'environnement.

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

MON 88017 x MON 810, comme tous les autres maïs, n'est sexuellement compatible avec aucune 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.

D'une manière générale, toutes les cultures de maïs produites au sein de l'Union Européenne peuvent s'inter-polliniser. Ainsi, le pollen de maïs d'un cultivar hybride spécifique peut être disséminé sur de courtes distances par le vent et fertiliser d'autres cultivars présents alentour.

Toutefois, le potentiel de transfert du matériel génétique entre les plants de maïs est limité par la mobilité du pollen de maïs. Avec un diamètre d'environ 0,1 mm, le pollen de maïs est un des pollens les plus volumineux véhiculé par le vent. En raison de son poids relativement élevé, le pollen de maïs ne se disperse en quantités significatives que sur quelques mètres depuis la plante disséminatrice. Hansen (1999) a montré que dans le voisinage d'un plant de maïs à une distance de 0,1 à 3 mètres, le dépôt de pollen sur les feuilles diminuait graduellement. Une étude française de croisement du maïs, conduite par l'AGPM (1999) a déterminé la dissémination du pollen au travers du taux de fécondation des plantes voisines. Elle a conclu que la dissémination du pollen diminuait jusqu'à 1% sur une distance de 10 m par rapport à la plante disséminatrice.

En outre, il importe de préciser que la probabilité d'inter-pollinisation entre deux champs de maïs voisins dépend de leur synchronisme de floraison, de la distance entre les deux cultures et de leur orientation, à savoir 'sous' le vent versus 'contre' le vent pendant la pollinisation.

Dans le cas où des plants de MON 88017 x MON 810 arrivant à maturité, produiraient du pollen et polliniserait la culture située à proximité, les traits présents dans ce maïs peuvent, en théorie, être transférés à la culture de maïs réceptive, et notamment les traits de protection contre les insectes et de tolérance au glyphosate. Dans une telle situation, les traits modifiés pourraient s'exprimer dans la descendance de la culture réceptive ; mais ce transfert aurait dans tous les cas des conséquences négligeables pour l'environnement (cf. question 2 de ce chapitre).

En conclusion, la probabilité du transfert des gènes de MON 88017 x MON 810

- aux espèces de plantes sauvages, est inexistante, ces espèces n'étant pas présentes en Europe ;
- et aux maïs dans les champs voisins, est fortement limitée : le risque sur l'environnement consécutif à un tel transfert peut être considéré comme négligeable.

La majorité du pollen de maïs est largement confinée sur de courtes distances depuis la plante émettrice et, par conséquent, la probabilité de transfert des traits introduits à des cultures de maïs voisines au travers d'une pollinisation croisée est par nature faible. Pour prévenir tout risque de transfert, les essais au champ avec MON 88017 x MON 810 incluront une barrière de maïs conventionnel autour du site d'essai (de 4 rangs) et une distance d'isolement de 200 m des autres cultures commerciales de maïs. Par conséquent, dans les sites d'essais de MON 88017 x MON 810, la probabilité de croisement des événements MON 88017 et MON 810 avec d'autres maïs sera négligeable.

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

MON 88017 x MON 810 ne diffère du maïs conventionnel que par l'expression des protéines :

- Cry3Bb1 qui confère une protection contre la chrysomèle, un insecte nuisible du maïs,
- CP4 EPSPS qui confèrent la tolérance au glyphosate,
- Cry1Ab qui assure une protection contre certains insectes nuisibles lépidoptères.

Par définition, le trait de tolérance au glyphosate n'a aucune interaction, directe ou indirecte avec des organismes cibles. Par conséquent, l'évaluation d'incidences éventuelles entre la plante génétiquement modifiée et des organismes cibles ne portera que sur le trait introduit de protection contre certains insectes nuisibles.

D'une manière générale, le maïs cultivé est connu pour interagir avec une grande diversité d'insectes nuisibles herbivores qui peuvent causer de sérieux dommages aux cultures, notamment occasionner de faibles rendements et réduire la qualité des récoltes. **La chrysomèle** (*Diabrotica virgifera*) est un insecte coléoptère qui est un des principaux ravageurs du maïs sur le continent américain. Depuis 1992, ce parasite s'est implanté en Bosnie et depuis lors, il se répand dans les pays de l'Est. **La pyrale** (*Ostrinia nubilalis*) est un nuisible économiquement important du maïs qui s'est propagé dans les principales régions de cultures du maïs en Europe (Dicke et Guthrie, 1988). De même, **la sésamie** (*Sesamia nonagrioides*), parfois identifiée comme la pyrale de Méditerranée, est un des nuisibles les plus dommageables du maïs dans les pays méditerranéens (Castanera, 1986 ; Anglade, 1972 ; Melamed-Madjar et Tam, 1980).

MON 88017 x MON 810 exprimant les protéines *Bt* dérivées de *B. thuringiensis* offre une stratégie rationnelle de contrôle de ces trois ravageurs tout en réduisant les coûts liés à l'utilisation d'insecticides conventionnels (Rice et Pilcher, 1999).

Les activités insecticides des protéines Cry3Bb1 et Cry1Ab sont spécifiques des insectes cibles. Ces insectes constituent des nuisibles importants dans l'environnement agronomique ; par conséquent, le contrôle direct de leur niveau de population dans les champs de maïs se justifie sur une base agronomique et ne peut pas être considéré comme un effet néfaste environnemental en lui-même.

En outre, il n'existe pas de site de liaison de ces protéines à la surface des cellules intestinales des mammifères : les mammifères et les humains ne sont pas sensibles à l'action toxique de cette protéine (Hofmann *et al.*, 1988b ; Noteborn et Kuiper, 1995 ; Sacchi *et al.*, 1986).

Plus encore, des recherches au champ approfondies ont montré que le maïs protégé par l'expression de Cry1Ab présente un risque significativement réduit envers des infestations secondaires par des champignons pathogènes ou toxigéniques communs, tel que *Fusarium spp.*, et par conséquent, a le potentiel de contenir de plus faibles niveaux de certaines mycotoxines (fumonisine par exemple) dans les produits de la récolte telles (Bakan *et al.*, 2002 ; Magg *et al.*, 2002 ; Masoero *et al.*, 1999 ; Munkvold, 1997, 2002). Or, présentes dans l'alimentation, les mycotoxines peuvent être la cause de sérieuses maladies, résultant en de grandes souffrances voire même en des décès dans les fermes animales (Etzel, 2002 ; Hussein et Brasel, 2001 ; Huwig *et al.*, 2001) Ainsi, la réduction de ces 'contaminants' dans les produits de récolte de la lignée de maïs MON 88017 x MON 810 est un bénéfice indirect important – plutôt qu'un risque - de l'interaction écologique de ce maïs avec ces organismes cibles.

D'une part, MON 88017 et MON 810 étant équivalents au maïs conventionnel, et d'autre part MON 88017 x MON 810 étant obtenu par croisement conventionnel, il est également équivalent au maïs conventionnel (excepté pour les traits insérés). Cela a été vérifié par l'analyse de la composition de la plante (Cf. D.5).

Ce maïs contient les mêmes traits de protection contre les insectes que MON 88017 et MON 810, et par conséquent interagit avec les mêmes organismes cibles. Or, comme détaillé précédemment, les études de laboratoire et au champ avec MON 88017 et MON 810, ainsi que les expériences commerciales conduites avec MON 810 (qui exprime la protéine Cry1Ab) et MON 863 (qui exprime la protéine Cry3Bb1) n'ont répertorié aucune incidence particulière de ce maïs sur l'environnement suite à ces interactions avec les organismes cibles. Il n'y a donc pas lieu de considérer qu'il en soit autrement pour MON 88017 x MON 810.

En conclusion, comme MON 88017 et MON 810, MON 88017 x MON 810 induit un risque négligeable envers l'environnement suite à ses interactions avec ces organismes cibles. Au contraire, cette culture de maïs protégée contre certains coléoptères et lépidoptères nuisibles cibles présentera des bénéfices environnementaux importants dont :

- 1) un contrôle satisfaisant et fiable des nuisibles spécifiques du maïs tout en assurant le maintien d'espèces bénéfiques et plus largement des organismes non cibles,
- 2) une réduction des usages d'insecticides chimiques,
- 3) une excellente compatibilité avec la lutte intégrée (IPM) et les concepts d'agriculture durable,
- 4) des niveaux potentiellement réduits de mycotoxines de champignons telles que les fumonisines dans les grains de maïs.

5) Incidences immédiates et/ou différées que les interactions directes ou indirectes entre les plantes supérieures génétiquement modifiées 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 MON 88017 x MON 810 est équivalent au maïs conventionnel (excepté pour les traits insérés), l'interaction de ce maïs avec les organismes non cibles dans l'environnement est considérée comme non différente de celle du maïs conventionnel, excepté pour son exposition des nuisibles herbivores de maïs aux protéines Cry3Bb1 CP4 EPSPS et Cry1Ab.

Par organismes non cibles on entend tous les organismes, animaux et plantes, qui pourraient non intentionnellement être affectés au travers d'un mécanisme spécifique ou non spécifique par ces protéines nouvellement exprimées dans le maïs.

La probabilité des effets environnementaux adverses résultant de l'exposition des organismes non cibles aux protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab exprimées dans MON 88017 x MON 810 est négligeable. En effet, l'estimation de sécurité et une expérience commerciale (Cf. tableau 1) pour MON 863 (exprimant Cry3Bb1), NK603 (exprimant CP4EPSPS) et MON 810 (exprimant Cry1Ab) ont montré ou confirmé qu'il n'y a pas d'effet indésirable ou inattendu. Basé sur notre expérience des pratiques de sélection du maïs, les procédures de test et de sélection pour les nouveaux hybrides et l'efficacité démontrée de MON 88017 x MON 810 au champ, il n'y a pas de raison de suspecter que l'interaction de ce maïs ou de ses protéines nouvellement exprimées, avec les organismes non cibles puissent être altérée significativement, en comparaison avec MON 88017 et MON 810. Plus encore, il n'y a pas de mécanisme connu permettant de penser que l'une de ces protéines introduites puisse altérer l'interaction de l'autre avec les organismes non cibles, quand elles sont présentes simultanément dans MON 88017 x MON 810.

a) Incidences sur les invertébrés non cibles.

i) Protéines Cry3Bb1.

MON 88017 x MON 810 a hérité de la modification génétique contenue dans MON 88017 : il exprime ainsi les mêmes protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS.

La protéine Cry3Bb1 confère au maïs la protection contre la chrysomèle (*Diabrotica virgifera*), un coléoptère nuisible du maïs. Cette protéine a déjà été utilisée depuis longtemps sans qu'aucun impact négatif n'ait été recensé. Le produit Raven Oil (préparation à base de protéines Bt) commercialisé aux Etats-Unis (EPA 2005) contient également de protéines Cry3Bb1. Enfin, le maïs MON 863 qui exprime une protéine Cry3Bb1 est commercialisé aux Etats-Unis depuis 2003. Pour ces deux produits commercialisés, aucun effet sur les invertébrés non cibles n'a été reporté.

L'activité de la protéine Cry3Bb1 est spécifique des coléoptères. Cette protéine est spécifique de la famille des chrysomelidés (Van Tersch et al 94, EPA 2003).

L'EPA (Agence de l'Environnement aux Etats-Unis) (EPA2003) a conduit une évaluation complète sur les effets potentiels de la protéine Cry3Bb1 pour l'étude du dossier MON 863 et a conclu à l'absence de risque de cet évènement sur différents organismes non cibles. Du fait que le maïs MON 88017 exprime une protéine Cry3Bb1 qui est physiologiquement et fonctionnellement équivalente à la protéine Cry3Bb1 de MON 863, l'absence de risque s'applique également à MON 88017.

En effet, l'évaluation des effets potentiels de MON 88017 a été estimée à partir des doses sans effets obtenus pour différents invertébrés avec la protéine Cry3Bb1 et des doses maximales auxquelles ces organismes peuvent être exposés via le maïs MON 88017. Cette évaluation a été menée pour les organismes suivants :

- Cladoceran (*Daphnia magna*), constitutif du zooplancton
- Collembole (*Folsomia candida*),
- Abeille adulte (*Apis mellifera*)
- larve d'abeille (*Apis mellifera*)
- Coccinelle adulte (*Hippodamia convergens*)
- Chrysope (*Chrysoperla carnea*), insecte prédateur bénéfique
- Guêpe parasitoïde (*Nasonia vitripennis*), insecte prédateur bénéfique
- Ver de terre (*Eisenia fetida*)

Tout comme pour le maïs MON 863, les organismes non cibles en présence de maïs MON 88017, sont exposés à la protéine Cry3Bb1 à des seuils largement en deçà de ceux pouvant présenter un risque.

ii) Protéine CP4EPSPS

MON 88017 x MON 810 a hérité de la modification génétique contenue dans le maïs MON 88017 : il exprime ainsi les mêmes protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS.

CP4EPSPS confère la tolérance au traitement avec du glyphosate. Précisons que les cultures de soja, de coton et de colza tolérantes au glyphosate, exprimant toutes des protéines quasi identiques, ont été développées et sont actuellement commercialisées par Monsanto.

La CP4 EPSPS, bien que protéine nouvellement exprimée dans les cultures tolérantes au glyphosate, n'est pas une nouvelle protéine dans l'environnement.

En effet, le gène *cp4 epsps* présent dans les vecteurs utilisés pour produire les plants tolérants au glyphosate, est dérivé du génome d'une bactérie commune du sol : *Agrobacterium* sp. souche CP4. Il s'agit d'une enzyme impliquée dans le schéma biochimique shikimate, elle n'a pas d'organisme cible, ni de toxicité liée à son mode d'action. Ces CP4 EPSPS sont structurellement et fonctionnellement similaires aux autres enzymes EPSPS endogènes des plantes habituellement consommées et présentes dans des sources microbiennes.

De plus, les organismes non cibles interagissant avec le maïs ont évolué en interaction étroite avec un large spectre de plantes vertes et de micro-organismes ; par conséquent, ces organismes ont historiquement été exposés à cette famille de protéines. Les protéines EPSPS peuvent donc faire état d'une longue expérience sans impact envers les organismes non cibles.

Sur la base de leur omniprésence dans l'environnement et de leur historique de sécurité, il n'y a pas *a priori* de raison de suspecter qu'une protéine EPSPS possède une activité biologique envers des organismes non cibles.

iii) Protéine Cry1Ab.

MON 88017 x MON 810 a hérité de la modification génétique contenue dans le maïs MON 810 : il exprime ainsi la même protéine Cry1Ab qui confère la protection à certains insectes nuisibles lépidoptères spécifiques cibles. Bien que Cry1Ab soit une protéine nouvellement exprimée dans le maïs (et dans d'autres cultures génétiquement modifiées), cette protéine a déjà été utilisée depuis longtemps sans qu'aucun impact négatif n'ait été recensé. La protéine Cry1Ab toute entière encodée par le gène *cry1Ab* qui a été utilisé pour produire le maïs MON 810, et le noyau de la protéine présentant une activité insecticide, produite dans l'intestin des insectes suite à l'ingestion, sont identiques aux protéines respectives Cry1Ab de longueur entière et au noyau résistant à la trypsine contenues dans les formulations à base de micro-organismes de souche *Btk* utilisées au cours des 40 dernières années dans les pulvérisations commerciales *Bt*. Or, il existe une documentation détaillée sur l'absence d'effet non-cible résultant de l'utilisation de ces préparations d'organismes de souche *Btk* contenant la protéine Cry1Ab (Melin et Cozzi, 1990). Les protéines Cry1Ab sont de plus connues pour être extrêmement sélectives des insectes lépidoptères (Dulmage, 1981 ; Klausner, 1984 ; Aronson *et al.*, 1986 ; Whiteley et Schnepf, 1986 ; MacIntosh *et al.*, 1990) : elles se lient ainsi spécifiquement aux récepteurs sur l'intestin moyen des insectes lépidoptères (Wolfersberger *et al.*, 1986 ; Hofmann *et al.*, 1988a ; Hofmann *et al.*, 1988b ; Van Rie *et al.*, 1989 ; Van Rie *et al.*, 1990) et n'ont aucun effet nuisible sur les insectes bénéfiques ou autres insectes non cibles, dont les prédateurs et les parasitoïdes des insectes nuisibles lépidoptères ou encore les abeilles (*Apis mellifera*) (Cantwell *et al.*, 1972 ; Krieg et Langenbruch, 1981 ; Flexner *et al.*, 1986 ; EPA, 1988 ; Vinson, 1989 ; Melin et Cozzi, 1990).

Pour confirmer et étendre les données générées grâce à ces produits microbiens, l'impact potentiel de la protéine Cry1Ab sur les organismes non cibles a été évalué sur différents organismes représentatifs. Ces études ont été reportées en détail dans le dossier C/FR/95/12-02 relatif au maïs MON 810, qui a été autorisé à la culture et à l'utilisation en Europe. Les espèces non cibles testées inclus :

- a) les abeilles (*Apis mellifera* L.) larvaire et adulte, insecte pollinisateur bénéfique,
- b) *Chrysoperla carnea*, insecte prédateur bénéfique,
- c) *Brachymeria intermedia*, parasite des mouches,
- d) *Hipodamia convergens*, insecte prédateur bénéfique,
- e) les vers de terre (*Eisenia fetida*), espèce représentative détritivore du sol.

En outre, le matériel foliaire de plants de maïs MON 810 a été utilisé dans les études des organismes du sol non cibles utilisant *Collembola (Folsomia candida)*.

Toutes ces études sur organismes non cibles ont montré que la mortalité des espèces d'insectes (a, c) non-lépidoptères et de trois autres organismes (b, d, e) représentatifs exposés à la protéine Cry1Ab ne diffère pas significativement de la mortalité de contrôle. Parallèlement, aucune toxicité aiguë n'a été observée pour les trois espèces de prédateurs (*Coleomegilla maculata*, *Orius insidiosus* et *Chrysoperla carnea*) exposés au pollen de plantes exprimant la protéine Cry1Ab (Pilcher *et al.*, 1997). De même, aucun effet spécifique n'a été observé lorsque *Folsomia candida* et *Oppia nitens* ont été nourris avec des feuilles de coton contenant les protéines Cry1A(c) et Cry1Ab (Yu *et al.*, 1997). Enfin, dans les expérimentations conduites au champ en 1994, les comparaisons des plants de maïs exprimant la protéine Cry1Ab et des plants de contrôle n'ont mis en évidence aucune différence sur l'oviposition et l'attaque de la pyrale par les ennemis naturels (Orr et Landis, 1997). Tous ces résultats tendent à montrer l'innocuité de la protéine Cry1Ab envers les organismes non cibles.

iv) *Conclusion pour les invertébrés :*

En conclusion, le potentiel d'effets adverses environnementaux du maïs MON 88017 x MON 810 sur les invertébrés non cibles au travers d'interactions écologiques directes ou indirectes avec ce maïs ou au travers de contact avec les protéines exprimées Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab est négligeable ; cela se base sur une grande diversité d'espèces examinées, considérées comme représentatives du large spectre de vie d'invertébrés qui peuvent être observés dans tous les compartiments des écosystèmes inférieurs – et supérieurs- du sol interagissant avec la culture.

b) Incidences sur les plantes non cibles :

D'une part, MON 88017 et MON 810 étant équivalents au maïs conventionnel, et d'autre part MON 88017 x MON 810 étant obtenu par croisement conventionnel, il est également équivalent au maïs conventionnel (excepté pour les traits insérés). Cela a été vérifié par l'analyse de la composition de la plante (Cf. D.5)

Or, si l'on considère que le risque que la présence de ces traits impacte sur la persistance, l'aptitude à envahir l'environnement ou la compétitivité est négligeable, il est fortement improbable que le maïs MON 88017 x MON 810 diffère du maïs conventionnel concernant la compétition directe et indirecte avec d'autres plantes pour les ressources naturelles que sont le sol, l'espace, l'eau ou encore la lumière. En conclusion, le potentiel du maïs MON 88017 x MON 810 à causer des effets environnementaux adverses sur les plantes non cibles, au travers de la compétition pour les ressources naturelles est négligeable.

c) Incidences sur les vertébrés non cibles :

La protéine Cr3Bb1 a déjà fait l'objet d'étude sur animaux approfondie pour le maïs MON863 qui ont permis de conclure à son innocuité (CGB (2004), AFSSA (2004) et EFSA (2004)).

Si l'on considère les données approfondies de sécurité animale des protéines CP4 EPSPS et Cry1Ab, la probabilité d'une incidence néfaste de ce maïs sur les vertébrés prédateurs, interagissant ou dépendant d'autres organismes est négligeable (Harrison *et al.*, 1996 ; Naylor, 1992. Cette conclusion est confirmée par les résultats des expériences d'alimentation animale conduites sur poulets fortement sensibles et capables de croître rapidement. Ces poulets ont été nourris avec du grain entier de maïs NK603 x MON 810 contenant à la fois deux protéines CP4EPSPS et Cr1Ab en combinaison (Taylor *et al.*, 2003) : l'absence d'effets néfastes immédiats ou différés des protéines CP4 EPSPS et Cry1Ab dans ces tests animaux a été établie.

Par conséquent, il est fortement improbable que le maïs MON 88017 x MON 810 ou ses protéines exprimées Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab puissent causer un effet néfaste immédiat ou différé sur les animaux sauvages qui ont élu domicile où même fouinant dans le voisinage de l'essai : cela est cohérent et prévisible sur la base des données et de l'expérience de mise en culture des maïs MON863 exprimant la protéine Cr3Bb1, NK603 exprimant la CP4EPSPS et MON 810 exprimant le Cry1Ab.

d) Conclusion :

Pour conclure, le maïs MON 88017 x MON 810 et le maïs conventionnel étant équivalents dans leurs caractéristiques biologiques et agronomiques, les interactions du maïs MON 88017 x MON 810 avec les organismes non cibles dans l'environnement ne sont pas différentes de celles du maïs conventionnel. Ainsi, les risques environnementaux résultant des interactions écologiques des organismes non cibles avec le maïs MON810 sont négligeables.

Précisons que certaines études conduites avec le maïs tolérant au glyphosate suggère que ce système agronomique peut promouvoir la prolifération d'arthropodes bénéfiques au travers de l'augmentation du niveau de la biomasse de mauvaises herbes présente dans les parcelles si les applications de l'herbicide à base de glyphosate sont appliquées significativement après l'émergence des adventices (Hough-Goldstein *et al.*, 2002). A l'identique, le trait de protection sélectif contre les insectes dans le maïs MON 88017 x MON 810 peut apporter un bénéfice significatif - plutôt qu'un risque - pour les organismes non cibles dans le champ et les écosystèmes adjacents.

Enfin, la présence des traits Bt de protection contre les ravageurs du maïs donne aux agriculteurs la possibilité de réduire les utilisations d'insecticide à large spectre. Ainsi tout en permettant un contrôle fiable de certains nuisibles du maïs, ils maintiennent les populations d'organismes non cibles dans les parcelles cultivées.

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

Précisons que dans le cadre de cette demande, qui se rapporte à la seule dissémination à des fins de recherche et de développement du maïs MON 88017 x MON 810, les personnes étant en contact avec ce maïs seront essentiellement des scientifiques, des ingénieurs et des techniciens au champ lors de sa manipulation ; en effet, l'ensemble du matériel végétal transgénique non utilisé, ou prélevé à des fins d'analyses en laboratoire sera au final détruit et n'intégrera en aucun cas une chaîne d'alimentation humaine ou animale.

D'une part, MON 88017 et MON 810 étant équivalents au maïs conventionnel, et d'autre part MON 88017 x MON 810 étant obtenu par croisement conventionnel, il est également équivalent au maïs conventionnel (excepté pour les traits insérés). Cela a été vérifié par l'analyse de la composition de la plante (Cf. D.5),

Par conséquent, en théorie, seule l'expression de ces trois protéines dans la même plante pourrait être à même d'avoir une incidence immédiate ou différée sur la santé humaine. Toutefois, de telles incidences sont fortement improbables puisque aucun effet de ce type n'a été répertorié lors des études d'évaluation portant sur le maïs transgénique MON 88017. De plus, une large expérience commerciale pour les maïs MON863 (exprimant Cry3Bb), NK603 (exprimant CP4EPSPS) et MON 810 (exprimant Cry1Ab (cf tableau 1) ont montré ou confirmé qu'il n'y a pas d'incidence sur la santé humaine.

Les effets potentiels des protéines nouvellement exprimées dans le maïs MON 88017 x MON 810 sur la santé humaine ont déjà été discutés dans ce dossier (cf paragraphe D.7). L'innocuité de ces protéines sur la santé humaine a ainsi été établie sur la base

- a) d'une caractérisation détaillée de chacune des protéines,
- b) d'une comparaison de ces protéines à des toxines protéiques ou allergènes connus,
- c) la vitesse de digestion dans des fluides simulés gastriques et
- d) des évaluations de toxicité aiguë pour chacune des protéines dans les études de gavage oral chez les rongeurs.

Pour l'une comme pour l'autre des protéines, aucun effet particulier sur la santé humaine n'a été mis en évidence.

En plus des nombreuses études au champ ont été réalisées aux Etas-Unis et en Europe avec les maïs déjà commercialisés : MON863 (exprimant Cry3Bb), NK603 (exprimant CP4EPSPS) et MON 810 exprimant Cry1Ab) Des tests au champ et l'expérience de commercialisation ne donnent pas lieu de penser que les risques professionnels liés à la mise en culture, au stockage, à la manutention, à la transformation et à l'utilisation à des fins alimentaires du maïs MON 88017 x MON 810 sont différents de ceux liés au maïs conventionnel.

En conclusion, comme la probabilité d'incidences sur la santé des individus entrant en contact avec ce maïs MON 88017 x MON 810 n'est pas différente de celle du maïs conventionnel. En effet, les traits introduits de tolérance au glyphosate et de protection contre les insectes, transmis par l'expression respectivement des protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab, présente un risque toxique ou allergène négligeable.

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.

Au cours des siècles d'expérience avec le maïs conventionnel, domestiqué en Europe, aucun effet néfaste sur la santé du bétail ou des animaux de basse-cour n'a été répertorié. D'une part, MON 88017 et MON 810 étant équivalents au maïs conventionnel, et d'autre part MON 88017 x MON 810 étant obtenu par croisement conventionnel, il est également équivalent au maïs conventionnel (excepté pour les traits insérés). Cela a été vérifié par l'analyse de la composition de la plante (Cf. D.5)

La sécurité alimentaire des protéines CP4 EPSPS et Cry1Ab qui expriment ces traits a été dûment établie par le passé par les données générées pour le maïs NK603 (cf. dossier C/ES/00/01) et le maïs MON 810 (cf. dossier C/FR/95/12-02). Plus récemment, la protéine Cry3Bb1 qui est également exprimée par le maïs MON863 a été également évaluée. En Europe, plusieurs agences ont donné un opinion positive à la consommation de ce maïs MON863 (CGB (2004), AFSSA (2004) et EFSA (2004)).

Le maïs MON 88017 x MON 810 exprime simultanément les trois nouvelles protéines introduites. Mais il n'y a pas lieu d'envisager des interactions significatives entre Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab (Cf. D-7 et E-2); par conséquent, les conclusions établies sur l'innocuité de ces protéines lorsqu'elles s'expriment individuellement dans les maïs MON 88017 et MON 810 ne sont pas remises en cause et s'appliquent de la même manière à l'expression combinée de ces protéines dans les MON 88017 x MON 810.

En conclusion, au même titre que le maïs conventionnel, le maïs MON 88017 x MON 810 est sans danger pour l'alimentation animale.

La probabilité d'effets immédiats ou différés sur la santé animale ou humaine (chez les hommes consommant ces animaux) de l'utilisation du maïs MON 88017 x MON 810 est négligeable. De ce fait, le risque inhérent à ce maïs dans la chaîne alimentaire humaine/animale est lui aussi négligeable.

Il importe en outre de préciser que cette demande porte exclusivement sur la conduite au champ d'essais expérimentaux et qu'en aucun cas, la récolte ne sera utilisée à des fins d'alimentation animale.

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 biogéochimiques au travers du labour, de la fertilisation, et de la conduite d'une monoculture dans une zone définie.

D'une part, MON 88017 et MON 810 étant équivalents au maïs conventionnel, et d'autre part MON 88017 x MON 810 étant obtenu par croisement conventionnel, il est également équivalent au maïs conventionnel (excepté pour les traits insérés) et présente des caractéristiques de morphologie, de développement, de rendement, de dissémination, de santé sanitaire et de survie équivalentes: il n'y a donc pas lieu de penser que ce maïs est significativement différent du maïs conventionnel pour ce qui est de son influence directe sur les niveaux de nutriments dans le sol.

La seule caractéristique qui peut, en théorie, être à même d'avoir une incidence sur les organismes non cibles impliqués dans les processus biogéochimiques est leur exposition potentielle aux protéines nouvellement exprimées Cry3Bb1, CP4-EPSPS et Cry1Ab dans le même maïs MON 88017 x MON 810.

Cependant, cela apparaît fortement improbable pour ce maïs résultant d'un croisement conventionnel des lignées de maïs MON 88017 et MON 810, puisque aucune incidence n'est connue pour l'une ou l'autre de ces maïs.

Durant son cycle de vie au champ, le maïs MON 88017 x MON 810 interagit avec un spectre d'invertébrés non cibles qui sont impliqués dans les processus biogéochimiques du sol. Cependant, il a été montré que les protéines Cry3BB1, CP4 EPSPS et Cry1AB exprimées dans le maïs MON 88017 x MON 810 présentent un risque négligeable de provoquer des effets environnementaux adverses au travers de leurs interactions directes ou indirectes avec les organismes non cibles, dont les organismes qui sont impliqués dans la fonction de décomposition dans le sol (cf. paragraphes 4 et 5 de ce chapitre).

Les populations de bactéries et de champignons sont aussi des éléments clés du maintien de l'état sanitaire et de la qualité des sols. Les communautés microbiennes du sol qui servent d'intermédiaires dans les processus biogéochimiques sont fortement complexes et souvent caractérisées par une forte diversité microbienne (Tiedje *et al.*, 1999). La diversité et la profusion de ces organismes et par conséquent leurs processus microbiens sont significativement affectés par des facteurs biotiques (groupement de caractéristiques et dynamiques), des facteurs abiotiques (structure du sol, type d'argile, capacité d'humidité, conditions environnementales, pH) et d'utilisation des sol (culture, pratique de labours, historique des cultures cultivées précédemment). Les pratiques agricoles telles que la fertilisation, les techniques de labours peuvent aussi avoir des effets importants sur ces populations microbiennes du sol, la composition des espèces, la colonisation et les processus biochimiques associés (Alexander, 1961). En conséquence, une variation significative dans les populations microbiennes est attendue dans l'environnement agricole.

Bien que les protéines Cry3Bb1, CP4 EPSPS et Cry1Ab présentes dans le matériel de maïs MON 88017XMON 810 en décomposition, soient considérées comme étant nouvellement dans ce maïs, elles ne constituent pas de nouvelles protéines dans le sol. Les gènes *cry3Bb1*, *cp4 epsps* et *cry1Ab*, utilisés dans ce maïs génétiquement modifié sont dérivés du génome de deux bactéries communes du sol : *Agrobacterium sp.* (pour CP4) et *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, (pour les protéines Cry).

Le mécanisme toxique des protéines Bt, Cry3Bb1 et Cry1Ab, a été précisément caractérisé (cf dossier C/FR/95/12-02, EPA 2003) et ces protéines se sont révélées spécifiques de certains insectes nuisibles coléoptère et lépidoptères cibles. En conséquence, le potentiel d'activité de cette protéine envers les microorganismes est négligeable. En plus, il a été démontré que les protéines Cry se dégradent rapidement dans le sol (Sims et Holden, 1996, Palm *et al.*, 1994, West *et al.* 1984, West, 1984 et Pruett *et al.*, 1980).

Cette dégradation rapide renforce l'absence de nuisibilité de Cry3Bb1 et Cry1Ab sur les microorganismes impliqués dans la fonction de décomposition et les organismes non cibles résidant dans le sol.

Les protéines CP4 EPSPS appartiennent à une classe de protéines EPSPS bien connues, inoffensives, qui sont communément présentes dans les bactéries, les champignons, les algues et dans toutes les plantes supérieures. La plupart des décomposeurs expriment en fait eux-mêmes des protéines EPSPS. Par conséquent, les 'décomposeurs' et les détritivores interagissant ont été historiquement exposés à une diversité de ces protéines EPSPS naturelles et il n'y a aucune raison *a priori* de suspecter qu'elles aient un effet néfaste sur la fonction de décomposition.

Enfin, une importante expérience commerciale au travers de la commercialisation de cultures exprimant différentes CP4 EPSPS et de cultures protégées contre les insectes exprimant la protéine Cry3Bb1 (MON863) Cry1Ab (MON 810) n'a révélé aucun effet adverse ou indésirable sur les processus biogéochimiques et la fertilité des sols.

En conclusion, il est fortement improbable qu'il y ait une différence entre le maïs MON 88017 x MON 810 et le maïs conventionnel dans leur influence directe sur les niveaux de nutriments du sol. En outre, il est fortement improbable que les interactions directes ou indirectes entre ce maïs et les décomposeurs ou détritivores dans l'environnement réceptif puissent causer un effet immédiat ou différé sur les fonctions de décompositions ou de recyclage des nutriments dans le sol. En résumé, le risque environnemental d'impact sur les processus biogéochimiques, suite aux interactions du maïs MON 88017XMON 810 avec les organismes cibles ou non cibles dans le sol est négligeable.

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

D'une part, MON 88017 et MON 810 étant équivalents au maïs conventionnel, et d'autre part MON 88017 x MON 810 étant obtenu par croisement conventionnel, il est également équivalent au maïs conventionnel (excepté pour les traits insérés). Cela a été vérifié par l'analyse de la composition de la plante (Cf. D.5)

Ainsi, toutes les pratiques agronomiques actuellement utilisées pour la production de maïs dans l'Union Européenne restent applicables pour le maïs MON 88017 x MON 810 et aucune nouvelle ou spécifique technique de culture, de gestion, ou de récolte n'est nécessaire. L'option supplémentaire d'utiliser un traitement herbicide à base de glyphosate dans la culture du maïs est considérée comme un nouvel outil pour une technique de gestion déjà existante dans le maïs, c'est à dire le contrôle optimum des adventices.

En conclusion, aucune caractéristique des plantes génétiquement modifiées ne peut être identifiée comme pouvant causer des effets adverses environnementaux, suite à un besoin spécifique d'un changement dans les pratiques agricoles. Par conséquent, l'impact environnemental des techniques de culture, de gestion et de récolte appliquées dans les essais planifiés est considéré comme non différent des mises en culture de tout autre maïs.

Il est actuellement attendu que la production de maïs MON 88017 x MON 810 aura un impact positif sur les pratiques agronomiques actuelles dans la culture du maïs. La protection contre des ravageurs très nuisibles du maïs offrira de nombreux bénéfices :

1. un moyen fiable de contrôler les insectes nuisibles cibles coléoptère et lépidoptères de maïs,
2. le contrôle des insectes cibles tout en respectant les espèces bénéfiques et autres espèces non cibles,
3. l'utilisation réduite des insecticides chimiques (Rice and Pilcher, 1999) et par conséquent une exposition réduite de l'applicateur,
4. la compatibilité avec la lutte intégrée et les systèmes d'agriculture durables,
5. le potentiel de conserver des niveaux réduits de mycotoxines (par exemple fumonisine) dans les grains de maïs (Munkvold *et al.*, 1999 ; Masoero *et al.*, 1999)
6. pas d'exigences supplémentaires de labour ou d'équipement, ce qui implique que la technologie soit utilisable aussi bien pour les agriculteurs de petites comme de grandes exploitations.

L'utilisation du glyphosate en désherbage du maïs permettra également à l'agriculteur de tirer avantage des propriétés favorables à l'environnement et de sécurité de cette herbicide (cf. l'inclusion du glyphosate sur Annexe I de la Directive 91/414/EEC) :

1. une option de contrôle des adventices supplémentaire à large spectre,
2. un nouveau mode d'action herbicide pour le désherbage dans le maïs,
3. une flexibilité accrue pour traiter les mauvaises herbes sur la base du 'si nécessaire',
4. un contrôle des adventices à un coût effectif.

10) Détermination du risque global de l'OGM.

L'analyse des caractéristiques du maïs MON 88017 x MON 810, spécialement en comparaison avec l'expérience de mise en culture de maïs conventionnel dans l'Union Européenne, a montré que les risques d'effets adverses potentiels sur la santé humaine et animale et l'environnement récepteur, résultant des essais au champ planifiés avec le maïs MON 88017 x MON 810 sont négligeables.

Par conséquent, le risque environnemental global posé par l'expérimentation avec cette plante supérieure génétiquement modifiée est négligeable et aucune stratégie spécifique pour la gestion du risque n'est requise.

BIBLIOGRAPHIE

AFSSA 2004 Saisine n° 2003-SA-0324 Saisine liée n° 2003-SA-0179,
<http://www.afssa.fr/ftp/afssa/22032-22033.pdf>,

Alexander, M. (1961) Introduction to soil microbiology. *John Wiley and Sons*.

Anderson, P., Hellmich, R. and Lewis, L. (2000) Bt pollen and monarch butterflies: research update. *Joint Annual Meeting: Entomological Society of Canada and Entomological Society of America*, To be published.

Anglade, P. (1972) Les Sesamia. *Entomologie appliquée à l'agriculture. II, Lépidoptères, II*, 1389-1400.

Aronson, A.I., Beckman, W. and Dunn, P. (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50, 1, 1-24.

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.

Bodet, J.M., Straebler, M. and Broucqsault, L.M. (1994) Type de jachère et couvert. *Recueil des communications du colloque "Jachères 94"*, 19-41.

Bulla, L.A., Kramer, K.J. and Davidson, L.I. (1977) Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 375-383.

Cantwell, G.E., Lehnert, T. and Fowler, J. (1972) Are biological insecticides harmful to the honey bee? *American bee journal*, 294-296.

Castanera, P. (1986) Plagas del Maiz. *IV Jornadas Técnicas sobre el Maiz, Lérida, Plaga*, 1-24.

CGB 2004, séance du 23 novembre 2004, Référence C/DE/02/9 ,
www.ogm.gouv.fr/mise_marche/avis_scientifiques/avis_scientifique_2004.htm

CGB 2005, séance du 12 avril 2005, Référence B/FR/05.04.01 ,
www.ogm.gouv.fr/mise_marche/avis_scientifiques/avis_scientifique_2004.htm

Chevrier, A. and Barbier, S. (2002) Performances économiques et environnementales des techniques agricoles de conservation des sols. *Création d'un référentiel et premiers résultats (Mémoire de fin d'études)*. Institut National de la Recherche Agronomique de Versailles-Grignon. Association pour la Promotion d'une Agriculture Durable.

Dicke, F.F. and Guthrie, W.D. (1988) The most important corn insects. *Corn and Corn Improvement*, Third edition, 769-880.

Dies Jambrino, J.I. and Fernandez-Anero. (1997) Resultados en la recuperacion de la biodiversidad en el Raco de l'Olla (Albufera de Valencia) tras la aplicacion selectiva de un herbicida de baja peligrosidad. *Bol. San. Veg. Plagas*, 23, 27-37.

- Dulmage, H.T. (1981) Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Burger, H.D., Vol. 11, pp. 193-222.
- Edwards, W.M., Norton, L.D. and Redmond, C.E. (1988) Characterizing macropores that affect infiltration into notilled soil. *J. Soil Sci.*, 52, 483-487.
- EPA. (1988) Guidance for the reregistration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. *NTIS PB 89-164198*, 1-70.
- EPA (2005) Raven Oil Flowable :
http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists/bppd-prods-5-12-04.pdf
- EPA. 2003. Biopesticides Registration Action Document: Event MON 863 *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 Corn. Benefits Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- EFSA 2004, The EFSA journal 50, 1-25
http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/383/opinion_gmo_07_en1.pdf
- Etzel, R.A. (2002) Mycotoxins. *JAMA*, 287, 425.
- Flexner, J.L., Lighthart, B. and Croft, B.A. (1986) The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. *Agriculture, ecosystems and environment*, 16, 203-254.
- Granval, P., Aliaga, R. and Soto, P. (1993) Effets des pratiques agricoles sur les lombriciens (Lumbricidae), les bécassines des marais (*Gallinago gallinago*) et dans la valeur pastorale du marais de la Dives (Calvados). *Gibier Faune Sauvage*, 10, 59-73.
- Hallauer, A.R. (1995) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. .
- 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*.
- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Naylor, M.W., Ream, J.E., Hammond, B.G., Nida, D.L., Burnette, B.L., Nickson, T.E., Mitsky, T.A., Taylor, M.L., Fuchs, R.L. and Padgett, S.R. (1996) The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J.Nutr.*, 126, 728-740.
- Hebblethwaite, J.F. (1995) The contribution of no-till to sustainable and environmentally beneficial crop production: a global perspective. *Conservation technology information center*, 1-11.
- Hellmich, R.L., Lewis, L.C. and Pleasants, J.M. (2000a) Monarch feeding behavior and Bt pollen exposure risks to monarch in Iowa. *Presented at the USDA Monarch Workshop*, To be published.

- Hellmich, R.L., Lewis, L.C. and Pleasants, J.M. (2000b) Survival of monarch larvae in Bt and non-Bt field corn. *Presented at the USDA Monarch Data Review*, To be published.
- Herrero, M.P. and Johnson, R.R. (1980) High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Science*, 20, 796-780.
- 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.
- Hofmann, C., Luthy, P., Hutter, R. and Pliska, V. (1988a) Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush- border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur J Biochem*, 173, 85-91.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S. and Van Mellaert, H. (1988b) Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7844-8.
- Hough-Goldstein, J., VanGessel, M. and Witmar, J. (2002) Manipulation of weed communities to enhance ground-dwelling predator populations in corn. *Poster presentation at 2002 National meeting for the Entomological Society of America, Ft. Lauderdale, FL*.
- Huber, H.E. and Lüthy, P. (1981) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: composition and activation. *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*, 209-234.
- 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. (1985) Duplication of CaMV 35S Promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, 236, 1299-1302.
- Klausner, A. (1984) Microbial insect control. *Biotechnology*, 408-419.
- Krieg, A. and Langenbruch, G.A. (1981) Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In Burges, H.D. (ed.) *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*, pp. 837-896.
- 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.
- Losey, J.E., Rayor, L.S. and Carter, M.E. (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399, 214.

- MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Sims, S.R., Hunst, P.L., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Perlak, F.J., Fischhoff, D.A. and Fuchs, R.L. (1990) Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 56, 258-66.
- 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.
- Melamed-Madjar, V. and Tam, J. (1980) Safety to nontarget invertebrates of Lepidopteran strains of *Bacillus thuringiensis* and their beta-exotoxins. *Safety of Microbial Insecticides*, 149-168.
- Melin, B.E. and Cozzi, E.M. (1990) Safety to nontarget invertebrates of lepidopteran strains of *Bacillus thuringiensis* and their *Beta exotoxins*. *Safety of microbial insecticides*, 149-167.
- 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 Kernels 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.
- Naylor, M.W. (1992) Acute oral toxicity study of *Btk* HD-1 tryptic core protein in albino mice. *Monsanto Technical Report*, MSL 11985.
- Noteborn, H.P.J.M., Bienenmann-Plaum, M.E., van den Berg, J.H.J., Alink, G.M., Zolla, L., Reynaerts, A., Pensa, M. and Kuiper, H.A. (1995) Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein CRYIA (b) expressed in transgenic tomatoes. *Genetically modified foods*, Wageningen, NL.
- 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.
- Orr, D.R. and Landis, D.A. (1997) Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. *Biological and microbiological control*, 90, 905-909.

- 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. .
- 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.
- Pilcher, C.D., Obrycki, J.J., Rice, M.E. and Lewis, L.C. (1997) Preimaginal development, survival and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis*. *Biological control*, 26, 446-454.
- Puchta, H. (1999) Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. *Genetics*, 152, 1173-1181.
- Reicosky, D.C., Kemper, W.D., Langdale, G.W., Douglas, C.L. and Rassmussen, P.E. (1995) Soil organic matter changes resulting from tillage and biomass production. *J. Soil and Water Cons.*, 50, 253-261.
- 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.*
- Ruiz, P., Novillo, C., Fernandez-Anero, J. and Campos, M. (2001) Soil arthropods in glyphosate tolerant and isogenic maize lines under different soil/weed management practices. *1st World Congress on Conservation Agriculture.*
- 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.
- 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.
- 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.
- Taylor, M.L., Hartnell, G.F., Riordan, S.G., Nemeth, M.A., Karunanandaa, K., George, B. and Astwood, J.D. (2003) Comparison of broiler performance when fed diets containing grain from ROUNDUP READY® (MON 88017), YieldGard x ROUNDUP READY® (MON 810 x MON 88017), non-transgenic control, or commercial corn. *Poultry Science*, 82, 443-453.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L. and Flynn, S.J. (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.*, 13, 109-122.

- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. (1990) Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxins. *Applied and environmental microbiology*, 1378-1385.
- Von Tersch, M.A., S.L. Slatin, C.A. Kulesza, and L.H. English. 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3711-3717.
- Vinson, S.B. (1989) Potential impact of microbial insecticides on beneficial arthropods in the terrestrial environment. *Safety of Microbial Insecticides*, 43-64.
- Warburton, D.B. and Klimstra, W.D. (1984) Wildlife use of no-till and conventionally tilled corn fields. *J. Soil and Water Cons.*, 39, 327-330.
- 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.
- Whiteley, H.R. and Schnepf, H.E. (1986) The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Microbiol.*, 40, 549-76.
- Wolfersberger, M.G., Hofmann, C. and Luthy, P. (1986) Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles insolated from lepidopteran larval midgut. *Bacterial protein toxins*, 237-238.
- Wraight, C.L., Zangerl, A.R., Carroll, M.J. and Berenbaum, M.R. (2000) Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *PNAS*, 97, 7700-7703.
- Yu, L., Berry, R.E. and Croft, B.A. (1997) Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Orbatidae). *Ecotoxicology*, 90, 113-118.
- Zhong, H., Sun, B., Warkentin, D., Zhang, S., Wu, R., Wu, T. and Sticklen, M.B. (1996) The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes. *Plant Physiol.*, 110, 1097-1107.