

**Avis sur le dossier EFSA-GMO-NL-2009-72. Paris, le
03/02/2010**

Comité Scientifique, Jean-Christophe Pagès, Jean-Jacques Leguay, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, Florence Coignard, François-Christophe Coleno, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, et al.

► **To cite this version:**

Comité Scientifique, Jean-Christophe Pagès, Jean-Jacques Leguay, Yves Bertheau, Pascal Boireau, et al.. Avis sur le dossier EFSA-GMO-NL-2009-72. Paris, le 03/02/2010. Haut Conseil des Biotechnologies. 2010, 27 p. hal-02916035

HAL Id: hal-02916035

<https://hal.inrae.fr/hal-02916035>

Submitted on 17 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Comité Scientifique
du
Haut Conseil des Biotechnologies

Paris : le 03/02/2010

AVIS

sur le dossier **EFSA-GMO-NL-2009-72**

Le Comité scientifique (CS) du Haut conseil des biotechnologies (HCB) à été saisi le 23 octobre 2009 par les autorités compétentes françaises (Direction générale de l'alimentation) d'une demande d'avis relative à un dossier de ***demande d'autorisation du maïs génétiquement modifié MON89034xNK603 portant les évènements MON89034 et NK603 conférant une tolérance à l'herbicide glyphosate et une résistance à certains insectes lépidoptères. La demande porte sur l'autorisation de la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale, dans l'Union Européenne de maïs MON89034xNK603.*** Ce dossier est déposé par **Monsanto Europe S.A.**, dans le cadre du règlement 1829/2003 et enregistré à l'AESA (Autorité européenne de sécurité des aliments) sous la référence **EFSA-GMO-NL-2009-72**.

Le dossier de la société Monsanto, transmis par l'AESA, contient de plus une demande de mise en culture de maïs MON89034, aux fins de production de semences.

Le Comité scientifique (CS) du Haut conseil des biotechnologies réuni les 15 et 26 janvier 2010 sous la présidence de Jean-Christophe PAGES, a procédé à l'examen de la partie concernant le maïs MON89034xMON603 du dossier **EFSA-GMO-NL-2009-72**, comme le demande la saisine de la Direction générale de l'alimentation.

Table des matières

1- INTRODUCTION :	3
2- UTILISATION :	4
3- DESCRIPTION DU PRODUIT :	4
4- ÉVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE ANIMALE ET HUMAINE	6
4-2-1 Toxicité des protéines Cry :	7
4-2-2 Toxicité des protéines EPSPS :	7
4-2-3 Alimentarité :	8
5-ÉVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT :	9
5-2-1 Dissémination par les graines :	10
5-2-2 Dispersion par les grains de pollen :	10
5-4-1 Commentaires :	11
5-4-2 Autres interactions :	12
6- PLAN DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION :	13
6-2-1 Plan de surveillance spécifique lié à l'événement MON89034 :	14
6-2-2 Évolution des pratiques culturales liée à l'événement NK603 :	17
7- MESURES PROPRES A ASSURER LA COEXISTENCE DES FILIERES :	17
8- CONCLUSIONS :	18
9- BIBLIOGRAPHIE :	21
ANNEXE 1: DISSEMINATION DE L'ÉVENEMENT TRANSGENIQUE VIA LES FLUX DE GENE :	22
ANNEXE 2: RECOMMANDATIONS EN MATIÈRE DU SUIVI DE LA BIOSURVEILLANCE	26

1- Introduction :

1-1 : informations réglementaires concernant les maïs portant l'évènement NK603 :

L'évènement NK 603 a été évalué par l'Afssa et a fait l'objet de plusieurs avis au titre du règlement (CE) n°258/97 ou de la Directive 2001/18 (avis du 21 février 2003 et 13 janvier 2004). L'évènement NK 603 a également été évalué par l'AESA avec un avis favorable [The EFSA Journal (2003) 9, 1-14] en vue de leur mise sur le marché au titre du règlement (CE) n° 258/97 ainsi qu'au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (The EFSA Journal (2009) 1137, 1-50).

L'évènement de transformation NK 603 est autorisé pour la consommation animale et humaine (Décision de la Commission 2004/643/CE et 2005/448/CE).

Le 12 octobre 2009, le Conseil scientifique du Haut Conseil des Biotechnologies a émis un avis sur le maïs NK603 (EFSA/GMO/NL/2005/22) à des fins de mise en culture.

1-2 : informations réglementaires concernant les maïs portant l'évènement MON89034 :

L'évènement MON89034 a été évalué par l'Afssa et a fait l'objet d'un avis (avis du 20 novembre 2007). Cet évènement a par ailleurs été évalué à plusieurs reprises dans des maïs comportant plusieurs évènements empilés (20 novembre 2007 et 02 juin 2009).

En 2008, suite à une demande d'autorisation qui concernait l'alimentation humaine et animale, l'importation et la transformation, à l'exclusion de la culture, le groupe scientifique OGM de l'AESA a estimé que le maïs MON89034 (référence EFSA-GMO-NL-2007-37), « était aussi sûr que » son équivalent non génétiquement modifié pour, les effets potentiels sur la santé humaine et animale ou sur l'environnement (The EFSA Journal (2008) 909, 1-30).

Dans le cadre d'empilage de gènes, les maïs portant l'évènement MON89034 ont fait l'objet d'un avis favorable de l'AESA et ont été autorisés à l'importation le 30 octobre 2009.

1-3 : informations réglementaires concernant le maïs portant les évènements MON89034xNK603 :

En 2007, le COGEM (Autorité de biosécurité Néerlandaise) émet un avis négatif, assorti de questions, à l'utilisation pour l'alimentation humaine et animale et la transformation des maïs *MON89034xNK603*. Suite aux réponses de la société Monsanto, le COGEM émet un avis positif en 2009 (CGM/091020-01).

Cet OGM a déjà été évalué par l'Afssa dans le cadre du dossier NL/2007/38 (demande d'autorisation en alimentation animale et humaine, mais sans culture dans l'UE). L'Afssa avait rendu un avis défavorable compte tenu des réserves faites sur l'étude de toxicité chez le rat pendant 90 jours avec le maïs MON89034 (avis du 20 novembre 2007, saisine 2007-SA-0299).

En septembre 2009, suite à une demande d'autorisation qui concernait l'alimentation humaine et animale, l'importation et la transformation, à l'exclusion de la culture, le groupe scientifique OGM de l'AESA a estimé que le maïs MON89034xNK603 (référence EFSA-GMO-NL-2007-38), « était aussi sûr que » son équivalent non génétiquement modifié, pour les effets potentiels sur la santé humaine et animale, ou sur l'environnement dans le cadre des utilisations prévues (The EFSA Journal (2009) 7(9), 1320). Ce maïs est en attente d'autorisation dans l'UE.

Le dossier EFSA NL-2009-72 vise à étendre le champ de l'autorisation susmentionnée, à la culture de l'empilage MON89034xNK603.

L'AESA a mandaté l'autorité de biosécurité Néerlandaise (COGEM) pour réaliser une étude de risque environnemental concernant le maïs MON89034xNK603. Dans son avis du 8 décembre 2009 le COGEM indique qu'il ne lui est pas possible de répondre positivement à la **culture** du maïs MON89034xNK603. Le COGEM considère que des données issues d'expériences de laboratoire et d'essais en champs sont nécessaires pour réaliser une étude de risque environnemental correcte.

2- Utilisation :

La demande porte sur la culture, l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de maïs génétiquement modifiés MON89034xNK603.

3- Description du produit :

Le maïs MON89034xNK603 est obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifiées: le maïs MON89034 et le maïs NK603.

Le maïs MON89034 porte deux gènes. L'un codant la protéine Cry1A.105, toxique pour la sésamie (*sesamia nonagrioides*) pour la pyrale (*Ostrinia nubilalis*), le ver du cotonnier (*Spodoptera frugiperda*) et la noctuelle ipsilon (*Agrotis ipsilon*), et l'autre la protéine Cry2Ab2 toxique pour la chenille des épis de maïs (*Helicoverpa zea*).

Le mas NK603 porte les gènes cp4 epsps et cp4 epsps L214P, conférant à la plante la tolérance à un herbicide, le glyphosate.

Aucune modification génétique supplémentaire n'a été introduite dans le maïs MON89034xNK603.

3-1 : Méthode de transformation et description des inserts :

La résistance aux larves de lépidoptères est obtenue par introduction dans le génome de la lignée MON89034 d'un vecteur de transformation binaire PV-ZMIR245 d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant les séquences codantes des gènes *cry1A.105* et *cry2Ab2*, respectivement placées sous le contrôle du promoteur du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CAMV) et du promoteur du virus de la mosaïque de la Scrofulaire. Une séquence TS-SSU-CTP de la petite sous-unité de RUBISCO de maïs est insérée en amont du gène *cry2Ab2*.

La tolérance au glyphosate est obtenue par introduction, par une méthode biolistique, du gène *cp4 epsps* d'*Agrobacterium sp.* dans le génome de la lignée

NK603. La séquence introduite permet l'expression de la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, qui confère la tolérance au glyphosate. Le vecteur de transformation est un plasmide PV-ZMIR245 recombinant. Il porte deux cassettes d'expression du gène *cp4 epsps* d'*Agrobacterium tumefaciens*. Une copie (*cp4epsps*) est sous le contrôle d'un promoteur d'actine du riz, la seconde (*cp4epsps* L214P) est sous le contrôle d'un promoteur du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Une séquence d'adressage chloroplastique *ctp2* d'*Arabidopsis* est insérée en amont de chaque copie. Les régions 3' des deux gènes sont constituées par les séquences 3' de terminaison du gène de la nopaline synthase d'*A. tumefaciens*

3-2 : Description moléculaire et génétique :

La présence et l'intégrité des 2 inserts correspondant aux 2 événements MON89034 et NK603 ont été vérifiées selon la méthode de Southern sur chacune des lignées de maïs ainsi que dans le maïs MON89034xNK603.

Comme l'avis de l'Afssa (saisine n° 2007-SA-0300 du 20 Novembre 2007) l'avait souligné pour le seul événement MON89034, le séquençage d'un fragments d'ADN de 9 317 pb, comportant l'insert et les régions 5' et 3' flanquantes (environ 300 pb de chaque côté), ne permet pas de préciser si l'insertion s'est faite dans une région fonctionnelle ou non fonctionnelle (séquence intronique ou séquence régulatrice) du génome du maïs. Pour lever toute ambiguïté sur cette localisation, l'avis de l'Afssa préconisait une extension du séquençage de 1 000 paires de bases de chaque côté de l'insertion. Une recommandation similaire a été proposée au pétitionnaire dans l'avis formulé par l'Afssa sur le double événement MON89034xNK603 (saisine n° 2007-SA-0299 du 20 Novembre 2007).

Le COGEM (Autorité de biosécurité Néerlandaise) estimait dans son avis (CGM/091020-01) de 2009 que les réponses du pétitionnaire aux questions relatives à la caractérisation moléculaire du MON89034xNK603, qu'il avait jugée insuffisante en 2007 et qui avait motivé de sa part un premier avis négatif, étaient satisfaisantes.

3-3 : Informations sur l'expression des inserts :

La protéine Cry1A est une protéine chimère comportant différents modules provenant de plusieurs protéines Cry1 de *B. thuringiensis*. Le gène *cry1A.105* est en effet un gène construit par recombinaison génétique *in vitro*. Il résulte de l'association de quatre fragments d'ADN déduits de la séquence de plusieurs gènes *cry1*, caractérisés à partir de différentes souches de la bactérie *Bacillus thuringiensis*. Les fragments d'ADN, présidant à la synthèse des trois domaines qui constituent la fraction toxique de la protéine, sont déduits de la séquence des gènes *cry1AC*, *cry1Ab* et *cry1F*. Le dernier fragment du gène, codant la moitié carboxy terminale de la protoxine, est déduit de la séquence du gène *cry1Ac*. Ce gène recombiné code la protéine chimère (Cry1A.105) de 133 kDa.

Les gènes *cry1A.105*, *cry2Ab2* et *cp4 epsps* s'expriment dans les feuilles, racines pollen, graines. Les teneurs moyennes en protéines, mesurées par ELISA sur plusieurs années (2004, 2005 et 2007), sont compilées dans le tableau 1.

Protéines:	Plante entière	Feuilles	Racine	Fourrage	Pollen	Graine
Cry1A.105	M:83 SD:25 R:57-140	M:220 SD:91 R:62-350	M:66 SD:11 R:48-83	M:30 SD:8,7 R:10-44	M:9,6 SD:1,4 R:8-12	M:3,1 SD:0,41 R:2,6-4,3
Cry2Ab2	M:72 SD:41 R:27-200	M:140 SD:48 R:27-200	M:37 SD:18 R:19-70	M:33 SD:10 R:17-53	M:0,66 SD:0,18 R:0,46-1,1	M:1,2 SD:0,18 R:0,92-1,5
CP4 EPSPS	M:210 SD:43 R:150-300	M:240 SD:66 R:100-340	M:78 SD:22 R:52-140	M:74 SD:13 R:54-100	M:390 SD:140 R:180-610	M:8,1 SD:1,6 R:5,8-11

Tableau 1 : Teneurs moyennes en protéines Cry1A.105, Cry2Ab2 et CP4 EPSPS (en microgramme de protéine par gramme de matière sèche) mesurées dans MON89034xNK603. M (moyenne), SD (déviation standard), R (range : écarts maximum observés)

3-4 : Stabilité génétique et phénotypique :

La stabilité des inserts a été vérifiée selon la méthode de Southern. Les différents transgènes sont exprimés dans l'hybride MON89034xNK603 comme des allèles dominants.

3-5 : Conclusions :

Comme une méthode conventionnelle de croisement de deux variétés parentales a été utilisée pour produire le maïs MON89034xNK603, il n'y a pas eu introduction de modifications génétiques supplémentaires.

Les analyses selon la méthode de Southern montrent que l'intégrité de la structure des inserts des maïs MON89034 et NK603 est maintenue dans le maïs MON89034xNK603. L'analyse phénotypique montre que les traits génétiques sont maintenus dans l'hybride. L'expression des protéines Cry1A.105, Cry2Ab2 et CP4 EPSPS, mesurée dans différents tissus (pollen, feuilles, racines, plante entière, graine dans la plante entière et le fourrage), est comparable à celles observée pour les événements simples.

4- Évaluation des risques pour la santé animale et humaine

4-1 : Composition nutritive :

Des essais en champ réalisés en Argentine en 2004-2005 et en Europe en 2007, maïs MON89034xNK603 comparé à des maïs non OGM commerciaux, ont permis de préciser les teneurs en matière sèche (fibres, minéraux, acides aminés, protéines, glucides, raffinose, lipides, vitamines du groupe B, acide phytique, niacine, etc.) des graines et du fourrage. Ces dosages comparatifs (résultats déjà consignés dans l'autorisation de mise sur le marché EFSA-GMO-NL-2007-38 (Section D.7.1), n'ont pas

montré de différences significatives et restent toujours dans les limites des variations observées pour les variétés commerciales.

Conclusion : Au vu de ces données, le maïs MON89034xNK603 présente une valeur nutritive comparable à celle de maïs non OGM conventionnels.

4-2 : Toxicité pour l'animal et pour l'homme :

4-2-1 Toxicité des protéines Cry :

Le mode d'action de ces protéines (notamment les toxines Cry1Ab, Cry1Ac et Cry1F qui rentrent dans la construction de Cry1A.105) a été abondamment étudié (pour revue : Schnepf, E. et coll., 1998, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 775-806 ; Bravo et coll., 2007, *Toxicon*, 49: 423-435). Toutes les données scientifiques actuelles indiquent que ces toxines sont spécifiquement actives contre les larves de certains insectes lépidoptères, et sont en revanche totalement inoffensives pour les arthropodes non cibles, pour les plantes, pour les animaux et pour l'homme.

La protéine Cry2Ab2 possède aussi un spectre d'activité limité à certains insectes lépidoptères (Dankocsik *et al.*, 1990, *Mol. Microbiol.*, **4**: 2087-2094). Le mode d'action de cette toxine a été beaucoup moins étudié que celui des toxines Cry1. Néanmoins, les résultats suggèrent que l'activité nécessite une interaction spécifique de la protéine Cry2Ab2 sur les cellules de l'intestin des larves d'insecte, et conduit à la formation de pores (English *et al.*, 1994, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **24** : 1025-1035). Bien que la séquence peptidique des toxines Cry2 soit très distante de celle des toxines Cry1, les structures tridimensionnelles sont très proches (toutes appartiennent la famille des toxines Cry à trois domaines). Cette homologie de structure suggère un mode d'action comparable: deux domaines de la toxine active sont impliqués dans l'interaction avec un récepteur, et un troisième domaine est responsable de la formation de pores dans les cellules de l'épithélium intestinal des hôtes sensibles (Morse *et al.*, 2001, *Structure* **9**: 409-417).

Ces données suggèrent donc fortement que la toxine Cry2Ab2 est spécifiquement active contre les larves de certains insectes lépidoptères, mais est en revanche sans danger pour, les arthropodes non cibles, les plantes, les animaux et l'homme.

Les études de toxicité aiguë sur souris, de protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 purifiées à partir de culture d'E. Coli, ont montré que des doses de 2 072 mg/kg de Cry1A.105, et de 2 198 mg/kg de Cry2Ab2, administrées en une seule prise, n'entraînaient aucune mortalité ni aucun effets toxiques observables.

4-2-2 Toxicité des protéines EPSPS :

Concernant la toxicité de la protéine CP4 EPSPS d'*Agrobacterium sp.*, il faut souligner que cette protéine conserve de forts pourcentages d'identité et d'homologie avec les protéines homologues d'autres micro-organismes ou des plantes, y compris le maïs. Ces mêmes protéines n'ont jamais été signalées comme étant toxiques en alimentation humaine ou animale.

Les protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P ne présentent pas d'homologie de structure avec des protéines toxiques, ou connues comme responsables d'effets

néfastes chez l'Homme ou chez l'animal (Silvanovich and McClain, 2009a; Silvanovich and McClain, 2009b).

Pour ce qui est de la toxicité par administration unique chez la souris, des doses de CP4 EPSPS de 572 mg/kg, ou de CP4 EPSPS L214P de 817 mg/kg sont sans effet toxique (rapports MSL 18266, 2002; MSL 18267, 2002).

Conclusion : Les protéines Cry1A.105, Cry2Ab2, CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P sont dépourvues de toxicité aiguë sur l'animal.

4-2-3 Alimentarité :

Les études d'alimentarité réalisées chez le poulet, tant pour le NK603 que pour le MON89034, concluent à l'absence d'effets délétères sur la croissance des animaux et les caractéristiques de la carcasse (EFSA, 2003a, 2003b, 2008, 2009a). Il en est de même pour les études d'alimentarité menées durant 48 jours sur le poulet, en appliquant les lignes directrices acceptées (ILSI, 2003). Les maïs témoins utilisés dans ces comparaisons ont un fond génétique proche de celui du MON89034xNK603. À l'issue de l'expérimentation, il n'y avait pas de différences biologiques significatives entre les lots témoins et les lots nourris au maïs MON89034xNK603. Ces études tenaient compte des paramètres suivants, quantité d'aliments ingérés, poids des animaux et caractéristiques de la carcasse. Le taux de mortalité, de l'ordre de 1%, était le même dans toutes ces études d'alimentarité.

Conclusion : Bien que le pétitionnaire affirme que le maïs MON89034xNK603 possède une qualité nutritive équivalente à celle de sa contrepartie non transgénique, le CS du HCB considère que les tests statistiques utilisés n'autorisent pas le pétitionnaire à affirmer l'équivalence du maïs MON89034xNK603 avec sa contrepartie non transgénique ou des maïs conventionnels.

4-3 : Allergénicité :

Concernant le potentiel allergénique des protéines Cry1A.105, Cry2Ab2 et CP4 EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) d'*Agrobacterium sp.* aucun cas d'allergie n'a été rapporté dans la littérature.

Ces protéines n'offrent aucune homologie de séquence lorsqu'on les compare à des protéines allergènes connus. Leur faible résistance à la dénaturation thermique, un chauffage à 65°C de 15 min supprime totalement l'activité enzymatique de CP4 EPSPS. L'hydrolyse de CP4 EPSPS par les protéases digestives (pepsine, chymotrypsine et trypsine dans des conditions similaires à la digestion gastrique et intestinale) est rapide, 1/2-vie de 15 sec. et de 10 min, respectivement, dans des milieux gastriques et intestinaux simulés. Les données de protéolyse ne prédisent pas que quelques peptides suffisamment longs (10 acides aminés) induisent une allergénicité significative (épitopes T). D'autre part, la plupart des épitopes T prédits n'intéressent qu'un nombre restreint d'allèles HLA.

La faible teneur en protéines dans les parties de plante consommée est également un élément pris en compte pour juger de l'absence de risque allergénique.

Conclusion : Le potentiel allergénique des protéines Cry1A.105, Cry2Ab2 et CP4 EPSPS étant faible, celui du maïs MON89034xNK603 l'est également.

4-4 : Plan de surveillance post commercialisation lié à la nutrition animale ou humaine :

Les résultats des études de risque, reportés et analysés ci-dessus, montrent que le maïs MON89034xNK603 possède une composition comparable à celle de sa contrepartie non OGM. Il en est de même pour ses qualités nutritives. De ce fait le CS du HCB ne recommande pas d'effectuer un suivi post-commercialisation spécifique pour la nutrition humaine ou animale.

5-Évaluation des risques pour l'environnement :

5-1 : Persistance et caractère envahissant :

En Europe, il n'y a pas d'hybridation interspécifique possible pour le maïs, du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément. Le maïs est une plante annuelle qui se reproduit par graines et ne présente pas de moyens de reproduction végétative en conditions naturelles. 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. Le maïs est rarement observé hors des champs cultivés et aucune installation de populations férales de maïs n'a été observée actuellement en Europe.

En ce qui concerne les repousses en champs des observations ont été rapportées en Allemagne et en Espagne. En Espagne, des cas de repousses de maïs l'année suivant une culture de maïs ont été mis en évidence de manière quasi-systématique mais très variées en nombre de pieds (Palau-delmas et al. 2009, Transgenic Resarch, 18 : 583-594). L'estimation de la contribution à la pollinisation croisée de ces repousses montre qu'elles pourraient conduire à une présence d'OGM dans la récolte jusqu'à 0,16%. Il est notamment fait mention de la nécessité d'arrachage de repousses dans les essais menés en Espagne.

Des traitements appropriés (arrachages ou traitement par des herbicides différents du glyphosate) permettent de rendre ce risque maîtrisable. En tout état de cause, ces pratiques devraient être utilisées lorsqu'un agriculteur désire revenir à une culture de maïs conventionnel l'année qui suit une culture de l'évènement NK603, dans les zones où les hivers sont doux.

Les caractéristiques phénotypiques et agronomiques du maïs MON89034xNK603 ont été testées en 2004-2005, dans des essais en champs en Argentine et aux Etats-Unis, en 2007 en Allemagne et en Espagne. Ces essais reposent sur des dispositifs expérimentaux de type « bloc complet randomisés » avec 3 répétitions et visent à évaluer si les capacités de survie des plants transgéniques sont différentes de celles des variétés conventionnelles en culture.

Pour cinq essais menés en Argentine, un site diffère significativement des quatre autres pour quatre paramètres (Tableau 13, Partie I, du dossier du pétitionnaire) le pétitionnaire considère la différence non biologiquement significative.

Conclusion : Les études portant sur les caractères agronomiques et phénotypiques ne montrent pas de différences importantes pour les paramètres retenus.

5-2 : Dissémination potentielle du transgène (graines et pollens) :

5-2-1 Dissémination par les graines :

Pour une autorisation de culture, quelles que soient la nature des transgènes de l'empilage, les interactions potentielles des maïs transgéniques avec leur environnement biotique doivent être envisagés suite :

- i) À une dispersion de graines qui interviendrait lors du semis et/ou de la récolte.
- ii) Une germination de ces graines et la survie des repousses.
- iii) Une dispersion du pollen des variétés transgéniques et des repousses vers des variétés commerciales non transgéniques, dispersion efficace de pollen.

En ce qui concerne une dissémination accidentelle lors du transport de grains ou de leur manutention, et qui donnerait lieu à une pousse effective de plants (ce qui représente un risque très faible en raison de l'ensemble des conditions favorables qu'il faudrait réunir), on rappellera que le risque d'échappement génétique est limité chez le maïs du fait de l'absence dans la flore européenne de plantes sexuellement compatibles. Rien n'indique qu'il existe une augmentation de la probabilité d'établissement et de survie des plants de maïs dans l'environnement de semences viables de maïs MON89034 x NK603.

5-2-2 Dispersion par les grains de pollen :

La dissémination des transgènes via le pollen est importante à considérer car elle peut avoir des conséquences importantes sur la faisabilité de la coexistence et sur la compétitivité des filières agricoles (cf. Annexe 1).

5-3 : Transfert de gène horizontal :

Les risques de transfert dans l'environnement pourraient résulter de la dégradation des résidus de culture par les bactéries du sol, ou d'un rejet via les fèces des animaux alimentés avec ces maïs.

La dégradation des résidus végétaux est réalisée par les microorganismes du sol entraînant la destruction à moyen ou long terme de l'ADN de la plante. La probabilité que les gènes cry1A cry1A.105 et cry2Ab2 et cp4 epsps soient transférés à des bactéries du sol est reconnue comme extrêmement faible. Pour des constructions similaires, de tels événements n'ont jamais été mis en évidence en conditions agronomiques. De plus, et du fait que les gènes constituant le transgène sont naturellement présents dans le génome de bactéries indigènes des sols, on peut estimer que même si un ou plusieurs événements de transfert, vers le génome de bactéries du sol, de tout ou partie du transgène, venaient à se réaliser, ceux-ci seraient sans conséquence pour l'équilibre populationnel et fonctionnel de la communauté bactérienne du sol.

5-4 : Interactions potentielles de l'OGM, et des pratiques culturales inhérentes, avec les organismes non-cibles :

L'impact de la culture du maïs MON89034xNK603 sur les invertébrés non-cibles peut avoir trois sources :

- 1) De manière directe via une toxicité des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2.

2) De manière indirecte par l'utilisation d'herbicides. En effet, la suppression des adventices raréfie les habitats qui servent de nourriture et/ou de protection à de nombreux invertébrés non cibles.

3) De manière indirecte - notamment pour les parasitoïdes - via la réduction des populations des insectes ciblées par ces deux protéines.

Ainsi, la culture du MON89034xNK603 aura nécessairement un impact sur l'abondance des hyménoptères parasitoïdes spécialistes de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) et de la sésamie (*Sesamia nonagrioides*), les deux principales espèces ciblées par les toxines Cry1A.105 et Cry2Ab2 produites par ce maïs transgénique. La culture du MON89034xNK603 supprimerait en effet une grande partie des larves de ces deux ravageurs et par conséquent les hôtes obligatoires qu'elles constituent pour les parasitoïdes qui s'en nourrissent exclusivement. Il s'agit donc d'un effet indirect et attendu.

5-4-1 Commentaires :

- Les impacts liés aux sources indirectes 2 et 3 ne sont pas spécifiques à ce maïs mais, comme le souligne le pétitionnaire, inhérents à toutes les techniques chimiques ou mécaniques de désherbage et de lutte contre les ravageurs. L'utilisation du maïs MON89034xNK603 et de son mode de culture, dans les zones de cultures où les ravageurs cibles ne sont pas présents, augmentera l'impact indirect sur la faune non-cible.

- Pour ce qui est de la toxicité directe des deux protéines Cry sur les invertébrés. La protéine Cry1A.105 est très proche des protéines Cry1Ab et Cry1Ac produites par la souche *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. La protéine Cry2Ab2 dérive également de cette souche. Ainsi, le spectre d'action de ces deux toxines reste restreint à l'ordre des lépidoptères. Les protéines Cry1Ab.105 et Cry2Ab2 produites par l'événement MON89034 se fixent sur des récepteurs différents, limitant la possibilité d'effets synergiques ou antagonistes. L'absence d'interaction entre les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 permet a priori d'évaluer les effets de chaque protéine de manière indépendante.

Le dossier fournit une liste d'espèces testées en laboratoire et des données d'études menées en champs. Les résultats confirment que seules les espèces appartenant aux lépidoptères sont sensibles aux doses de Cry1A.105 et Cry2Ab2 produites par le maïs MON89034xNK603. Il faut toutefois noter que :

1) Les espèces d'insectes étudiées en laboratoire ne font pas partie, pour la plupart, de la faune européenne.

2) Aucun essai en champ, comparant les effectifs d'espèces non-cibles, dans des parcelles MON89034xNK603, à ceux présents dans des variétés isogéniques non transgéniques, n'a été entrepris en Europe.

3) Les tests statistiques employés ne sont pas toujours précisés, les p-values ne sont pas toujours indiquées et la puissance des tests statistiques n'est pas mentionnée (étant donné les effectifs, le nombre de répliques et connaissant la variabilité des effectifs des invertébrés non cibles, cette puissance est probablement limitée et certainement < 80% dans la plupart des cas).

4) Pour les expériences menées en laboratoire, la mortalité des groupes contrôles est parfois importante, ce qui limite les conclusions que l'on peut en tirer.

Conclusion : le CS demande que soient effectuées des études complémentaires au laboratoire et en champs, sur des espèces européennes et en utilisant des tests statistiques pertinents. Ceci concerne également les plans de surveillance.

5-4-2 Autres interactions :

La culture du MON89034xNK603 pourrait théoriquement diminuer les populations de lépidoptères non-cibles (e.g. Nymphalidae, Papilionidae, Saturniidae, Lycaenidae et Bombycidae) sensibles aux toxines Cry1A.105 et Cry2Ab2 ou à la combinaison de doses sub-létales de ces deux toxines. L'ingestion accidentelle de grains de pollen par les larves est ici le principal facteur de risque. Le pétitionnaire indique toutefois que le pollen du MON89034xNK603 contient des doses trop faibles pour engendrer une mortalité des larves de papillons non cibles, via une ingestion indirecte de ce pollen lors de la consommation de leur plantes hôtes au voisinage des champs de maïs. Cette affirmation se base sur :

- 1) La concentration des deux toxines Cry dans le pollen.
- 2) La diminution de la concentration de pollen lorsque l'on s'éloigne des champs de maïs.

- 3) Et, surtout, sur le fait que la pyrale du maïs, *O. nubilalis*, est l'espèce de lépidoptère la plus sensible de toutes les espèces testées pour leur sensibilité aux toxines de maïs MON89034xNK603. Sur ce dernier point, le dossier fait référence à trois études techniques diligentées par le pétitionnaire sans donner la liste des espèces. Cette liste permettrait d'apprécier le nombre d'espèces testées, et de voir si les principales espèces européennes a priori concernées par ce risque, ont été considérées lors de ces tests de sensibilité aux toxines Cry1A.105 et Cry2Ab2.

Conclusion : Le CS demande que le pétitionnaire fournisse la liste des espèces pour lesquelles ces tests ont été effectués.

La culture du maïs MON89034xNK603 pourrait avoir des conséquences négatives sur les lépidoptères phytophages non cibles (lépidoptères phytophages opportunistes ou pas systématiquement nuisibles) plus importantes que dans le cas d'une absence de tout traitement contre les ravageurs cibles. Ces conséquences négatives seront toutefois beaucoup plus limitées sur l'ensemble des arthropodes non cibles que celles qui sont liées à l'emploi de traitements insecticides. Cette considération est à mettre en regard des surfaces traitées avec des insecticides. Ainsi, 30% des 3 000 000 ha de champs de maïs conventionnels sont actuellement traités aux insecticides en France (selon les dires de l'Expert national Grandes cultures en France). Il s'agit essentiellement de la fraction destinée à la production de grain qui représente la moitié de la surface cultivée en maïs en France.

Enfin, le CS du HCB rappelle que d'une façon générale, il est particulièrement difficile de prédire l'influence des variations d'abondance – qu'elles soient liées au MON89034xNK603, ou non – des populations sur le devenir à moyen et long terme des espèces non-cibles. Il est encore plus difficile de prédire l'effet de ces variations de densités sur les autres composantes des agrosystèmes. Il est tout aussi difficile de prédire la réversibilité ou non d'éventuels changements que pourrait entraîner la culture du MON89034xNK603 sur les invertébrés non-cibles et ses éventuels répercussions sur l'agrosystème dans son ensemble. Ces incertitudes et l'impossibilité de conclure à l'absence totale de risque concernent de manière plus

générale les variétés sélectionnées pour leur résistance aux insectes phytoravageurs.

5-5 : Effets sur les processus biogéochimiques :

Comme les pratiques culturales appliquées aux parcelles de MON89034xNK603 seront différentes de celles appliquées aux parcelles de maïs conventionnels, il convient que les conséquences de l'utilisation de glyphosate sur les processus biogéochimiques du sol soient évaluées de manière spécifique.

6- Plan de surveillance post-commercialisation :

Dans le cadre de la réglementation européenne, règlement (CE) 1829/03 et Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil, du 22 Septembre 2003 et du 12 mars 2001, relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement :

- un plan de surveillance spécifique doit être mis en place pour confirmer ou non d'éventuelles hypothèses sur des effets négatifs de la plante génétiquement modifiée dans le cadre de son utilisation, ainsi que de l'évaluation du risque environnemental. Le plan de surveillance spécifique prévu est destiné à mettre en évidence les changements prévisibles.
- un plan de surveillance générale doit permettre d'observer d'éventuels effets non intentionnels non anticipés sur la santé humaine ou l'environnement. Le plan de surveillance générale vise à mettre en évidence les changements non prévus dans le plan de surveillance spécifique.

Dans le dossier présenté, le pétitionnaire propose la mise en œuvre de deux plans de surveillance : le premier concerne une surveillance générale basée sur les observations de terrain effectuées par les utilisateurs et observateurs agricoles, et le second une surveillance spécifique liée à gestion de la résistance des insectes pendant la culture en champ.

6-1 : Plan de surveillance général :

Basé sur l'expérience acquise lors de la mise en culture du maïs MON810, le plan de surveillance proposé par le pétitionnaire utilise en premier lieu un questionnaire distribué aux utilisateurs agricoles. Ce questionnaire porte sur les observations que pourraient faire ces utilisateurs sur les phénomènes de terrain (pédologique et climatique), le suivi des écosystèmes et des espèces présentes habituellement sur les parcelles, les pratiques culturales et précédents etc... Ces utilisateurs sont en effet des observateurs privilégiés pour comparer l'évolution des parcelles transgéniques et conventionnelles qu'ils cultivent.

Le questionnaire porte sur quatre points :

- Localisation et taille des champs cultivés avec MON89034xNK603.
- Pratiques agricoles mises en œuvre.

- Observations sur le MON89034xNK603 : caractéristique, maladies, adventices, ravageurs.
- Suivi des performances de l'élevage si le maïs nourrit du bétail.

Selon les résultats de ces observations, il est prévu de mettre en œuvre si nécessaire un plan de surveillance additionnel, plus spécifique selon un cahier des charges précis portant sur un des points abordés par la surveillance générale qu'il conviendrait de surveiller de manière particulière. Le plan de surveillance prend en compte les zones cultivées avec l'OGM MON89034xNK603 pendant la durée de l'autorisation.

Une deuxième approche de cette surveillance générale impliquerait, sur la base des résultats obtenus avec les plans de surveillance du MON 810 en Europe, des réseaux de biosurveillance privés (exemple: en Allemagne, ref : Monsanto Europe SA, rapport MON810, 2009, appendice 9) ou publics (réseaux de biovigilance en Suisse et France, ref : Bühler C., 2006, *J. Verbr. Lebensm.* 1,37-41 ; Delos M. et al, 2006, *J. Verbr. Lebensm.* 1, 30-36 & Delos M. et al., 2007, *J. Verbr. Lebensm.* 2, 16-24).

6-2 : Plan de surveillance spécifique :

6-2-1 Plan de surveillance spécifique lié à l'événement MON89034 :

Le PGRI proposé repose d'une part sur les résultats acquis au cours des campagnes effectuées avec le MON 810 et le dialogue qui s'est instauré notamment à ce propos entre le pétitionnaire et les Autorités des Etats membres de l'UE, et d'autre part sur les exigences notamment des Autorités américaine (EPA : Environmental Protection Agency) et canadiennes (ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments) en matière de PGRI sur l'événement MON89034.

Le PGRI porte sur les points suivants :

- Taille et localisation des zones refuges afin de ménager des possibilités de croisements entre insectes de la zone PSGM qui pourraient développer des résistances et ceux de la zone refuge par définition sensibles aux protéines transgéniques.
- Surveillance d'une ligne de base de résistance des insectes aux protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2.
- Mise en place d'un plan de gestion de crise en cas de confirmation de la survenue de résistance.
- Programme d'éducation des agriculteurs sur la nécessité de planter des zones refuges pour préserver l'efficacité de la technologie Bt.

Le maïs MON89034xNK603 contenant deux événements transgéniques distincts dont la réunion dans une même plante s'est faite par croisement classique, le CS du HCB considère que les plans de surveillance spécifiques doivent porter sur les deux événements. La finalité de ces deux événements, résistance aux insectes ou tolérance à un herbicide n'étant pas de même nature, le CS considérera chacun des événements de manière distincte dans leurs incidences environnementales.

6-2-1-1 Zones refuges : taille et localisation :

La préconisation de zones refuges pour une gestion du risque de résistance des insectes est liée à l'événement MON89034.

L'examen du dossier du MON89034 par les autorités canadiennes a donné lieu à l'exigence d'établir un plan détaillé et rigoureux en ce qui concerne la gestion de la résistance des insectes (GRI) ; ce qui fut fait par le pétitionnaire courant 2009. Ce plan de GRI figure dans le dossier du pétitionnaire et a été adapté aux conditions européennes, sans toutefois prendre en compte pleinement les conditions spécifiques de l'entomofaune européenne.

En effet l'ACIA (Agence canadienne d'inspection des aliments) s'est basée sur la constatation que les lépidoptères ont une grande capacité d'acquisition de résistance aux insecticides chimiques classiques et qu'il est dès lors prévisible qu'ils puissent acquérir une résistance aux propriétés insecticides du maïs MON89034. Pour réduire au minimum le risque d'apparition, chez les insectes, d'une résistance aux plantes GM, l'une des stratégies du plan de GRI consiste à établir, à l'intérieur ou en périphérie du champ où le maïs MON 89034 sera cultivé, un refuge de maïs sensible à la pyrale du maïs. Ainsi, si des insectes devaient acquérir une résistance aux protéines insecticides, ils pourraient se reproduire avec des insectes sensibles du refuge, ce qui contribuerait à réduire la fréquence des gènes de résistance au sein de la population d'insectes, le déterminisme de la résistance étant récessifs (Tabashnik et al.2009).

Constatant le fait que les protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 contrôlent chacune plus de 95% des larves de pyrale, mais que leurs cibles biochimiques sont différentes (leurs structures primaires sont différentes, elles ne partagent seulement 14% de la séquence d'acides aminés et se lient différemment aux protéines de l'intestin moyen de la larve de pyrale du maïs), la probabilité de résistance croisée entre les deux protéines est très faible. Considérant le haut niveau d'un double contrôle (Cry1A.105 et Cry2Ab2) de la pyrale produite par le maïs MON89034 et de l'absence de résistance croisée entre les deux protéines, la probabilité que la pyrale du maïs développe une résistance au maïs MON89034 est significativement réduite en comparaison à une lignée de maïs qui exprimerait une seule protéine Bt comme le MON810.

C'est pourquoi il a été admis qu'en Amérique du Nord, la culture du maïs MON 89034 puisse s'effectuer avec une zone refuge réduite. L'ACIA constate que « l'exigence normale pour une culture de maïs exprimant une protéine Bt, est que 20% de la superficie totaleensemencée en maïs doit être réservée pour le refuge. En se basant sur des modèles mathématiques conservateurs, une zone refuge de 5% serait suffisante pour préserver la durabilité du maïs MON89034 ». L'ACIA estime également que « des pratiques de saine gestion ainsi que des stratégies de GRI judicieuses peuvent considérablement limiter et retarder l'apparition de populations de pyrales du maïs résistantes aux protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2. Ces dernières doivent cependant faire l'objet d'une surveillance régulière et continue pour que soient détectés les cas de résistance».

Ainsi, au Canada, la superficie de 5% pour les zones refuges s'accompagne des exigences suivantes que le pétitionnaire se doit de mettre en œuvre. Il comporte les éléments essentiels suivants :

- Aménagement de refuges structurés afin d'assurer la présence de populations de lépidoptères ravageurs du maïs qui n'ont pas été exposées aux protéines

Cry1A.105 et Cry2Ab2 et qui peuvent s'accoupler avec les insectes résistants qui pourraient émerger de la culture de maïs Bt .

- Détection précoce des populations de lépidoptères ravageurs du maïs résistantes aux protéines insecticides exprimées par le maïs par une surveillance étroite visant à détecter la présence éventuelle de telles populations dans les champs de maïs résistant à la pyrale du maïs ou dans les environs. À cette fin, il faudra élaborer des méthodes pour l'observation visuelle des champs, les analyses biologiques en laboratoire, l'échéancier des rapports, l'éducation des agriculteurs et mesures d'atténuation en cas d'apparition de résistance.
- Mise au point d'outils de formation à destination de tous les producteurs et conseillers agricoles. Ceux-ci comprendront des informations sur le rendement des produits, la gestion de la résistance, les méthodes et les calendriers de surveillance, les protocoles de détection des sujets résistants, la marche à suivre pour communiquer avec le pétitionnaire, ainsi que des indications sur les stratégies à adopter en cas de dégâts anormalement élevés imputables à la pyrale du maïs.
- Préparation d'une procédure d'intervention pour les cas où serait signalé au pétitionnaire de possibles résistances. Cette procédure comprendra, si les circonstances l'exigent, le prélèvement de tissus végétaux et d'insectes nuisibles, le recours à des épreuves biologiques permettant d'évaluer les cas présumés de résistance aux protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 ainsi que le protocole d'application immédiate des mesures de lutte contre les sujets résistants.
- Signalement immédiat aux Autorités compétentes de la détection de population de pyrale du maïs dont la résistance est confirmée et lui communication du plan d'intervention établi.

Dans le plan européen de GRI, il est prévu d'établir des zones refuges d'une superficie de 5% des parcelles cultivées comme au Canada et aux USA. L'hétérogénéité du terroir européen et la taille du parcellaire en particulier en Europe de l'Ouest, constituent un élément positif additionnel contre le développement de résistance chez les insectes. Selon le pétitionnaire, des simulations basées sur des modélisations ont montré que le problème de la résistance aux deux protéines Cry1A 105 et Cry2Ab2 ne se poserait pas avant 30 ans. Il est prévu dans le PRGI que ces zones refuges soient créées à une distance de moins de 750 m de la culture de maïs Bt exprimant ces toxines. De plus, il est souligné qu'on ne doit pas utiliser des biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* contenant les protéines Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Ab2 et Cry1F dans les zones refuges.

6-2-1-2 Surveillance de l'évolution de la ligne de base de sensibilité des insectes aux protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 :

Le plan de surveillance spécifique proposé par le pétitionnaire est le suivant :

- élaboration d'une ligne de base de sensibilité et sa variabilité des insectes pyrale et sésamie aux protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 basée sur les déterminations des LC50 et MIC (concentration inhibition des mues). Les insectes seront prélevés sur 3 sites par région étudiée à raison de 300 insectes par site.

- étude de la fréquence des allèles de résistance (entre 1-5%) chez pyrale (étudiée en Allemagne) et sésamie (étudiée en Espagne) par des laboratoires indépendants, le rassemblement des collections d'insectes étant fait par le pétitionnaire.
- Si une résistance est suspectée, un test de LC50 sera fait (avec les protéines), ainsi qu'un test en laboratoire en conditions contrôlées de mise en culture de plants de maïs GM avec les populations dont on étudie le niveau de résistance.
- Dans le cas d'une résistance avérée, un plan d'information des agriculteurs et techniciens agricoles sera diligenté et des insectes capturés pour des études complémentaires. Les études sur F2 seront réalisées. L'arrêt des ventes du maïs est prévu jusqu'à ce que les Autorités de l'Etat membre ait mis en place un plan de biosurveillance.
- Enfin un programme d'éducation au moyen de vidéos, guides techniques, lettres d'information, lignes téléphoniques d'urgence, sera développé.

Par ailleurs, le Guide américain (US Technology Use Guide) élaboré par le pétitionnaire sera adapté à la spécificité de chaque pays européen.

6-2-2 Évolution des pratiques culturales liée à l'événement NK603 :

L'évaluation du risque a mis en évidence des effets indirects liés au changement de pratiques agricoles, et en particulier le régime herbicide avec l'utilisation du glyphosate : l'émergence d'adventices tolérantes au glyphosate d'une part, une réduction potentielle de la biodiversité (flore et faune) d'autre part.

Des mesures adaptées de gestion du glyphosate (limitation de la fréquence des applications, rotations des cultures, etc.) permettent de minimiser ces impacts. Elles devraient être définies et adaptées aux conditions régionales lors de l'examen de l'homologation de l'usage du glyphosate sur le maïs.

Le plan de surveillance doit permettre de vérifier que ces mesures de gestion sont bien de nature à minimiser les risques identifiés. Ce plan de surveillance, comme le recommandent les autorités compétentes, doit être spécifique. Il est fonction de la diversité des environnements et des systèmes agricoles en Europe et du fait que l'homologation de l'herbicide sera discutée à l'échelle nationale.

7- Mesures propres à assurer la coexistence des filières :

Les méthodes de détection des événements de transformation simples ont été validées par le CRL-GMFF en ce qui concerne leurs performances.

Par contre le matériel de référence certifié n'est pas encore disponible.

L'utilisation de l'unité ADN (recommandation EC 787/2004) permettra de quantifier cet OGM à empilage de gène. Par contre, si cet OGM n'était pas autorisé, les coûts de détection seraient accrus en raison du recours nécessaire aux techniques d'analyse avec sous-échantillonnage.

La mise en place de la coexistence au champ pour le MON89034xNK603 nécessitera d'adopter des mesures spécifiques qui prennent en compte les caractéristiques locales des paysages agricoles. Ces mesures pourront s'appuyer sur des distances d'isolement ou des décalages de floraison (Beckmann et al., 2006) ou la constitution d'îlots homogènes (Coléno et al., 2009).

En outre les agriculteurs devront prendre des précautions pour l'utilisation du matériel agricole s'il est en contact avec des parcelles conventionnelles ou « bio » afin de minimiser les risques de mélanges (Jank et al., 2006).

Les travaux du groupe de travail co-existence du Haut Conseil des Biotechnologies permettront de préciser ultérieurement ces mesures.

8- Conclusions :

En s'appuyant sur cette analyse, le Comité Scientifique (CS) du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) n'est pas en mesure de fournir un avis positif pour la culture du Maïs MON89034xNK603.

Concernant la mise en culture du maïs MON89034xNK603, le CS demande que des résultats supplémentaires obtenus en laboratoire et en champ soient fournis par le pétitionnaire afin qu'il puisse faire une étude de risque sérieuse dans le domaine de la santé et de l'environnement.

Certaines des raisons qui motivent l'avis du CS sont rappelées ci dessous.

Aspects réglementaires

Le maïs MON89034xNK603 est constitué de deux événements de transformation pour lesquels un seul, le NK603, fait l'objet d'une demande d'autorisation de mise en culture en Europe. Le CS note que dans ces conditions un maïs ne portant que l'événement MON89034 ne devrait pas faire l'objet de culture en champ.

Avis sur les analyses moléculaire

En 2007, le COGEM (Autorité de biosécurité Néerlandaise) émet un avis négatif, assorti de questions, à l'utilisation pour l'alimentation humaine et animale et la transformation des maïs MON89034xNK603. Suite aux réponses de la société Monsanto, le COGEM émet un avis positif en 2009 (CGM/091020-01).

Le CS du HCB, n'ayant pas vu les réponses du pétitionnaire faites au COGEM, il ne peut pas déterminer si la caractérisation moléculaire de l'événement MON89034 suit les recommandations requises pour une analyse de risque environnemental.

Avis sur le traitement statistique des données

Le CS du HCB approuve les nouvelles règles d'analyse statistique proposées par l'AESA (The EFSA Journal 2009; 1250: 1-66) du 21 avril 2009, qui recommandent la mise en oeuvre de procédures statistiques adaptées : tests d'équivalence, analyse de puissance, utilisation de modèles mixtes applicables aux différents volets d'un dossier:

Le CS demande que ces règles d'analyse statistique soient appliquées lors de l'examen des dossiers soumis à autorisation et que pour tout dossier proposé par un pétitionnaire, les résultats bruts des expériences soient fournis sous un format

électronique qui permette l'utilisation directe des données pour la réalisation de tests statistiques complémentaires.

Avis sur l'évaluation des risques pour la santé animale et humaine

En ce qui concerne les tests de croissance effectués sur les poulets, le pétitionnaire n'utilisant pas les tests statistiques adaptés, n'est pas autorisé à conclure à l'équivalence alimentaire du maïs MON89034xNK603 avec sa contrepartie non transgénique ou les maïs conventionnels (paragraphe 4-2-3 de ce document).

Avis sur l'évaluation des risques pour l'environnement

Le pétitionnaire s'appuie sur trois études techniques diligentées par ces soins pour étudier l'effet des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 sur les espèces d'invertébrés non cibles. Le CS demande que ces trois dossiers techniques soient communiqués afin de déterminer sur quelles espèces d'invertébrés a été testé la toxicité des protéines Cry1A.105 et Cry2Ab2 et voir si cette liste inclus des espèces européenne.

A défaut, le CS demande, que sur les espèces d'invertébrés non cibles, soient effectuées des études complémentaires au laboratoire et en champ. Ces expérimentations seront menées sur des espèces européennes en utilisant les tests statistiques appropriés incluant l'analyse de puissance.

Avis concernant le plan de surveillance

Le Comité Scientifique du Haut Conseil des Biotechnologies considère, pour l'événement de tolérance à l'herbicide glyphosate, que les conséquences des pratiques culturales générées par les cultures de maïs tolérant au glyphosate, et notamment les conditions d'usage de cet herbicide, sont à surveiller dans le cadre général de la loi d'orientation agricole n° 99-574 du 9 juillet 1999, consolidée au 06 janvier 2006 et de l'avis NOR:AGRG0402105V du JO 235 du 8 octobre 2004, texte numéro 83 et de la loi n° 2008-595 du 25 juin 2008.

Concernant l'événement NK603, le CS du HCB recommande de mettre en place en sus du plan de surveillance proposé par le pétitionnaire.

- un plan de surveillance générale pour surveiller les effets inattendus comprenant, entre autres, l'émergence d'adventices tolérantes au glyphosate et la réduction potentielle de la biodiversité (flore et faune du sol).
- un plan de surveillance spécifique contrôlant la dispersion, volontaire ou involontaire, du transgène hors des zones autorisées à la culture. Ce plan doit permettre de garantir la durabilité des différentes filières de production (production de semences, filières conventionnelle, filières «sans OGM »).

Il est également demandé que ces plans de surveillance s'étendent au delà de la durée d'autorisation d'importation, transformation et mise en culture.

Concernant l'événement MON89034, le CS du HCB constate une nette amélioration du plan de surveillance post commercialisation (PSCP) qui reprend les acquis du dossier du MON810 (Monsanto rapport 2009) et les observations de pays tiers.

Le CS du HCB souligne la pertinence du plan canadien de gestion du risque de résistance et recommande que ses lignes directrices soient adoptées au niveau européen, les zones refuges de 5% se révélant dans les études prospectives suffisantes pour limiter les apparitions de résistance.

Sur le plan méthodologique, pour l'analyse des données recueillies le traitement statistiques devra suivre les nouvelles règles proposées par l'AESA, et la distribution du questionnaire pour la surveillance post-commercialisation devra se référer à la décision de la commission EC (2009) 7680 du 13 octobre 2009.

Les actions relatives à la formation des utilisateurs et l'information doivent être encouragées et poursuivies, de même que la veille scientifique. La base des données bibliographiques et leurs analyses non confidentielles élaborées par les pétitionnaires devront pouvoir être largement accessibles. Plus généralement, il conviendrait que le pétitionnaire accompagne les résultats de ses plans de surveillance d'annexes plus explicites, communiquant les textes des éléments bibliographiques non facilement accessibles ainsi que des fiches plus détaillées sur le suivi des études sur la biodiversité quand elles ne sont pas publiées dans des revues internationales ou techniques.

Le CS du HCB remarque que l'objectif du questionnaire est de tester si le taux de réponses mentionnant des effets adverses liés à la culture des OGM est inférieur à 5% (H_0) ou supérieur à 5% (H_1). Dans le cas où l'hypothèse nulle H_0 n'est pas rejetée - et donc que l'on accepte que ce taux est inférieur à 5% - on ne peut pas pour autant en conclure qu'il n'y a pas d'effets adverses statistiquement significatifs. Il faudrait par ailleurs discuter du choix d'un seuil à 5% puisque qu'il existe des inconnues sur les variations naturelles (manque de retour d'expériences ou d'information sur une période suffisante) et qu'on ne sait pas à partir de quel seuil (% de modification) par rapport à une situation antérieure, une intervention serait pertinente.

Dans ces conditions, la seule information statistique que l'on peut déduire du traitement de ces questionnaires est un intervalle de confiance très précis (environ +/- 1%) du taux de réponses mentionnant des effets adverses liés à la culture des OGM.

Pour ces raisons, le CS du HCB recommande que les autorités compétentes se préoccupent d'une évaluation des risques sur l'environnement même si le taux de réponses mentionnant des effets adverses liés à la culture des OGM est inférieur à 5%. Il recommande également que ce questionnaire prenne en compte les deux événements transgéniques considérés.

Enfin, le CS du HCB rappelle au pétitionnaire qu'il est de son devoir, au cours de la période couverte par l'autorisation accordée, d'apporter son concours pour la biosurveillance liée à l'utilisation des biotechnologies qu'il commercialise, quand celui-ci sera sollicité par le Comité de Surveillance Biologique du Territoire (CBST) (Décret n° 2008-1282 du 8 décembre 2008 portant création du comité de surveillance biologique du territoire mentionné à l'article L. 251-1 du code rural).

Ceci concerne en particulier une surveillance post-commercialisation qui, dans son approche globale, dépasserait la seule gestion de l'événement examiné. Cette participation devra faire l'objet d'un accord entre les parties sur les prises en charge

respectives. Il conviendrait au vu de la récente multiplication des demandes d'autorisation de la mise en culture qu'une base de donnée centralisée accessible aux pétitionnaires et au public soit mise en ligne avant l'autorisation des différents OGM. Cette base de données avec SIG (Système d'information Géographique) devrait rassembler l'ensemble des données concernant les différents OGM autorisés à la culture dans l'UE.

Il appartient au CSTB de proposer un réseau de biosurveillance du territoire et de définir son champ d'action. Des recommandations générales concernant la biosurveillance des biotechnologies sont portées dans l'annexe II de cet avis du CS du HCB. On insistera sur le fait que la biosurveillance doit porter sur les conséquences de l'emploi de la technologie Bt mais également toute technologie de contrôle des lépidoptères foreurs du maïs qui dans ses itinéraires phytopharmaceutiques utilise des formulations à base de *Bacillus thuringiensis*.

En matière de surveillance générale de la biodiversité des insectes non-cibles sur et autour de parcelles OGM, le CS du HCB souligne que la seule possibilité de mettre en évidence une augmentation ou une réduction significative des populations des invertébrés non-cibles est la mise en place d'un suivi sur plusieurs années de ces invertébrés dans le cadre d'un plan de biosurveillance générale. Ce suivi devra s'attacher à choisir des espèces pertinentes à suivre, à définir l'échelle d'observation. La difficulté sera de relier les variations d'abondance aux différentes variables explicatives (MON89034xNK603, MON810, autres maïs Bt, pratiques culturales, surfaces relatives des différentes cultures, conditions environnementales).

Par ailleurs, les résultats du plan GRI devraient d'être communiqués annuellement au Comité de surveillance biologique du territoire (CSBT) et au Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) par un rapport écrit. Une présentation orale devant une commission mixte CSBT/HCB serait appréciée.

9- Bibliographie :

Bravo et al., 2007, *Toxicon*, 49: 423-435

Beckmann, V., Soregaroli, C., Wesseler, J., 2006. Coexistence rules and regulations in the European Union. *American Journal of Agricultural Economics*. 88, 1193-1199.

Coléno F.C Angevin F. Lécroart B. (2009) : Consequences of GM and non GM segregation strategies on GM localisation in landscape and cross pollination risk management. *Agricultural Systems* Vol 101, n°1-2, pp 49-56.

Dankocsik et al., 1990, *Mol. Microbiol.*, 4: 2087-2094

English et al., 1994, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24 : 1025-1035

Jank, B., Rath, J., Gaugitsch, H., 2006. Co-existence of agricultural production systems. *Trends in Biotechnology*, 24, 198-200.

Morse et al., 2001, *Structure* 9: 409-417

MSL 18266. (2002) An acute oral toxicity study in mice with the *E. coli*-produced pp-CP4 EPSPS protein, *Monsanto Technical Report*, **MSL 18266**

MSL 18267. (2002) An acute oral toxicity study in mice with the *E. coli*-produced pp-CP4 EPSPS L214P protein, *Monsanto Technical Report*, **MSL 18267**

Palau-delmas et al. 2009, *Transgenic Research*, 18 : 583-594

Silvanovich, A. and McClain, J. S. (2009a) Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS L214P sequence using the AD8 and TOXIN6 databases *Monsanto Technical Report*, **RAR-09-079**

Silvanovich, A. and McClain, J. S. (2009b) Bioinformatics evaluation of CP4 EPSPS using the TOXIN6 database *Monsanto Technical Report*, **RAR-09-080**

Schnepf, E. et al., 1998, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 775-806

Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J. and Carriere Y. 2009. Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops: Definition, Theory, and Data. *J. Econ. Entomol.* 102(6): 2011-2025

ooo

Annexe 1: Dissémination de l'évènement transgénique via les flux de gène :

l'AESA envisage dans ses avis les conséquences sur l'environnement liés au flux de gènes en terme de « fitness » des hybrides, de descendance des « backcross » ainsi que d'exposition aux organismes non-cible alors que les conséquences des flux de pollen en terme de coexistence restent hors de son analyse. Le HCB considère que les éléments relatifs à la dissémination des gènes par le pollen via le vent, les cours d'eau ou les pollinisateurs sont néanmoins importants à considérer per se par les pouvoirs publics car cette dissémination peut avoir des conséquences importantes sur la faisabilité de la coexistence et sur la compétitivité des filières agricoles.

Sont aussi mentionnés le cas des flux vers les variétés populations et des résultats sur la fécondation croisée issus de travaux expérimentaux.

- Dispersion des gènes via le pollen

Le maïs est une plante essentiellement allogame et son pollen est disséminé de plante à plante par contact physique et par le vent (Bateman, 1947; Treu and Emberlin, 2000). Les fleurs mâles (panicules) et femelles (soies) sont séparées sur la plante et la plupart des variétés actuelles expriment de la protandrie (fleur mâle démarrant sa floraison avant la fleur femelle) ce qui favorise l'allogamie. Le pollen est relativement lourd et la dispersion décroît rapidement avec la distance (Bateman, 1947a; b; Raynor et al., 1972). Toutefois, la dispersion à longue distance intervient également (Bannert et Stamp, 2007 ; Sanvido, 2008). Une partie du pollen de maïs est emportée par les mouvements convectifs en altitude (Delage et al. 2007) et la redéposition peut se faire à très longue distance et donner lieu à une pollinisation efficace (pollen encore viable) à plusieurs km (Brunet, 2008). La figure 1 illustre les trois échelles de dispersion spatiale, la dispersion à longue distance formant un « bruit de fond » de dispersion.

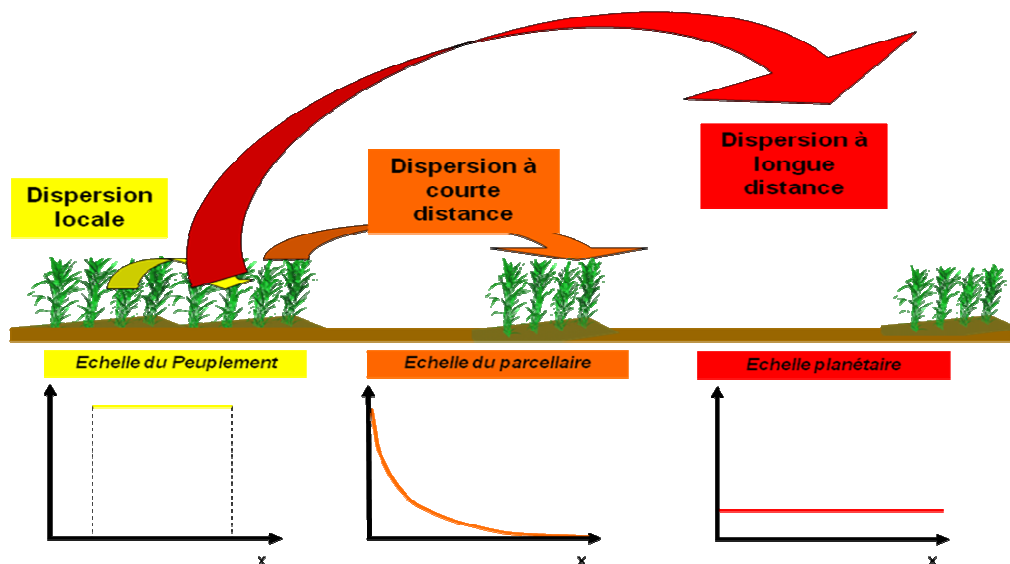


Figure 1. Echelles de dispersion du pollen de maïs (Source : Y. Brunet, INRA)
 Une dispersion de pollen de maïs est aussi possible via les cours d'eau (Rosi-Marshall et al. 2007).

La pollinisation du maïs est anémophile. Cependant, des abeilles peuvent dans des situations particulières ramener du pollen à la ruche. Ainsi, des présences de pollen OGM ont été trouvés dans un rucher à 1500 m d'un champ transgénique (donnée de la chambre d'agriculture d'Agen en 2006).

La taille relative des champs émetteurs et donneurs, la distance, la synchronisation des floraisons et les caractéristiques du vent sont les facteurs principaux expliquant les niveaux de pollinisation croisée entre champs de maïs (Bassetti and Westgate, 1994; Bateman, 1947a & b; Boyat et al., 1984; Du Plessis and Dijkhuis, 1967; Hall et al., 1981; Klein et al., 2006; Lonquist and Jugenheimer, 1943).

La production de semences de maïs est particulièrement sensible à la pollinisation croisée (Messéan et al., 2006). La plupart des variétés de maïs cultivées sont des hybrides et elles sont produites dans des champs où la quantité de pollen émise est sensiblement plus faible que dans des productions de graines. En premier lieu, le nombre de plantes émettant du pollen est limité car les plantes du parent femelle de l'hybride sont castrées ou mâles stériles (en moyenne, seule une plante sur trois dans un champ de production de semences émet du pollen). En second lieu, les plantes femelles sont séparées des plantes mâles (4 à 5 rangs femelles pour 2 rangs mâles par exemple) ce qui rend les plantes femelles plus sensibles au pollen extérieur. Enfin, les lignées parentales d'un hybride produisent moins de pollen (0,5 à 3 millions de grains par plante ; Fonseca et al., 2003) que l'hybride commercialisé (9.6 to 11.3 millions ; Uribelarrea et al., 2002).

- Dispersion des gènes : le cas des variétés populations

Pour le maïs, il n'existe pas d'espèces sexuellement compatibles implantées en Europe, ce qui exclut les croisements interspécifiques. Le cas des variétés populations doit lui être envisagé. Des variétés populations sont utilisées pour des usages spécifiques (comme la production de polenta en Italie) ou pour l'agriculture biologique. Dans leur étude menée en Italie, Bitocchi et al. (2009) montrent que le taux d'introggression depuis des hybrides cultivés varie selon les conditions de

culture. Des expérimentations sont actuellement en cours en France pour évaluer les taux de pollinisation croisée entre hybrides cultivés et variétés populations utilisées en agriculture biologique. Les graines de ces variétés populations étant réutilisées comme semence, les résultats de ces études devraient permettre d'estimer l'effet cumulé de ces flux sur plusieurs années.

- Résultats expérimentaux sur la pollinisation croisée

Les études de flux de gènes en Europe ont porté essentiellement sur la pollinisation croisée à courte et longue distance, en utilisant comme donneur des maïs OGM ou des maïs spécifiques portant un marqueur de couleur (blanc ou bleu). Dans le cadre du projet européen SIGMEA (projet FP6, 2004-2007), vingt jeux de données de flux de champ de maïs à champ de maïs ont été collectés et analysés. L'ensemble des données permet une comparaison entre échelles spatiales ou sous différents climats (voir figure 2).

Ces études qui ont fait l'objet de synthèse lors de la troisième conférence internationale sur la coexistence (Hüsken et al., 2007; Messéan et Angevin, 2007), ont permis de tirer les enseignements suivants:

- (a) Une forte décroissance de la dispersion de pollen avec la distance (ordre de grandeur de 1 pour 1000 à une distance de 100m de la bordure du champ donneur) ;
- (b) Une très grande variabilité des taux en fonction des conditions environnementales et expérimentales ;
- (c) Le maintien d'une pollinisation croisée à longue distance à des taux faibles mais non nuls ;
- (d) Un effet sensible de la densité d'OGM dans le paysage agricole (résultats obtenus à partir des cultures commerciales en Espagne) ;
- (e) Un effet très marqué de la direction du vent.

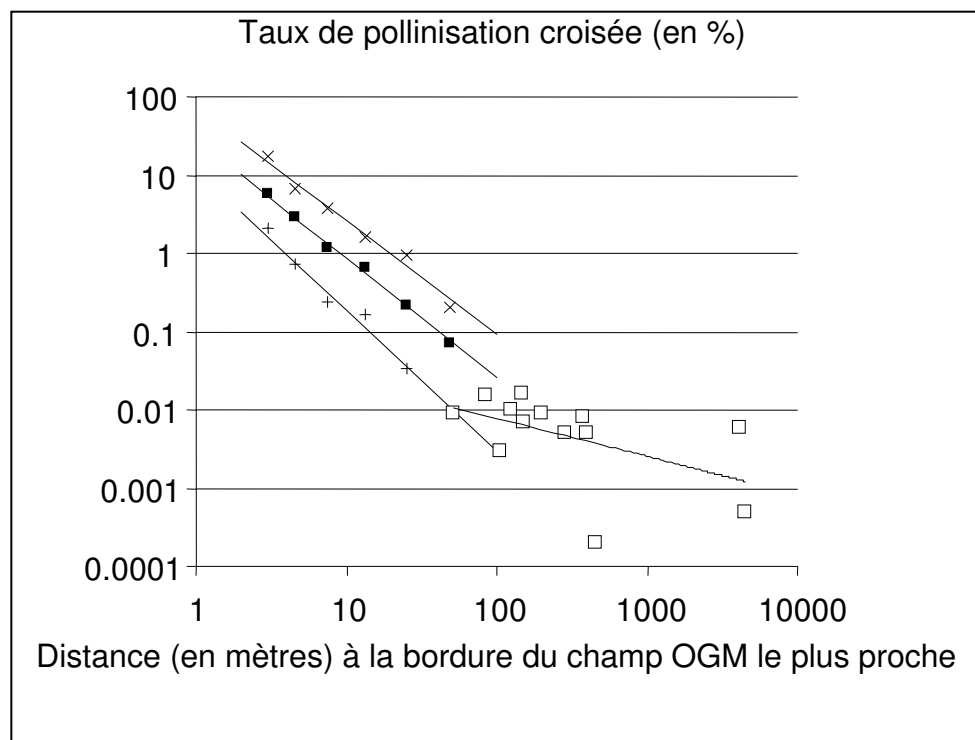


Figure 2. Extraits de jeux de données collectés lors du programme européen SIGMEA. Les points x correspondent au cas où le vent souffle de l'OGM vers le non-OGM et les points + correspondent au cas opposé (Source: étude BBA de dispersion entre deux parcelles). Les carrés blancs correspondent à une dispersion à longue distance dans un paysage agricole de vallées alpines (Source : ETH, Suisse).

Les facteurs influençant les taux de pollinisation croisée, qui restent à préciser et à mieux quantifier sont : l'effet de la dynamique de floraison, celui des hétérogénéités spatiales (haies, forêts, relief, etc.) et les mouvements convectifs.

Références :

- Angevin F., Klein E., Choimet C., Gauffreteau A., Lavigne C., Messean A., Meynard J.-M., 2008. Modelling Impacts Of Cropping Systems And Climate On Maize Cross-Pollination In Agricultural Landscapes: The Mapod Model, *Eur. J. Agron.*
- Bannert, M., Stamp, P. 2007. Cross-Pollination Of Maize At Long Distance. *Eur. J. Agron.* 27, 44-51.
- Bassetti, P., Westgate, M. E. 1994. Floral Asynchrony And Kernel Set In Maize Quantified By Image Analysis. *Agron. J.* 86, 699-703.
- Bateman, A. J. 1947. Contamination In Seed Crops II: Wind Pollination. *Heredity.* 1, 235-246.
- Bitocchi E., Nanni L., Giardini A., Buonamici, A., Vendramin, G. G., Papa R., 2009. Introgression From Modern Hybrid Varieties To Landrace Populations Of Maize (*Zea Mays* Ssp. *Mays* L.) In Central Italy. *Molecular Ecology*, 18 : 603-621.
- Bock A. K., Lheureux K., Libeau-Dulos M., Nilsagård H., Rodriguez-Cerezo E., 2002. Scenarios For Coexistence Of Genetically Modified, Conventional And Organic Crops In European Agriculture, Technical Report Series, Eur 20394 En. 133 P.
- Boyat, A., Ramdoyal, K., Kaan, F., Panouille, A., 1984. Densité De Peuplement Et Prolificite En Epis. In: Gallais, A. (Ed), *Physiologie Du Mais*. Inra, Pp199-204.
- Brunet Y. 2008. La Dissemiation Du Pollen De Maïs, Le Point Sur Les Consequences Actuelles. Colloque Biotechnologies Et Agriculture Durable, 17 Janvier 2008.
- Delage, S Brunet, Y Et Al. 2007. Atmospheric Dispersal Of Maize Pollen Over The Aquitain Region. In : Stein, Aj, Rodriguez-Cerezo, (Eds). *Books Of Abstracts Of The Third International Conference On Coexistence Between Gm And Non Gm Agricultural Supply Chain*, European Commission, Pp. 302-303.
- Dyer, G. A., Serratos-Hernandez, J.A., Perales, H. R. Et Al. 2009. Dispersal Of Transgene Via Maize Seed System In Mexico. *Plos One*, 4 : E5734.
- Fonseca, A. E., Westgate, M. E., Grass, L., Dornbos, D. L. Jr. 2003. Tassel Morphology As An Indicator Of Potential Pollen Production In Maize. *Crop Manag.* August, 1-13.
- Lecroart B., Gauffreteau A., Le Bail M., Leclaire M., Messean A., 2007. Effect Of Regional Structural Variables On Maize Coexistence. *Proceedings Of The Third International Conference About Coexistence, Gmcc07, Seville, 20-21 November 2007*, Pp 115-118.
- Messean A., Angevin F., Gomez-Barbero M., Menrad K., Rodriguez-Cerezo E., 2006. New Case Studies On The Coexistence Of Gm And Non-Gm Crops In European Agriculture, Technical Report Series, Eur 22102 En, 112 P.

- Raynor, G. S., Ogden, E. C., Hayes, J. V. 1972. Dispersion And Deposition Of Corn Pollen From Experimental Sources. *Agron. J.* 64, 420-427.
- Rosi-Marshall, E.J., Tank, J.I. Et Al. 2007. Toxins In Transgenic Crop By Products May Affect Headwater Stream Ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci, Usa*, 104 : 16204-16208.
- Treu, R., Emberlin, J., 2000. Pollen Dispersal In The Crops Maize (*Zea Mays*), Oilseed Rape (*Brassica Napus Ssp Oleifera*), Potatoes (*Solanum Tuberosum*), Sugar Beet (*Beta Vulgaris Ssp Vulgaris*) And Wheat (*Triticum Aestivum*), Evidence From Publications, A Report For The Soil Association From The National Pollen Research Unit, 54 P.
- Uribelarrea, M., Carcova, J., Otegui, M. E., Westgate, M. E. 2002. Pollen Production, Pollination Dynamics, And Kernel Set In Maize. *Crop Sci.* 42, 1910-1918.
- Sanvido, O., Widmer, F. Et Al. 2008. Definition And Feasibility Of Isolation Distances For Transgenic Maize. *Trans. Res.* 17:317-355.

Annexe 2: Recommandations en matière du suivi de la biosurveillance

S'il appartient au Comité de Surveillance Biologique du Territoire (CBST) de fixer ses missions, plusieurs recommandations pourraient être suggérées par le CS du HCB en matière de biosurveillance des biotechnologies, la dimension de ces propositions nécessitant de jouir d'une autorité régalienne s'imposant sur l'ensemble du territoire de la République :

- Plans de surveillance de durée plus longue que la seule durée d'autorisation.
- Définition de l'éventail des espèces à surveiller dans le cadre d'une biosurveillance nationale .
- Suivi des espèces cibles et non cibles, en particulier des espèces auxiliaires comme les abeilles, et en tenant compte des spécificités des territoires en matière de faune et flore sauvages et de cultures en fonction des zones climatiques.
 - définition des zones refuges sur le territoire métropolitain et dans les DOM, pour toutes les exploitations cultivant du maïs MON89034xNK603, sans seuil de superficie, ainsi que pour toute exploitation de l'agriculture conventionnelle ou biologique utilisant dans ses itinéraires phytopharmaceutiques des formulations à base de *Bacillus thuringiensis*.
 - Susciter des programmes de recherche dédiés à des préoccupations mises en avant par l'actualité (par exemple: incidence sur de nouvelles espèces invasives) ou par les questionnements des Etats-membres de l'UE ;
 - création d'une base centralisée de données sur les OGM, et veille bibliographique.
 - développement de l'outil « questionnaire » qui associerait non seulement les agriculteurs ayant choisi la technologie PSGM mais aussi les agriculteurs de l'agriculture conventionnelle ou biologique.
 - Extension de la surveillance générale sous une forme à définir (questionnaires au autres formes) à des zones sans culture de MON 89034xNK603.
 - Améliorer la transparence des plans de surveillance par la publication en ligne des résultats non confidentiels.
 - Mise en œuvre d'études plus étroitement coordonnées entre le(s) pétitionnaire(s), les réseaux privés et les réseaux de biosurveillance dans leurs

dimensions régionales sur le modèle de ce qui est fait en Allemagne ou en Espagne.

- En matière de coexistence des filières OGM et non OGM, mise en place des réflexions sur diverses stratégies afin de permettre une co-existence des cultures dans le cadre de la gestion des territoires et des paysages.
- Organiser une surveillance générale lors de l'importation (ports comme points d'entrée dans l'UE) ou pendant le transport en dehors des zones de culture et les espaces dédiés à la transformation des produits transgéniques.