

Haut Conseil des biotechnologies

Avis sur les réponses de l'AESA aux questions posées par les Etats membres au sujet de la culture et de la consommation du maïs Mon810, Dossier EFSA-GMO-RX-MON 810.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	2
INTRODUCTION	3
SYNTHESE DE L'ANALYSE DU COMITE SCIENTIFIQUE	4
ANALYSE DETAILLEE DU COMITE SCIENTIFIQUE	7
1) TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES	7
a) <i>Commentaires sur les réponses apportées par l'AESA au sujet des procédures d'analyse statistique mises en œuvre pour les analyses de toxicité du maïs Mon810:</i>	7
2) DISSEMINATION ET PERSISTANCE DES TOXINES CRY1AB DANS LE SOL.....	8
a) <i>Dissémination de la toxine:</i>	8
b) <i>Persistance de la toxine:</i>	8
c) <i>Méthodes d'analyse:</i>	9
d) <i>Éléments de comparaison:</i>	9
3) DONNEES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GLYCOSYLATION DE LA PROTEINE CRY1AB	10
a) <i>Structure de la protéine transgénique :</i>	10
b) <i>N-glycosylation et O- glycosylation :</i>	12
c) <i>Construction et allergénicité :</i>	13
4) IMPACTS DU MAÏS MON810 SUR LES INVERTEBRES NON-CIBLES	14
a) <i>Généralités – introduction :</i>	14
b) <i>Études en laboratoire :</i>	15
c) <i>Études en champ :</i>	15
d) <i>Conclusions intermédiaires :</i>	16
5) RESISTANCE AU MAÏS MON810 PARMIS LES INSECTES CIBLES	18
a) <i>Introduction :</i>	18
b) <i>Etudes bibliographiques :</i>	19
6) PLAN DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION	20
a) <i>Introduction :</i>	20
b) <i>Plan de surveillance générale pour aliments, ingrédients et additifs destinés à l'alimentation humaine et animale :</i>	21
c) <i>Plan de surveillance spécifique et général post-commercialisation (PSPC) lié à la culture en champ.</i> ..	21
7) EFFETS SUR LA SANTE.....	26
8) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	29
ANNEXES	34
CADRE LEGAL DU PSPC.....	34
RECOMMANDATIONS EN MATIERE DU SUIVI DE LA SURVEILLANCE	34
DISSEMINATION DE L'EVENEMENT TRANSGENIQUE VIA LES FLUX DE GENE :	35

Introduction

Objet

Le présent document propose une analyse des réponses données par l'Agence européenne de sécurité des aliments (AESAs, European Food Safety Authority EFSA) aux questions posées par les Autorités françaises et douze états membres, à propos de la demande de renouvellement de l'autorisation de la mise sur le marché, d'aliments et d'ingrédients alimentaires produits à partir du maïs génétiquement modifié Mon810, d'aliments pour animaux consistant en et/ou contenant du maïs Mon810, et de semences en vue de leur culture.

Méthodologie

Pour cette analyse, nous avons étudié le document de l'AESA et avons confronté ses données à la bibliographie et à l'état de l'art disponibles à la date de notre travail. Chaque question a fait l'objet d'une étude par un groupe d'experts. L'ensemble des documents a ensuite été analysé et discuté par le Comité Scientifique (CS) du Haut Conseil des biotechnologies (HCB) réuni en séance les 9 et 10 novembre 2009.

Les données économiques et sociales qui pourraient avoir un impact sur toute décision n'ont pas été prises en compte et relèveront principalement de l'analyse du Comité Economique Ethique et Social (CEES) du HCB. Ainsi, dans son analyse, le CS a pris pour hypothèse d'étude les conséquences possibles de la mise en œuvre de la culture et du commerce, du maïs Mon810, ce qui correspond le mieux à la saisine. Les conséquences, pour la société, pour l'agriculture et pour l'environnement, d'une non mise en culture du maïs Mon810, bien que soulignées durant les discussions du CS, sont absentes de ce rapport. Il n'était pas du mandat du CS de commenter, autant qu'ils pourraient le mériter, les impacts potentiels des pratiques actuelles auxquelles cette mise en culture serait susceptible de se substituer et/ou de pallier.

Organisation du document

Le texte est formé d'un résumé de synthèse qui reprend l'ensemble des points analysés dans le corps principal du rapport complet. Cette partie est nécessairement moins nuancée que le document complet.

La synthèse est suivie de différentes analyses détaillées sous la forme de chapitres individualisés. Chaque chapitre comprend une analyse argumentée, citant toutes les références nécessaires. Ces dernières sont répertoriées en fin de document.

En annexe, sont regroupés trois points importants, qui n'entraient toutefois pas strictement dans le cadre de la saisine.

Synthèse de l'analyse du Comité Scientifique

Préambule

Comme l'ensemble des acteurs, les gouvernements des états membres, le Comité de Préfiguration de la Haute Autorité (CPHA) et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), le CS a noté qu'en absence de règles méthodologiques clairement préconisées, certains traitements statistiques des données n'étaient pas appropriés. Dans ses réponses, l'AESA rappelle la mise en place de nouvelles directives sur l'analyse statistique (The EFSA Journal 2009; 1250: 1), sans toutefois remettre en cause le présent dossier.

Ne pouvant déterminer l'impact réel de la question des statistiques sur les questions abordées, le travail du Comité Scientifique a été réalisé sur la base des analyses fournies. On peut alors considérer que les données que nous avons étudiées ne révèlent pas d'effet majeur du maïs Mon810 sur l'environnement. Toutefois, comme sur tout autre point relatif à la sécurité environnementale, sanitaire et alimentaire, il est souvent difficile de conclure à une absence totale de risque (« l'absence de preuve n'est pas la preuve de l'absence »). Les travaux que nous avons recensés et analysés sont néanmoins d'une aide précieuse et permettraient, dans l'optique d'une mise en culture de MON810, de mettre en place des plans de surveillance post-commerciaux adaptés.

Structure de la protéine

La protéine transgénique est une forme tronquée de la protéine dite «sauvage» (présente dans les souches naturelles de *Bacillus thuringiensis*). Cette protéine diffère de quelques acides aminés par rapport à la forme normale. Toutefois, les données disponibles ne permettent pas de conclure que la protéine est structurellement différente de la protéine sauvage. En particulier, il ne semble pas que la protéine ait des propriétés nouvelles et inattendues, en termes d'allergénicité et de toxicité. En effet, après activation par les protéases contenues dans le tube digestif des insectes cibles, la fraction toxique de la protéine Cry1Ab du Mon810 sera strictement identique à celle de la protéine Cry1Ab naturelle. L'efficacité biologique de la protéine Cry1Ab du Mon810 sur les insectes cibles confirme que sa structure, son activité et son spectre d'action sont semblables à ceux de la protéine sauvage.

Dissémination et persistance de la protéine Cry1Ab

La protéine Cry1Ab est libérée par les plantes transgéniques, via les pollens, les racines et les résidus de culture. La stabilité de cette toxine est difficile à apprécier, mais les quantités libérées restent équivalentes à celles épandues sur les cultures lors de l'utilisation comme biopesticide de la souche *B. thuringiensis kurstaki* Dipel® : environ 500 g de Cry1Ab/hectare de maïs Mon810 pourraient disséminer à comparer aux 100-1000 g/hectare de biopesticide de la souche de *B. thuringiensis kurstaki* Dipel®.

Effets sur la faune non-cible

La culture du maïs Mon810 aura 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 la toxine Cry1Ab produite par ce maïs transgénique. Le maïs Mon810 supprime en effet pratiquement toutes les 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.

Le maïs Mon810 pourrait également diminuer les populations de lépidoptères non-cibles (ex: *Nymphalidae*, *Papilionidae*, *Saturniidae*, *Lycaenidae* et *Bombycidae*) sensibles à la toxine Cry1Ab et donc à l'ingestion accidentelle de grains de pollen. Si cette toxicité est avérée en laboratoire, aucune étude n'a mis en évidence un impact des maïs Mon810 sur ces lépidoptères en conditions naturelles. Les premières données synthétisées et le modèle développé – mais non encore publié – par les experts de l'AESA (2009) suggèrent que seule une petite fraction des populations des lépidoptères non-cibles serait soumise à des concentrations de pollens à même de les menacer.

Enfin, le maïs Mon810 aura un impact probablement limité, si impact il y a, sur la plupart des autres guildes d'invertébrés dont l'abondance varie de manière conséquente en fonction des pratiques culturales mises en œuvre, de la présence ou non de traitements insecticides, des conditions climatiques... Ces conclusions sur la faune non-cible sont cependant à tempérer par le fait que (1) les études menées directement sur le maïs Mon810 restent limitées, (2) ces études ne concernent qu'une partie des espèces inféodées au maïs et un nombre restreint d'espèces présentes en Europe, (3) la puissance statistique des expériences est, pour la plupart des groupes d'invertébrés étudiés, généralement limitée (4) la qualité des publications dans ce domaine est souvent bonne mais parfois critiquable, ce qui limite les conclusions que nous pouvons en tirer. Enfin, il faut garder à l'esprit que les études en laboratoire et en champs passent sous silence les éventuels effets sub-létaux, très difficiles à mesurer surtout en conditions naturelles.

Effets sur la faune cible, apparition d'une résistance à la toxine

La génétique d'apparition d'une résistance de la pyrale à la toxine Cry1Ab est complexe. Si des souches résistantes d'*O. nubilalis* ont pu être sélectionnées, elles l'ont été en laboratoire mais le niveau de résistance qu'elles confèrent ne permet pas une croissance des larves dans les parties végétatives du Mon810 contenant les plus fortes concentrations de toxines. Des résistances d'un niveau suffisamment élevé pour permettre un développement sur des maïs Mon810 ont été détectées chez trois insectes cibles non européens: *Busseola fusca* en Asie, *Diatraea saccharalis* en Amérique du Nord, et *Ostrinia furnacalis* en Chine. Il n'y a, a priori, aucune raison de penser que de telles résistances ne puissent pas être sélectionnées dans les populations européennes d'*O. nubilalis* et *S. nonagrioides*. De la même manière, on observe régulièrement, depuis qu'on les utilise en agriculture, l'apparition de résistance aux pesticides chez les insectes ravageurs du maïs. Le pétitionnaire propose une série de mesures visant à prévenir et détecter la

survenue de telles résistances. À n'en pas douter, ces mesures permettront de retarder la survenue d'une résistance liée au Mon810 dans les populations d'*O. nubilalis* et *S. nonagrioides*. Il est toutefois impossible de savoir si la quantité de refuges sera suffisante pour éviter son apparition. De plus il est impossible de prédire le nombre d'années ou de décennies qui sépareront la mise en place des premiers champs de maïs Mon810 et l'apparition de la résistance dans les populations de ces deux ravageurs cibles.

Plan de surveillance post-commercialisation

Le plan de surveillance post-commercialisation du dossier concerne deux types de produits différents (aliments et semences) qui nécessitent chacun des dispositifs de surveillance spécifiques.

Dans le premier cas (aliments), le risque d'échappement génétique est limité. En effet l'absence dans la flore européenne de plantes sexuellement compatibles avec le maïs et de la sensibilité de ce dernier au froid, réduisent les risques de dissémination et rendent plus aisé le contrôle d'éventuelles repousses. Les risques de dissémination doivent être gérés conformément aux dispositions réglementaires et légales en vigueur au niveau du territoire.

Dans le second cas (semences), le CS reconnaît les avancées proposées en matière : (1) d'anticipation et de suivi du développement de la résistance chez les insectes cibles, (2) d'impact sur les insectes non-cibles, et (3) sur le suivi de l'évolution des agroécosystèmes. Il rappelle cependant au pétitionnaire qu'il doit désormais adapter ses protocoles et ses questionnaires aux dispositions objets de la décision de la Commission C (2009) 7680 publiée le 13 octobre 2009, qui introduit la notion de « représentativité de l'échantillon suivi » par les questionnaires en relation avec l'importance des cultures de maïs Mon810 dans chaque pays. De même, en matière d'analyse statistique, la référence à suivre est désormais celle proposée par l'AESA (The EFSA journal 2009 ; 1250 : 1) qui facilite l'appréciation des évolutions d'une campagne à la suivante.

Les actions relatives à la formation préalable des utilisateurs et à la communication doivent être encouragées et poursuivies. Ces actions permettent un accès plus large aux résultats non confidentiels obtenus, pour les professionnels et le public.

En outre, le pétitionnaire se devra d'apporter son concours, lorsqu'il sera sollicité par le Comité de surveillance biologique du territoire, au suivi post-commercialisation des effets des biotechnologies introduites.

Effets sur la santé

L'AFSSA a fait l'objet d'une saisine parallèle spécifique sur ce point.

Le maïs Mon810, par un contrôle des lépidoptères foreurs du maïs, la pyrale *O. nubilalis* et la sésamie *S.nonagrioides*, a un impact indirect de diminution de la mycoflore fusarienne. Par conséquent, les teneurs en mycotoxines sont diminuées. Les fumonisines sont réduites drastiquement, et la zéaralénone diminue également.

Il existe un lien entre les niveaux de population d'insectes et les teneurs en mycotoxines à la récolte. Ces aspects sont particulièrement importants dans le Sud Ouest de la France où les lépidoptères foreurs, pyrale et sésamie, développent plusieurs générations par an (multivoltinisme) qu'il faut traiter. Ils sont peut-être moins aigus dans le nord-est de la France où la pyrale est monovoltine (une seule génération par année). Dans ces conditions, le maïs Mon810 apparaît comme une alternative pour satisfaire les exigences sanitaires des aliments de l'homme et de l'animal, et pour répondre aux objectifs de diminution de 50% des pesticides utilisés en agriculture, fixés par le programme Ecophyto 2018.

Analyse détaillée du Comité Scientifique

1) Traitement statistique des données

Rapporteur: M Lavielle.

a) Commentaires sur les réponses apportées par l'AESA au sujet des procédures d'analyse statistique mises en œuvre pour les analyses de toxicité du maïs Mon810:

Dans son "Avis sur la dissémination du Mon810 sur le territoire Français", le Comité de Préfiguration de la Haute Autorité sur les OGM (CPHA) avait émis plusieurs réserves concernant les procédures statistiques utilisées dans le dossier technique fourni par la société Monsanto, en particulier pour les études de toxicité (étude à 90 jours sur le rat) décrites dans l'article de Hammond *et al.* (2006) :

« Le risque de ne pas détecter un effet biologiquement significatif n'est pas véritablement évalué, il n'y a aucune analyse de puissance des tests statistiques utilisés.

La mauvaise utilisation des tests d'inférence statistique, ne permet pas de conclure à l'équivalence des maïs OGM et non OGM : utilisation de tests de comparaison au lieu de tests d'équivalence.

L'absence de plan d'analyse statistique rigoureux interdit tout calcul précis des risques d'erreurs de type I et II : utilisation discutable des données historiques et des données de référence. »

Ces réserves avaient été reprises dans le rapport Le Maho et par la délégation française auditionnée par l'AESA en octobre 2008.

La question statistique a été formellement posée par Mme Monica Frassoni, parlementaire européenne (Commission Européenne, le 06 mai 2009) :

« La Commission peut-elle certifier que le maïs transgénique MON 810 n'est pas toxique, "au risque statistique normal près" c'est-à-dire: Peut-on rejeter, et à quel risque, l'hypothèse nulle H0 (zéro) "le groupe témoin et le groupe essai sont différents", pour chacun des paramètres étudiés ? Dans l'affirmative: est ce que la Commission peut produire les calculs permettant cette affirmation? »

L'AESA ne fournit pas de réponse sur ces points. En ce qui concerne les études de toxicité, l'AESA renvoie à l'article de Hammond *et al.* (2006). Cette étude ne permet ni de démontrer l'existence d'un effet préoccupant pour la santé, ni de démontrer rigoureusement (au sens de la statistique inférentielle) l'absence d'un tel effet.

L'AESA explique comment les tests de comparaison sont mis en œuvre, c'est-à-dire en conservant comme hypothèse nulle, H0: "le groupe témoin et le groupe essai sont identiques".

Il faut souligner que les nouvelles recommandations de l'AESA, pour les procédures statistiques à mettre en œuvre lors de l'évaluation des risques liés aux OGM, prennent en compte la plupart des remarques évoquées ci-dessus : notamment la nécessité d'effectuer des analyses de puissance et d'utiliser des tests d'équivalence. Ainsi, l'agence européenne reconnaît implicitement que les procédures antérieures ne sont pas satisfaisantes et que les réserves formulées par le CPHA étaient fondées.

2) Dissémination et persistance des toxines Cry1Ab dans le sol

Rapporteur: D Lereclus & P Simonet.

a) Dissémination de la toxine:

Les plantes portant un gène *cry* libèrent des toxines dans le sol, par exsudation racinaire, par leur pollen et par les résidus de plantes (Saxena et Stotzky, 2000, *FEMS Microbiol. Ecol.* 33 : 35-39). Cependant, les quantités de protéines Cry disséminées à partir de plantes transgéniques sont très variables. À titre d'exemple, on peut citer deux études réalisées sur le cotonnier. Sims et Ream (*J. Agric. Food Chem.* 1997, 45 : 1502-1505) estiment qu'environ 1 kg de toxine Cry est libérée par hectare de culture, soit environ 1,6 mg/kg de sol. Une estimation publiée dans le Biopesticide Registration Action Document (BRAD) indique qu'environ 3,6 g de toxine Cry sont relarguées par hectare. Avec $2,2 \cdot 10^6$ kg par hectare, la quantité de toxine Cry disséminée serait donc de 1,6 µg/kg de sol. Le facteur 1000 de différence entre les deux estimations, alors que les 2 rapports se fondent sur la même présence de 150 000 plants par hectare, provient certainement d'une appréciation différente du pourcentage de plantes récoltées et de la profondeur de sol considérée (7 cm contre 15 cm).

Dans le cas du maïs Mon810, en se fondant sur une masse d'environ 100 tonnes de maïs par hectare, le BRAD estime que 465 g de toxines Cry1Ab pourraient être disséminées par hectare de maïs, soit environ 208 µg de Cry1Ab par kg de sol.

b) Persistance de la toxine:

Les protéines Cry ont la propriété de s'adsorber à différents composants du sol, comme l'argile ou les acides humiques, en conservant leur activité insecticide (Tapp et Stotzky, 1998, *Soil Biol. Biochem.* 30 : 471-476).

Les données concernant la persistance des toxines Cry sont contrastées. Herman et coll. (*J. Agric. Food Chem.* 2002, 50 : 7076-7078) montrent, à l'aide d'essais biologiques sur insecte, que la demi-vie de la toxine Cry1F est inférieure à 1 jour. Sims et Holden (*Environ. Entomol.* 1996, 25 : 659-664) montrent un DT_{50} (temps correspondant à 50% de dissipation) de la toxine Cry1Ab issue du maïs de 1,6 jours, contre 8,3 pour des toxines d'origine bactérienne. Palm et coll. (*Mol. Ecol.* 1994, 3 : 145-151) indiquent que 88% des protéines Cry1Ab sont éliminées du sol en 7 jours. Cependant, plusieurs auteurs (Donegan et al. 1995, *Appl. Soil Ecol.* 2 : 111-124 ; Tapp et Stotzky, 1998, *Soil Biol. Biochem.* 30 : 471-476) observent que l'activité insecticide des toxines Cry peut persister dans le sol pendant jusqu'à plus de 6 mois. Des études antérieures donnent une explication à ces résultats en apparence

contradictoires. West et coll. (*J. Invertebr. Pathol.* 1984, 44 : 128-133) ont montré que la dispersion des toxines Cry du sol était un phénomène biphasique : on observe tout d'abord une dispersion rapide des toxines, suivie d'une perte beaucoup plus lente des 10% de protéines restantes. La chute rapide observée durant les premiers jours est attribuée à l'utilisation de la toxine par les microorganismes, la phase « stable » par l'immobilisation et la protection de la toxine par les argiles et la matière organique (Palm et coll., 1996, *Can. J. Microbiol.*, 42: 1258-1262). Le temps de demi-vie de la toxine dans le sol serait donc fortement dépendant de l'activité microbienne, elle-même dépendante du pH. Les études de persistance menées en laboratoire ne prennent pas en compte la grande sensibilité protéique à la dégradation par le rayonnement ultraviolet.

c) Méthodes d'analyse:

Les deux méthodes principales de détection des protéines Cry dans les sols sont, les tests biologiques et les dosages après extraction. Les bioessais ne requièrent pas d'extraction chimique préalable de la toxine, car les insectes peuvent l'ingérer à l'état adsorbé. Cette méthode permet donc de quantifier les protéines actives (Sims et Holden, *Environ. Entomol.* 1996, 25: 659-664). Elle est cependant difficilement applicable sur un sol qui contient déjà des protéines Cry ou d'autres toxines insecticides. La seconde méthode de détection des protéines Cry des sols repose sur une extraction chimique. Beaucoup d'auteurs associent à l'extraction une détection immunologique de type immuno-empreinte (western blot) ou ELISA (cf. pour revue: Clark et coll., 2005, *J. Agric. Food Chem.* 53: 4643-4653). L'ELISA est une méthode sensible et quantitative, mais qui reste dépendante du maintien de la structure de la protéine et des rendements d'extraction. À ce jour, il n'existe pas de méthode de détection *in situ* (en présence de sol) qui soit à la fois fiable, spécifique et reproductible.

d) Éléments de comparaison:

1) Présence naturelle des toxines Cry dans l'environnement :

Selon les sols, les spores de *B. thuringiensis* sont trouvées à des concentrations généralement comprises entre 10^2 et 10^5 cfu/g de sol (Martin, 1994, *Am. Entomol.* 85-90). Dans certaines conditions appropriées, les spores germent et les bactéries se multiplient, entraînant une production naturelle de toxines Cry dans le sol. Bien que la présence de toxines Cry dans des échantillons naturels de sol n'ait pas été clairement démontrée, des essais biologiques sur insectes suggèrent leur présence en établissant une corrélation entre l'activité insecticide d'un sol et la spécificité insecticide des souches de *B. thuringiensis* qu'il contient (Martin, 1994, *Am. Entomol.* 85-90). De plus, il a été montré qu'environ 40% des invertébrés sont naturellement porteurs de spores de *B. thuringiensis* (Chaufaux et coll., 1997, *Can. J. Microbiol.* 43 : 337-343). Compte tenu de la présence ubiquiste de cette bactérie dans le monde, et compte tenu de la prédominance des souches portant des gènes *cry1Ab* au sein de l'espèce *B. thuringiensis* (Martin et Travers, 1989, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 2437-2442), il est évident que des quantités considérables de protéines Cry1Ab doivent se trouver naturellement dans l'environnement, sans qu'une quantification précise ne soit possible.

2) Dissémination des toxines Cry par utilisation de biopesticides à base de *B. thuringiensis* :

Il existe une différence entre les protéines sous forme de cristaux, qui contiennent un ensemble de protéines Cry de large spectre sur les lépidoptères (pour la souche de *Bt kurstaki* Dipel®), qui sont sous une forme de protoxines, et la protéine issue du maïs Mon810, qui est une forme tronquée proche d'une forme activée.

Lors de traitements massifs avec des biopesticides à base de *B. thuringiensis*, on estime qu'environ 10^{14} à 10^{15} spores bactériennes sont disséminées par hectare, soit à peu près autant de cristaux. Un cristal qui contient $\sim 5 \times 10^6$ molécules Cry a une masse d'environ 10^{-12} g. Une série de traitements revient donc à épandre 0,1 à 1 kg de toxines Cry par hectare. La souche de *B. thuringiensis* la plus utilisée comme biopesticide est la sous espèce *Bt kurstaki* Dipel® qui produit plusieurs protéines Cry1 dont la toxine Cry1Ab. La quantité de protéines Cry épandue par cette méthode de lutte biologique est donc comparable à celle qui dérive de l'utilisation de plantes OGM.

3) Données de biologie moléculaire et glycosylation de la protéine CRY1Ab

Rapporteurs : P Guerche, P Rougé & J Guillemain.

a) Structure de la protéine transgénique :

La protéine exprimée dans le maïs Mon810 est plus courte que la protéine CRY1Ab de Bt (notée Cry1Ab dans le schéma suivant) car le fragment de séquence codante effectivement intégré dans le génome de maïs est de 2448 nucléotides (nt), alors que celle-ci est de 3465 nt dans le plasmide PV-ZMBK07. En effet, la région 3' d'environ 1017 nt ainsi que le terminateur « Nos » n'ont pas été intégrés dans le maïs Mon810. D'après la séquence génomique, la protéine Cry1Ab du maïs Mon810 (notée Mon810 ci-après) est constituée de 816 acides aminés additionnée de 2 acides aminés venant de la traduction de la séquence génomique de la plante au site d'intégration (en rouge sur l'alignement). Tout cela est parfaitement décrit dans le dossier. Toutefois, des analyses complémentaires ont été réalisées par Rosati et al (Plant Mol Biol 2008, 67/271-281). Dans ces études de RT-PCR, Rosati montre que des ARNm de différentes tailles peuvent être transcrits dans des feuilles de maïs Mon810. Certains de ces ARNm, pouvant avoir subi un épissage alternatif, pourraient alors coder une protéine possédant, outre les 2 acides aminés déjà mentionnés, une extension de 18 acides aminés supplémentaires en partie C terminale (notée Mon810Rosati dans le schéma suivant).

Il faut noter cette protéine de fusion de 836 acides aminés est déduite d'études *in silico*, c'est à dire qu'elle n'a pas été isolée de cellules de maïs Mon810. De plus, Rosati et al. notent que les acides aminés ajoutés ne donnent aucune structure de protéine connue « *In silico translation of putative fusion RNAs did not show significant identities with known protein domains* » (Par traduction informatisée des ARN de fusion putatifs on ne retrouve pas de domaines de protéines connues).

Il n'a pas été trouvé d'expérience de western blot dans le dossier et l'on ne sait pas

si ces deux protéines ont été isolées et repérées (la différence de taille entre ces deux protéines est sans doute trop faible de toute façon pour la mettre en évidence par western blot). Néanmoins, l'une ou les deux protéines sont exprimées dans le maïs Mon810 et l'une au moins (ou les deux) a (ont) une action attendue sur certains invertébrés puisque cette plante est résistante à la pyrale du maïs.

Alignement des 2 protéines potentielles de Mon 810 avec la protéine Cry1Ab de *B. thuringiensis* (voir texte) :

```

Mon810          MDNPNINCEIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL 60
Mon810Rosati   MDNPNINCEIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL 60
CrylabBt       MDNPNINCEIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL 60
*****

Mon810          VDIIWGI FGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD 120
Mon810Rosati   VDIIWGI FGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD 120
CrylabBt       VDIIWGI FGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD 120
*****

Mon810          PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVGQ 180
Mon810Rosati   PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVGQ 180
CrylabBt       PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVGQ 180
*****

Mon810          RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELTTLTV 240
Mon810Rosati   RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELTTLTV 240
CrylabBt       RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELTTLTV 240
*****

Mon810          LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSAQIEGSI RSPHLM DIL 300
Mon810Rosati   LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSAQIEGSI RSPHLM DIL 300
CrylabBt       LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSAQIEGSI RSPHLM DIL 300
*****

Mon810          NSITIYTDHRGEYYWSGHQIMASPVGFSGPEFTFFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGVYR 360
Mon810Rosati   NSITIYTDHRGEYYWSGHQIMASPVGFSGPEFTFFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGVYR 360
CrylabBt       NSITIYTDHRGEYYWSGHQIMASPVGFSGPEFTFFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGVYR 360
*****

Mon810          TLSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAVYRKSGTVDSLDEIPQNNNV 420
Mon810Rosati   TLSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAVYRKSGTVDSLDEIPQNNNV 420
CrylabBt       TLSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAVYRKSGTVDSLDEIPQNNNV 420
*****

Mon810          PPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNSSVSIIRAPMFSWIHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKST 480
Mon810Rosati   PPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNSSVSIIRAPMFSWIHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKST 480
CrylabBt       PPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNSSVSIIRAPMFSWIHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKST 480
*****

Mon810          NLGSGTSVVKGPFGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNI TAPLSQRVVRIRYASTTNLQFH TS 540
Mon810Rosati   NLGSGTSVVKGPFGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNI TAPLSQRVVRIRYASTTNLQFH TS 540
CrylabBt       NLGSGTSVVKGPFGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNI TAPLSQRVVRIRYASTTNLQFH TS 540
*****

Mon810          IDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYID 600
Mon810Rosati   IDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYID 600
CrylabBt       IDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYID 600
*****

Mon810          RIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTVDVTDYHIDQVSNLVECLSDEF C 660
Mon810Rosati   RIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTVDVTDYHIDQVSNLVECLSDEF C 660
CrylabBt       RIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTVDVTDYHIDQVSNLVECLSDEF C 660
*****

Mon810          LDEKKELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQLDRGWRGSTDITIQQGDDVFKENYV 720
Mon810Rosati   LDEKKELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQLDRGWRGSTDITIQQGDDVFKENYV 720
CrylabBt       LDEKKELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQLDRGWRGSTDITIQQGDDVFKENYV 720
*****

Mon810          TLLGTFDECYPTYLYQKIDESK LKAYTRYQLRGIYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNPVGT 780
Mon810Rosati   TLLGTFDECYPTYLYQKIDESK LKAYTRYQLRGIYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNPVGT 780
CrylabBt       TLLGTFDECYPTYLYQKIDESK LKAYTRYQLRGIYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNPVGT 780

```

```

*****
Mon810          GSLWPLSAPSPIGKCAHSHHFSLDIDVGCTDLNEDFR----- 818
Mon810Rosati   GSLWPLSAPSPIGKCAHSHHFSLDIDVGCTDLNEDFRTSAFIMRILLRCKTTCSR---- 836
CrylabBt       GSLWPLSAPSPIGKCAHSHHFSLDIDVGCTDLNEDLGVVVIFKIKTQDGHARLGNLEFL 840
                *****;

Mon810          -----
Mon810Rosati   -----
CrylabBt       EEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETNIVYKEAKESVDALFVNSQYDRLQADTNI 900

Mon810          -----
Mon810Rosati   -----
CrylabBt       AMIHAADKRVHSIREAYLPELSVPGVNAEIFEELEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNNG 960

Mon810          -----
Mon810Rosati   -----
CrylabBt       LSCWNVKGHV DVEEQNNHRSVLVVPWEAEVVSQEV RVCPGRGYILRV TAYKEGYGEGCVT 1020

Mon810          -----
Mon810Rosati   -----
CrylabBt       IHEIENNTDELKFSNCVBEVYPNNTVT CNDYTATQEEYEGTYTSRNRGYDGAYESNSSV 1080

Mon810          -----
Mon810Rosati   -----
CrylabBt       PADYASAYEEKAYTDGRRDNPCE SNRGYD YTPLPAGYVTKELEYFPETDKVWIEIGETE 1140

Mon810          -----
Mon810Rosati   -----
CrylabBt       GTFIVDSVELLLMEE 1155

```

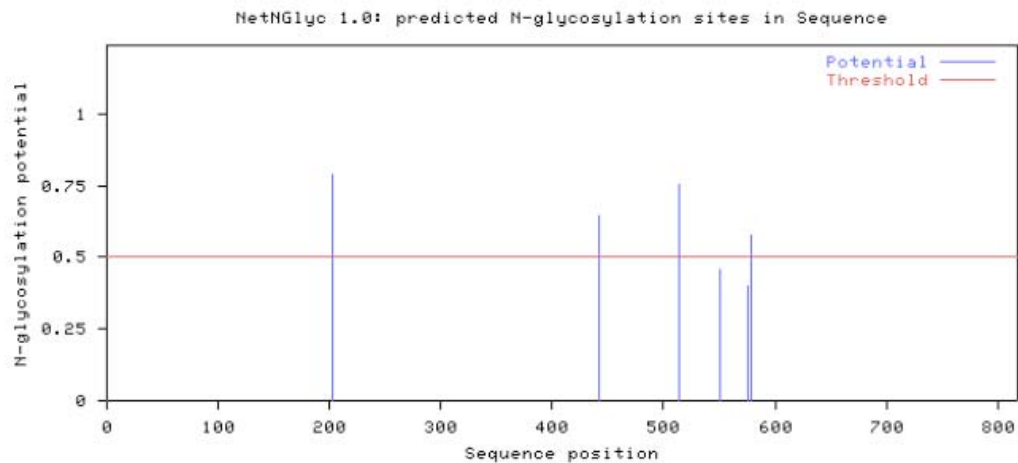
b) N-glycosylation et O- glycosylation :

La N-glycosylation chez les plantes présente souvent une spécificité, en termes de branchements latéraux de «sucres». Les xylose et fucose se branchent souvent sur la fourche de glycosylation au niveau du cœur trimannosidique ou sur les antennes. En utilisant le site NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) on peut observer que la protéine Cry1Ab du Mon810 présente 6 sites de N-glycosylation potentiels dont 4 probables :

```

Name: Sequence          Length: 818
MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLESEFVPGAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQI      80
EQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTAIPLFAVQNYQVPLLSV      160
YVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRELLTLV      240
LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSAQGIIEGIRSPHLMILNSITIIYTDHRGEYYWSGHQ      320
IMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGVYRTLSSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAV      400
YRKSGTVDSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSSSSVSIIIRAPMFSWIHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKST      480
NLGSGTSVVKGPFGTGGDILRRTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQNGSATMSSGSN      560
LQSGSFRTVGFTTFFNFSNGSSVFTLSAHVFNSEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDV      640
TDYHIDQVSNLVECLSDFECLDEKKELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQLDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYV      720
TLLGTFDECYPTYLYQKIDESKLYTRYQLRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGTGLWPLSAPSPIGKCAHSH      800
HFSLDIDVGCTDLNEDFR

```



Graphics in PostScript

La O-glycosylation des protéines végétales est beaucoup moins bien connue. Elle greffe le plus souvent des chaînes plus ou moins longues d'arabinogalactanes (cas des extensines). Elle peut également fixer des chaînons galactose pour donner des chaînes plus courtes.

Cependant la protéine Cry1Ab du maïs Mon810 ne présente pas de peptide signal potentiel :

Warning: This sequence may not contain a signal peptide!!

Proteins without signal peptides are unlikely to be exposed to the N-glycosylation machinery and thus may not be glycosylated (in vivo) even though they contain potential motifs.

SignalP-NN euk predictions are as follows:

# name	Cmax	pos ?	Ymax	pos ?	Smax	pos ?	Smean ?	D	?
Sequence	0.052	18 N	0.021	56 N	0.065	53 N	0.019	N	0.020 N

SignalP output is explained at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/output.html>

Pour la N- et/ou la O-glycosylation, les protéines doivent transiter par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi pour être glycosylées. Puisque la Cry1Ab du maïs Mon810 n'est à priori pas adressée au réticulum endoplasmique ni au Golgi, il est très peu probable qu'elle soit N- ou O-glycosylée.

c) Construction et allergénicité :

En allergologie, d'une manière plus générale, la majorité des épitopes B (responsables de l'allergénicité des protéines) ne sont pas glycosylés. Quelques "glycotopes" (épitopes B portant une chaîne glycanique) sont connus, mais ils ne paraissent pas représenter la majorité des épitopes.

Il n'existe pas de données bibliographiques (Batista R et al. J Allergy Clin Immunol. 2005 Aug; 116(2):403-10; Nakajima O et al. Regul Toxicol Pharmacol 2007 Feb; 47(1):90-5.) qui indiqueraient que la protéine Cry1Ab induit une allergénicité

spécifique, effet par ailleurs cliniquement observé pour certains aliments ou ingrédients d'utilisation courante.

4) Impacts du maïs *Mon810* sur les invertébrés non-cibles

Rapporteurs : D Bourguet & Y Le Maho.

a) Généralités – introduction :

L'étude de l'impact des plantes transgéniques sur les espèces non-cibles est difficile. Elle l'est d'autant plus que l'effort de recherche dans ce domaine a été limité. Dans un communiqué daté de 2008, 26 scientifiques américains jugent ainsi que les experts n'ont pas disposé des éléments permettant de travailler correctement sur ce sujet.

Pour autant, les études sur les espèces non-cibles sont relativement nombreuses. En effet, Naranjo (2009) a dénombré plus de 350 études publiées entre 1995, date des premières études à ce sujet, et 2008. Parmi ces études, 200 permettent une réelle évaluation de l'impact des plantes Bt et/ou des toxines de Bt sur les invertébrés. Les autres études à ce sujet ne précisent pas les tailles des échantillons ou les parcelles de référence ou encore ne fournissent aucune mesure de variance, d'écart-type..., ce qui les rend relativement inexploitable.

Les études se divisent d'une part en expérimentations réalisées en laboratoire (incluant généralement des tests toxicologiques à partir de toxines pures de Bt ou de tissus/pollen de plantes Bt) et, d'autres part, en expérimentations en champs (généralement des comparaisons entre parcelles transgéniques et parcelles non transgéniques, traitées ou non aux insecticides). Ces études comparent des abondances (pour les études en champs) et des taux de survie, de consommation, de reproduction ou encore des temps de développements larvaires (pour les études en laboratoire).

Depuis 2006, des bases de données permettent de compiler les études destinées à mesurer l'impact des plantes Bt sur les invertébrés. Ces bases, qui ne comprennent que les études permettant une exploitation statistique des résultats, sont celles sur lesquelles Marvier et al. (2007), Wolfenbarger et al. (2008) et Naranjo (2009) ont réalisé leurs méta-analyses. Ces méta-analyses nous évitent d'entrer dans le détail des études menées à ce jour et permettent de dégager des tendances générales et robustes.

La base de données sur les études conduites en laboratoire contient actuellement 135 études portant sur : 9 types de cultures Bt, 22 protéines ou combinaisons de protéines Cry de Bt, elles ont été réalisées dans 17 pays. La base de données sur les études menées en champs contient quant à elle 63 études portant sur 5 types de cultures Bt, 13 toxines de Bt différentes et ont été réalisées dans 13 pays. De manière non surprenante, la majorité des études se sont déroulées aux Etats-Unis (47%) et en Chine (13%) où les taux d'adoption des cultures Bt ont été particulièrement importants. Une proportion relativement élevée des études

d'Europe, a été entreprise en Suisse (9%). Les études réalisées en Espagne, en France et en Grande-Bretagne représentent 11% de l'ensemble des études contenues dans la base de données. Les 198 études concernent essentiellement le coton et le maïs Bt et, pour ces derniers, la toxine Cry1Ab et l'évènement Mon810.

Comme le soulignent Marvier et al. (2007), "*regardless of one's philosophical perspective on risk assessment for GM crops, enough experimental data has accumulated to begin drawing empirically based conclusions, as opposed to arguing on the basis of anecdote or handpicked examples*" (Sans préjuger des points de vue sur la mesure du risque des plantes OGM, il existe suffisamment de données pour commencer à proposer des conclusions empiriques, sans utiliser des anecdotes ou des exemples choisis. Traduction JCP).

b) Études en laboratoire :

À ce jour, deux méta-analyses des données obtenues en laboratoire ont été réalisées : l'une par Duan et al. (2008) spécifiquement destinée à mesurer l'impact sur les abeilles et l'autre par Naranjo (2009) sur l'ensemble des invertébrés non-cibles.

Les études en laboratoire ne concernent qu'un nombre restreint de phyla (n = 3), de classes (n = 8), d'ordres (n = 16), de familles (n = 43) de genre (n = 79) ou encore d'espèces (n = 99) d'invertébrés. Ceci est lié aux difficultés ou à l'impossibilité d'élever ou de reproduire des insectes en captivité.

La méta-analyse de Naranjo (2009) inclut 84 études portant sur la toxine Cry1Ab pure ou produite par des maïs Bt.

Les effets mis en évidence sont les suivants : (1) légère réduction du temps de développement des prédateurs qui ne se traduit cependant pas par une réduction de leur survie ou de leur taux de reproduction, (2) une diminution du temps de développement et de la survie de nombreux Lépidoptères qu'ils soient des ravageurs non-cibles ou encore des espèces emblématiques (ex :. *Nymphalidae*, *Papilionidae*, *Saturniidae*, *Lycaenidae* et *Bombyxidae*) et (3) une meilleure survie des détritivores exposés, comparée à celle des détritivores non exposés aux protéines Bt.

Par ailleurs, l'analyse de Naranjo (2009) met clairement en évidence un effet de la qualité des hôtes/proies sur le développement, la reproduction et la survie des parasitoïdes et des prédateurs. Ces trois paramètres sont affectés seulement si ces hôtes/proies sont préalablement affaiblies via une exposition aux toxines de Bt auxquelles ils sont sensibles. En revanche, les parasitoïdes et les prédateurs se développent, se reproduisent et survivent normalement sur des hôtes/proies naturellement insensibles ou devenus résistants aux toxines de Bt. Ces résultats permettent de conclure que les effets sur les parasitoïdes et les prédateurs sont généralement – si ce n'est pas exclusivement – indirects.

Les revues de Malone et Burgess (2009) et la méta-analyse de Duan et al. (2008) sur les études menées en laboratoire sur l'abeille, ne font apparaître aucun effet adverse de la toxine Cry1Ab ou des pollens de maïs Bt contenant cette toxine sur ces insectes. La méta-analyse de Naranjo (2009) ne fait également apparaître aucun effet négatif des toxines ou plantes Bt, au sens large, sur les abeilles.

c) Études en champ :

Les études en champ sont généralement peu puissantes pour révéler des changements de densités d'insectes. Ceci est lié (1) à la lourdeur de telles expériences et donc au faible nombre de réplicas généralement mis en place, (2) l'importante dispersion de la plupart des espèces entre les champs, (3) à l'influence d'autres paramètres (ex : climat, paysage...) avec, pour corollaire, une grande variabilité des densités d'insectes d'un réplica à l'autre.

La qualité des études est souvent critiquable. Ainsi Marvier et al. (2007) notent que parmi les 63 articles consacrés aux études en champs, 40% donnent des moyennes sans les accompagner de leur variance, 20% ne précisent pas clairement les effectifs des échantillons et 22% utilisent de manière inappropriée des sous échantillonnages pour effectuer des mesures de variance.

En conséquence, le nombre d'étude pris en compte dans la méta-analyse de Marvier et al. (2007) se limite à (1) 24 études concernant des comparaisons entre maïs Bt produisant des Cry1Ab et maïs conventionnels non traités aux insecticides et (2) 8 études comparant ces mêmes maïs à des parcelles traitées aux insecticides. Pour les maïs Mon810, ces chiffres sont respectivement de 11 et de 4. La méta-analyse de Wolfenbarger et al. (2008) porte pratiquement sur les mêmes études. La dernière méta-analyse en date (Naranjo 2009) comprend 14 études supplémentaires.

Les résultats des méta-analyses de Marvier et al. (2007), Wolfenbarger et al. (2008) et Naranjo (2009) peuvent se résumer de la manière suivante :

- a. L'abondance des invertébrés non-cibles est globalement plus importante dans les parcelles de maïs conventionnels non traitées aux insecticides que dans les parcelles de maïs Mon810. Inversement, l'impact des maïs produisant des toxines Cry1Ab sur ces invertébrés est moindre que les traitements insecticides (qui, dans le cas du maïs, sont généralement des pyréthriinoïdes).
- b. Plus précisément, les hyménoptères parasitoïdes – principalement des espèces de guêpes appartenant aux Braconidae et aux Ichneumonidae – sont moins fréquents dans les parcelles de maïs produisant la toxine Cry1Ab que dans celles contenant des maïs conventionnels non traités. Cette réduction provient presque exclusivement d'une diminution d'abondance de *Macrocentrus grandii*, un parasitoïde spécialiste de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*. L'effet sur les parasitoïdes est donc très certainement un effet secondaire lié à la réduction des densités de leur hôte et donc à l'efficacité du maïs Mon810 sur sa cible principale : *O. nubilalis*.
- c. Les collembolés sont en moyenne moins fréquents dans les maïs produisant la toxine Cry1Ab que dans les maïs conventionnels. Marvier et al. (2007) jugent

toutefois que cette différence repose sur un nombre d'études trop faible ($n = 3$) pour être considérée comme valable.

- d. Les abondances de toutes les autres guildes fonctionnelles (herbivores, omnivores et détritivores dans le cas de Wolfenbarger et al. (2008) et de Naranjo (2009) ; Coleoptera, Hemiptera, Araneae, Neuroptera, Diptera et Thysanoptera dans le cas de Marvier et al. (2008)) ne sont pas significativement modifiées dans les cultures de maïs produisant la Cry1Ab comparés aux maïs conventionnels non traités.

d) Conclusions intermédiaires :

Les résultats combinés des études en laboratoire et en champs permettent, à ce jour, de conclure que la culture du maïs Mon810 :

- a. Aura un impact sur les hyménoptères parasitoïdes spécialistes d'*O. nubilalis*. Cet impact n'est pas lié à la toxicité directe de la protéine Cry1Ab ; elle résulte des fortes concentrations de cette toxine contenues dans le feuillage du maïs Mon810. En contrôlant les infestations de pyrales, ce maïs Bt supprime intégralement l'hôte que constitue *O. nubilalis* pour ses parasitoïdes. Il est à noter que *Macrocentrus grandii*, parasitoïde le plus concerné par cet effet, n'infeste pas les populations françaises de la pyrale du maïs.
- b. Pourrait modifier les populations de lépidoptères non-cibles. De nombreux lépidoptères sont en effet sensibles à la toxine Cry1Ab et peuvent donc être potentiellement intoxiqués par l'ingestion de pollens de maïs Mon810. Si cette toxicité est avérée, aucune étude n'a comparé les populations de ces lépidoptères en conditions naturelles. La raison est qu'un tel suivi est difficile car les populations (i) sont souvent en effectif limité, ce qui restreint les capacités d'observation, et (ii) généralement peu inféodées aux champs de maïs, ce qui limite d'autant les comparaisons entre parcelles de maïs Bt et maïs conventionnels. Comme dans le cas du monarque *Danaus plexippus* (Sears et al. 2001), il est nécessaire de déterminer le degré d'exposition des populations de ces lépidoptères avant toute conclusion sur le risque qu'ils encourent. Les premières données synthétisées et le modèle développé – mais non encore publié – par les experts de l'AESA (2009) suggèrent que seule une petite fraction des populations des lépidoptères non-cibles pourrait être soumise à des concentrations de pollens à même de les menacer.
- c. Aura un impact probablement limité, si impact il y a, sur la plupart des autres guildes d'invertébrés, ce qui est en accord avec la spécificité étroite des toxines de Bt. Les effets sur les collemboles en champs restent à confirmer et l'augmentation de la survie des détritivores en laboratoire n'a pas été corroborée par des variations d'abondance en champ. Une réduction de poids des vers de terre, *Lumbricus terrestris*, a bien été observée en laboratoire par Zwahlen et al. (2003) lors d'essais réalisés avec un maïs Bt11 ; toutefois, les cinq autres études menées sur ce groupe d'invertébrés ne mettent pas en évidence, quant à elle, d'effet de la toxine Cry1Ab (voir la synthèse de l'AESA (2009). Enfin, l'étude de Rosi-Marshall et al. (2008) sur les trichoptères souffrent de problèmes méthodologiques (Beachy et al. 2008), et les effets délétères mis en évidence par cette étude sont vraisemblablement d'une ampleur plus limitée qu'initialement annoncée (Parrot 2008). Il faut toutefois tempérer l'absence d'effet probant sur les invertébrés par le fait que (1) les

études menées directement sur le maïs Mon810 restent somme toute limitées, (2) que ces études ne concernent qu'une partie des espèces inféodées au maïs et un faible nombre d'espèces européennes puisque la plupart des études ont été menées aux Etats-Unis et en Chine, (3) la puissance statistique des expériences est, pour la plupart des groupes d'invertébrés étudiés, très limitée ; ces études ne permettent donc pas de révéler des effets de faible amplitude (4) la qualité des publications dans ce domaine est parfois critiquable, ce qui limite les conclusions que nous pouvons en tirer. Enfin, il faut garder à l'esprit que les études en laboratoire et en champs passent sous silence les éventuels effets sub-létaux. Si aucun effet sur les abeilles n'a pu être démontré à ce jour, Duan et al. (2008) considèrent que les autres sources de « stress » que subissent ces pollinisateurs (e.g. doses sub-létales d'insecticides, attaques de *Varroa destructor*, viroses...) peuvent augmenter leurs sensibilités aux toxines Cry de Bt. Ce point reste toutefois à démontrer.

Cette synthèse des résultats est en accord avec (et prolonge) celle, plus détaillée, de l'AESA (2009). Les conclusions de l'AESA « the likelihood of adverse effects ... is foreseen to be very low » (la probabilité d'un effet indésirable...est anticipée comme étant faible. Traduction JCP) sont toutefois trop tranchées au regard des limites des études pointées ci-dessus.

En résumé, il est possible de s'accorder sur le fait que la culture du maïs Mon810 aura certainement des conséquences sur les invertébrés non-cibles plus importantes que l'absence de tout traitement contre les ravageurs cibles. Ces conséquences seront toutefois beaucoup plus limitées que celles liées aux traitements insecticides. Il est utile, dans ce contexte, de noter qu'environ 10% des champs de maïs conventionnels (environ 300 000 ha sur 3 000 000 ha sont actuellement traités aux insecticides en France).

D'autres facteurs que les traitements insecticides (rotations des cultures, labours, surfaces relatives des diverses cultures, changements du paysage, variations climatiques...) ont, pris dans leur ensemble, de fortes influences sur les densités des espèces non-cibles.

La seule possibilité de mettre en évidence une «dérive» (augmentation ou réduction significative) des populations des invertébrés non-cibles est la mise en place d'un suivi pendant plusieurs années de ces invertébrés –ex : une sorte d'observatoire général. Les difficultés de ce suivi sont: (1) le choix des espèces à suivre, (2) l'échelle d'observation et (3) la difficulté de relier les variations d'abondance aux différentes variables explicatives (maïs Mon810, autres variétés transgéniques, pratiques culturales, surfaces relatives des différentes cultures, conditions environnementales....).

Il est particulièrement difficile de prédire l'influence des variations d'abondance des populations sur le devenir à moyen et long terme des espèces non-cibles, qu'elles soient liées au maïs Mon810 ou non.

Il est encore plus difficile de prédire l'effet de ces variations de densité sur les autres composantes des agrosystèmes. Ce point est souligné par Marvier et al. (2007) : “*Studies such as those synthesized here investigate whether changes in invertebrate abundance are statistically significant. Whereas the lack of a difference is generally considered a signal of environmental safety, it is harder to interpret whether statistically significant differences in abundance translate into ecologically important changes*” (Les études comme celles ici résumées ont étudié la significativité des changements numériques de quantité de l'abondance de vertébrés. Bien qu'une absence de différence soit considérée comme un gage de sûreté, il est plus difficile de prédire qu'une différence statistique d'abondance se traduira par un changement important sur le plan écologique. Traduction JCP).

Enfin, il est tout aussi difficile de prédire la réversibilité d'éventuels changements que pourrait entraîner la culture du maïs Mon810 sur les invertébrés non-cibles et ses éventuelles répercussions sur l'agrosystème dans son ensemble.

5) Résistance au maïs Mon810 parmi les insectes cibles

Rapporteurs : D Bourguet & Y Le Maho

a) Introduction :

La résistance est un indéniable problème économique. En revanche, la sélection d'allèles de résistance dans les populations des insectes cibles ne fait encourir *a priori* aucun risque environnemental. La perte de sensibilité de ces insectes n'engendre *a priori* aucun impact sur l'agroécosystème. Une absence totale d'efficacité du maïs Mon810 reviendrait en effet à une simple absence de traitement. La perte d'efficacité pose toutefois le problème de la perte d'une « arme » utile pour lutter contre la pyrale du maïs et la sésamie dont l'impact sur l'environnement est moins important que les traitements insecticides (voir la partie impact sur l'entomofaune non-cible). C'est cette volonté de préserver l'efficacité des toxines de Bt qui a conduit l'agence de la protection environnementale américaine (EPA) à considérer les toxines de Bt en tant que « Bien public » (*public good*).

b) Etudes bibliographiques :

De nombreuses sélections par la toxine Cry1Ab ont été conduites en laboratoire (voir la revue de Tabashnik et al. 2008). De même de nombreux échantillonnages ont été réalisés dans l'optique de détecter des individus résistants en champs (voir la revue de Tabashnik et al. 2008). À ce jour, il n'existe toutefois aucune souche ou population naturelle de pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) ou de sésamie (*Sesamia nonagrioides*) capable de boucler son cycle de vie sur du maïs Mon810 (ex :. Huang et al. 2002, Alves et al. 2006, Li et al. 2007, Crespo et al. 2009).

Les souches les plus résistantes d'*O. nubilalis* sélectionnées à ce jour sont entre 800 et 2000 fois plus résistantes à la toxine de Cry1Ab que les souches sauvages (Alves et al. 2006, Crespo et al. 2009). Ces résistances sont autosomales, multigéniques et récessives à co-dominantes. Les larves de ces souches sont capables de survivre une quinzaine de jours dans les parties reproductives du maïs Mon810 –c-à-d.. les

parties contenant les plus faibles concentrations de toxine Cry1Ab. En revanche les larves sont incapables de se développer sur les parties végétatives du maïs Mon810 (Crespo et al. 2009).

Des résistances d'un niveau suffisamment élevé pour permettre un développement sur des maïs Mon810 ont été détectées chez trois insectes cibles non européens : *Busseola fusca* (en Asie, Van Rensburg, 2007), *Diatraea saccharalis* (aux USA, Huang et al. 2007, Wu et al. 2009) et *Ostrinia furnacalis* (en Chine, Xu et al. soumis). Il n'y a, à priori, aucune raison de penser que de telles résistances ne puissent pas être sélectionnées dans les populations européennes d'*O. nubilalis* et *S. nonagrioides*. C'est la raison pour laquelle, à juste titre, le pétitionnaire propose la mise en place d'un plan de gestion de la résistance et un suivi de l'évolution de la résistance pour ces deux espèces.

Il est impossible de statuer sur les raisons de l'absence de résistance au maïs Mon810, à ce jour, chez *O. nubilalis* et *S. nonagrioides*. Cette absence de résistance peut s'expliquer de manière non exclusive par :

- Un taux d'adoption encore limité du maïs Mon810, y compris dans les pays où il est fortement cultivé. En effet, le taux d'adoption, y compris aux Etats-Unis, reste < 50%. Dans les «comtés» où l'adoption est la plus forte, il reste encore 10 à 20% des producteurs qui sèment leurs champs en variétés non-transgéniques. Ce maintien de champs conventionnels contribue à limiter la pression de sélection en faveur d'allèles de résistance.
- L'obligation de cultiver des maïs conventionnels (i.e. la mise en place de zones refuges). Ces champs – connus sous le nom de zones refuges – limitent là encore la sélection de résistances. La contrainte de planter des zones à proximité des parcelles de maïs Bt limite, a priori, d'autant plus le risque d'évolution de la résistance (Andow et Alstad 1995).
- Une fréquence initiale particulièrement faible des allèles conférant des taux de résistance élevés. Si la fréquence des allèles conférant une résistance au maïs Mon810 était particulièrement faible initialement –c-à-d.. avant l'introduction des maïs Bt – il n'est pas surprenant que la résistance reste encore indétectable. Par exemple, l'augmentation de la fréquence de 10^{-7} à 10^{-4} , soit d'un facteur mille, est impossible à détecter.
- Un coût important lié à ces allèles en l'absence de sélection. Les allèles conférant une résistance peuvent en effet avoir un effet délétère sur des traits d'histoire de vie, comme la reproduction, la vitesse de développement, etc... (Gassmann et al. 2009). Une diminution de la valeur sélective associée à de tels allèles diminue, en l'absence de sélection par la toxine, leur fréquence dans les populations naturelles.

- Une résistance récessive. La résistance aux toxines de Bt est souvent récessive (Tabashnik et al. 2008), ce qui limite d'autant la vitesse de sélection des allèles conférant cette résistance.
- La génétique (niveau de résistance, degré de dominance et coût de la résistance) de la résistance aux doses produites par les parties végétatives du maïs Mon810 dans les deux espèces cibles européennes – *O. nubilalis* et *S. nonagrioides* – est inconnue et le restera tant qu'aucune souche ou population naturelle résistante à ces maïs ne sera disponible. De même si nous savons que la fréquence des allèles de résistance au maïs Mon810 est $< 10^{-3}$ dans les populations d'*O. nubilalis* (Bourguet et al. 2003, Stodola et al. 2006), nous n'avons pratiquement aucune donnée sur la fréquence de tels allèles dans les populations de *S. nonagrioides* (Andreadis et al. 2007).
- L'absence de donnée sur la dynamique de la résistance et sur la fréquence précise des allèles conférant une résistance aux doses de toxines produites par les maïs Mon810, rend aléatoire toute prédiction quant à la vitesse à laquelle la résistance sera sélectionnée dans les populations naturelles d'*O. nubilalis* et *S. nonagrioides*.

Dès lors, vouloir éviter ou retarder, de combien d'années ?, l'apparition des résistances est une décision politique. Se prononcer sur l'efficacité de la stratégie de gestion de la résistance proposée par le pétitionnaire, ne peut se faire sans connaître ce choix.

La mise en place de zones refuges, proposées par le pétitionnaire, permettra de réduire l'intensité de la sélection et donc, au minimum, de retarder l'évolution de la résistance.

Il est impossible de savoir si cette quantité de refuges sera suffisante pour éviter l'apparition de résistance dans les populations d'*O. nubilalis* et *S. nonagrioides*. Si cette quantité permettra, à n'en pas douter, de retarder la résistance, il est impossible de calculer avec précision le nombre d'années ou de décennies qui sépareront la mise en place des premiers champs de maïs Mon810 et la généralisation de la résistance dans les populations de pyrale et de sésamie.

6) Plan de surveillance post-commercialisation

Rapporteurs : C Regnault-Roger, Y Bertheau & J Pagès.

a) Introduction :

Plan de surveillance post-commercialisation (PSPC) concernant les demandes (EFSA-GMO-RX-MON810) de renouvellement de l'autorisation permettant la poursuite de la mise sur le marché (1) d'aliments et d'ingrédients alimentaires existants produits à partir du maïs Mon 810 génétiquement modifié résistant aux

insectes; (2) d'aliments pour animaux consistant en et/ou contenant du maïs Mon810, y compris l'utilisation des semences en vue de leur culture; et (3) d'additifs destinés à l'alimentation humaine et animale, et de matières premières pour aliments des animaux obtenus à partir de maïs Mon810, toutes soumises par Monsanto dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003.

L'exposé suivant s'attachera à répondre aux questions concernant le PSPC soulevées par plusieurs États-membres en vue du renouvellement de l'autorisation du Mon810.

Le cadre légal des PSPC est rappelé en annexe.

Le PSPC du dossier (EFSA-GMO-RX-MON810) concerne la surveillance liée à la mise sur le marché :

- d'aliments, ingrédients et additifs destinés à l'alimentation humaine et animale ;
- de semences en vue de leur culture.

Ces deux niveaux ne relèvent pas des mêmes dispositifs de surveillance post-commerciaux.

b) Plan de surveillance générale pour aliments, ingrédients et additifs destinés à l'alimentation humaine et animale :

En ce qui concerne une dissémination qui pourrait être accidentelle lors d'un transport de grains ou du traitement, 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. Le maïs présente un pouvoir de dispersion par la voie des graines très limité. Le maïs n'est pas une culture envahissante. Les repousses de maïs ne sont pas un problème en Europe. La plante est sensible au froid et les éventuelles repousses peuvent être efficacement contrôlées par les pratiques agricoles courantes, notamment par l'utilisation d'herbicides ou arrachage. Le comportement du maïs génétiquement modifié Mon810 n'est donc pas différent de celui des variétés de maïs conventionnelles.

Le risque doit être géré par les bonnes pratiques de surveillance proposées par le Comité de surveillance biologique du territoire (Décret n° 2008-1282 du 8 décembre 2008), en accord avec le dispositif mis en place par la loi n° 2008-595 du 25 juin 2008 et en conformité avec la directive 2001/18, le règlement 1829/03 et la décision européenne 2009/770/CE du 13 Octobre 2009.

c) Plan de surveillance spécifique et général post-commercialisation (PSPC) lié à la culture en champ.

c.1. Outils mis en place, et démarches suivies par le pétitionnaire pour le maïs Mon 810 :

Le maïs Mon810 est régulièrement cultivé en Europe depuis plusieurs années et dans un nombre croissant de pays (9 en 2008). Des rapports sur la surveillance

PSCP sont rédigés par la société Monsanto chaque année et sont communiqués à la CE et aux Autorités compétentes nationales.

Il s'agit donc d'une expérience documentée sur plusieurs années qui permet d'évaluer l'efficacité des dispositifs mis en place. Le dernier rapport (juillet 2009) indique que de nouvelles dispositions en matière de PSCP ont été mises en œuvre de manière à prendre en compte les remarques et recommandations de l'AESA effectuées en 2007/2008, et les interrogations soulevées par plusieurs Etats-membres (lettre adressée au Commissaire européen pour l'environnement Stavros Dimas).

Le Groupe de travail sur la gestion de la résistance des insectes dans l'Union Européenne (EUWGIRM), formé par quatre sociétés semencières (Monsanto, Syngenta Seeds, Pioneer Hi-Bred Int Inc, Dow AgroSciences) et créé en 2001, a ainsi diligenté trois actions prioritaires de suivi concernant : les zones refuges, surveillance et définition d'une ligne de base de la sensibilité des insectes cibles, communication et éducation des utilisateurs du MON 810.

c.1.1 Les zones refuges :

Cette action est réalisée dans le cadre de la gestion du risque de la résistance des insectes à la protéine Cry1Ab (exprimée par le maïs Mon 810). Sans préjuger de la controverse (Le Maho, 2008; Bergé et Ricroch, 2008) sur l'existence d'une résistance non-avérée sur le terrain des ravageurs au maïs Mon810 (Farinós et al, 2004), elle s'inscrit dans le cadre du plan EUWGIRM du 13 janvier 2003.

Suivant en cela les études réalisées aux USA et en Argentine dès les années 2000 et leurs conclusions, une campagne concernant les zones refuges a été effectuée en Espagne en 2008/2009 en association avec l'ANOVE (Asociación Nacional de Obtentores VEgetales, équivalent du Comité des obtentions végétales en France) sur, selon la réglementation en vigueur, les zones plantées en maïs transgénique de plus de 5 ha. Des zones refuges représentant 20% de la superficie plantée ont été créées sur une ou plusieurs parcelles situées au plus près des parcelles de maïs Bt, et dans tous les cas à une distance de moins de 750 m de la culture Bt. Des inspections vérifient le respect de cette disposition, et des dispositifs de parcelles incluant zones plantées et zones refuges sont préconisées par l'ANOVE. Une large publicité par voie de formation par des conseillers agricoles, d'affiches et par courrier est réalisée auprès des agriculteurs qui cultivent du maïs Mon810.

c.1.2 Surveillance et définition d'une ligne de base de la sensibilité des insectes cibles :

Une autre approche est de vérifier la sensibilité des insectes visés (*O.nubilalis* et *S.nonagroides*) à la protéine Cry1Ab. Mentionnée dans le plan EUWGIRM du 13 janvier 2003, cette démarche a été mise en œuvre pour définir la ligne de base de la sensibilité à la protéine de la pyrale du maïs (*O.nubilalis*) en Europe. Dans une vaste étude réalisée sur 15 zones situées dans 10 pays européens (Portugal, Espagne, France, Allemagne, Italie, Pologne, Rep.Tchèque, Slovaquie, Hongrie, Roumanie), des pyrales ont été prélevées dans différents sites au cours de campagnes réalisées entre 2005 et 2009. 51 populations de pyrales ont été réunies en Allemagne et des études d'inhibition de la croissance (MIC₅₀) et de mortalité ont été réalisées sur les

larves nouvelles-nées en présence de quantités de protéines Cry1Ab purifiées incorporées dans le régime alimentaire pendant 7 jours. Les résultats indiquent que les populations européennes de pyrale du maïs sont sensibles de manière uniforme à la protéine CRy1Ab, c'est-à-dire que les résultats obtenus traduisent la variabilité naturelle de la sensibilité à la protéine Bt sans différenciation d'origine géographique notable. Cette étude a été réalisée par un laboratoire indépendant, les insectes ont été prélevés par des organismes indépendants (en France par exemple, parmi les intervenants, les SRPV et les FREDON) et le financement de l'opération a été assuré par Monsanto (Monsanto Europe SA, 2009, appendice 8.2).

c.1.3 Suivi de la faune non cible :

En matière d'effets sur les espèces non-cibles, il a été mis en place en Allemagne une biosurveillance qui relève d'un accord signé entre le pétitionnaire et l'Autorité nationale compétente (BVL) au début de l'année 2007. Cette démarche, qui s'appuie sur l'étude des résultats obtenus par les observations de réseaux existants privés ou publics, a été une condition de levée du moratoire de 2007 de mise en culture.

En conséquence, les résultats de plusieurs associations (protection des oiseaux ou surveillance des abeilles, ou de la vie sauvage et de la biodiversité) ont été utilisés pour la surveillance générale, et les travaux ont donné lieu à plusieurs publications dans des revues internationales (Monsanto Europe SA, 2009, appendice 9).

À titre d'exemples :

- Pour la faune sauvage : suivi des renards rouges, blaireaux, perdrix.
- Pour les abeilles : suivi réalisé par le Réseau allemand de surveillance des abeilles dans le cadre par exemple du programme DEBIMO.
- Surveillance des sols : propriétés physico-chimiques et micro-organismes.
- Analyses de la biodiversité dans les agrosystèmes etc...

Le suivi des espèces est réalisé dans chaque région selon des méthodologies adaptées se basant sur le savoir-faire des réseaux. Le pétitionnaire vérifie que les résultats obtenus région par région ne montrent pas de variation significative qui pourrait être imputée au maïs Mon810, qui n'est pas cultivé dans toutes les régions. Il ne s'agit pas d'études ciblées sur le maïs Mon810 mais d'une biosurveillance générale d'espèces particulières sensibles. Ces réseaux sont des réseaux indépendants de surveillance de la biodiversité.

c.1.4 Communication et éducation :

La diffusion d'un questionnaire auprès des utilisateurs du maïs Mon810 par le pétitionnaire constitue un outil clef de la surveillance puisqu'il peut donner une première alerte en cas d'effets inattendus. Ce questionnaire porte sur les observations que pourraient faire les utilisateurs sur des phénomènes de terrain (pédologique et climatique), le suivi des écosystèmes et des espèces présentes habituellement sur les parcelles, 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.

L'augmentation des surfaces cultivées en maïs Mon810 s'est traduite par une augmentation du nombre des questionnaires diffusés dans chaque pays. Ainsi 132 sites participaient au plan de surveillance PSPC en 2006 et 297 en 2008.

Différentes remarques sur le questionnaire élaboré par le pétitionnaire ont été effectuées par le groupe OGM de l'AESA (EFSA Journal 2009,1149 :1-84) et des rectifications ont été opérées dès la campagne 2008 (Monsanto Europe SA, 2009, appendice 7). Les analyses des données recueillies et les traitements statistiques, sont réalisées selon des protocoles établis. On constate que le rapport du pétitionnaire ayant été établi antérieurement à la publication des nouvelles règles d'analyse statistique proposées par l'AESA (2009b), les résultats présentés ne suivent pas ces récentes recommandations.

Cette démarche « questionnaire » est complétée par la mise en place d'une formation préalable dispensée aux conseillers agricoles et auprès des coopératives pour les sensibiliser à la technologie Bt et à la biosurveillance des parcelles concernées, ainsi qu'une information auprès des agriculteurs.

Enfin, une veille scientifique et des analyses bibliographiques, vérifient si des éléments nouveaux sur la connaissance de la technologie Mon810 et des effets adverses du maïs Mon810 pourraient modifier son impact.

c. Commentaires :

Le rapport 2009 de Monsanto Europe S.A. concernant le PSPC de la culture en champ du maïs Mon810 pendant la campagne 2008 fait ainsi état, d'éléments nouveaux qui complètent le dossier déposé, dans l'approche mise en œuvre par le pétitionnaire.

Ces éléments nouveaux concernent :

- le suivi de zones refuges telles que définies par le plan de gestion de la résistance des insectes (IRM plan), et intervention de l'Association Nationale des Obtentions Végétales (ANOVE) sur les dispositifs mis en place en Espagne.
- la définition de la variabilité de la ligne de base de la sensibilité de la pyrale du maïs *O.nubilalis* à la protéine Cry1Ab; dans 10 pays européens
- le suivi de la faune non-cible par des collaborations avec les réseaux existants en Allemagne afin de vérifier que la présence de maïs Mon810 dans une région n'est pas la cause des variations observées. Il ne s'agit pas d'études ciblées sur la culture de maïs Mon810 mais d'une biosurveillance générale de la biodiversité.
- l'état des agrosystèmes cultivés en présence du maïs Mon810 par le biais de questionnaires améliorés.
- des actions de sensibilisation et d'éducation des utilisateurs de maïs Mon810 à cette technologie.

Si, par ces dispositions, l'ensemble des interrogations posées par certains Etats-membres ne reçoit pas toutes les réponses, des outils et démarches méthodologiques nouveaux ont été mis en œuvre.

Les questions soulevées par la lettre au Commissaire S. Dimas ne relèvent d'ailleurs pas toutes de la seule sphère d'action du pétitionnaire, mais bien plus d'une biosurveillance générale que les Autorités nationales compétentes, gestionnaires du risque, se doivent de mettre en œuvre. Des programmes dédiés de la recherche publique devraient aussi être diligentés.

Pour illustrer le propos, on prendra l'exemple de la demande concernant l'étude du développement de la résistance des espèces-cibles à la protéine Cry1Ab. Cette demande ne concerne pas que la technologie des PSGM (Plantes supérieures génétiquement modifiées) mais aussi la technologie de protection des plantes basée sur le biocontrôle des bio-agresseurs par utilisation de la lutte biologique à l'aide de micro-organismes. En toute logique, la biosurveillance de la résistance des pyrales à la protéine Cry1Ab doit autant se préoccuper de l'exposition aux maïs transgéniques qu'aux biopesticides à base de Bt. En effet, on sait que, depuis de nombreuses années, les formulations phytopharmaceutiques à base de *Bacillus thuringiensis* Bt (ex : le Dipel®), font partie de la panoplie des biopesticides les plus vendus dans le monde (Fargues et Bourguet, 2005 ; Regnault-Roger et al, 2005). Ces biopesticides sont actifs grâce aux endotoxines de la bactérie, la protéine Cry1Ab qu'ils expriment étant plus longue que celle exprimée dans le maïs Mon810. Ils contribuent ainsi à exposer la pyrale à la protéine Cry1Ab, et ce, depuis plus de 35 ans. Le maïs Mon810 n'est donc pas le seul facteur d'exposition de la protéine Cry1Ab pour la pyrale du maïs. D'ailleurs plusieurs recherches ont été conduites (Huang et al, 2002; Dutton et al, 2005; Huarong et al, 2007), pour voir quelle incidence une résistance au Dipel® pouvait avoir sur le comportement des insectes vis-à-vis de plantes transgéniques et quelles en seraient les conséquences sur l'efficacité de ces plantes. Ces études qui dépassent le cadre d'une surveillance post-commercialisation du maïs Mon810, sont cependant essentielles pour comprendre les mécanismes en jeu, et permettre ainsi une réponse étayée aux interrogations posées par plusieurs Etats-membres.

Par conséquent, s'il est du ressort du pétitionnaire ou d'une quelconque société semencière privée, commercialisant l'événement transgénique, d'adresser un questionnaire aux utilisateurs qui ont choisi de mettre en œuvre la technologie Mon810, s'il est du devoir pour ces mêmes sociétés d'informer les utilisateurs sur les spécificités de la technologie employée et des précautions à observer, il n'est pas de son autorité de diligenter un système de biosurveillance nationale ou européenne qui relève des Autorités nationales compétentes ou des Instances Européennes, seules gestionnaires du risque.

C'est pourquoi, il faut distinguer deux niveaux pour le PSPC : celui des pétitionnaires et celui des Autorités nationales compétentes.

En ce qui concerne le pétitionnaire :

Le CS du HCB se doit d'indiquer au pétitionnaire (il s'agit d'une remarque qui a vocation à être exprimée à l'ensemble des pétitionnaires) qu'en matière de questionnaire pour la surveillance post-commercialisation, il doit se référer dorénavant la décision de la commission C (2009) 7680 publiée le 13 octobre 2009. Cette décision explicite et complète l'annexe VII de la directive 2001/18/CE. Si l'annexe VII décrit en termes généraux les objectifs à atteindre et les grands principes à suivre lors de l'élaboration du plan de surveillance, la décision C(2009) 7680 du 13-10-09 établit « *des formulaires types pour la présentation des résultats de la surveillance relative à la dissémination volontaire dans l'environnement d'organismes génétiquement modifiés, en tant que produits ou éléments de produits,*

aux fins de leur mise sur le marché, conformément à la directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil ».

De la même façon, l'analyse des données recueillies et des traitements statistiques doivent se référer désormais aux nouvelles règles d'analyse statistique proposées par l'AESA (2009b), qui recommandent la mise en œuvre de procédures statistiques adaptées. Appliqués à la démarche du questionnaire, cela implique que la distribution du questionnaire aux utilisateurs soit représentative des surfaces cultivées consacrées au maïs Mon810 dans chaque pays, et que le traitement des données ainsi que la présentation des résultats soient réalisées de manière à pouvoir rendre plus facile le suivi, d'une année à l'autre, des évolutions en cours.

Les actions relatives à la formation préalable 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 devraient 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 difficilement 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.

Enfin, le CS du HCB se doit de rappeler au pétitionnaire qu'il est de son devoir, au cours de la période couverte par l'autorisation accordée, d'apporter son concours, quand celui-ci sera sollicité, au Comité de surveillance biologique du territoire dans le cadre de la biosurveillance liée à l'utilisation des biotechnologies qu'il commercialise. 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.

En ce qui concerne les Autorités nationales compétentes :

En France, c'est au Comité de surveillance biologique du territoire, prévu dans le cadre de la loi n° 2008-595 du 25 juin 2008 et créé par le Décret n° 2008-1282 du 8 décembre 2008, qu'il appartiendra de proposer un réseau de biosurveillance du territoire et de définir son champ d'action qui relèvera des autorités compétentes. Ce Comité fait suite à un comité de biovigilance prévu par la loi d'orientation agricole n° 99-574 du 9 juillet 1999. Si celui-ci n'a jamais été jamais été installé formellement, un comité provisoire a néanmoins provoqué des études sur la gestion des adventices ou encore sur les relations tritrophiques entre les plantes les insectes ciblés et leur cortège, et la mycoflore pathogène.

Des recommandations générales concernant la biosurveillance des biotechnologies sont portées en annexe. On insistera sur le fait que la biosurveillance liée à l'emploi de la protéine Cry1Ab ne doit pas concerner que le seul maïs Mon810 mais également toute technologie de contrôle des lépidoptères foreurs du maïs qui dans ses itinéraires phytopharmaceutiques utilise des formulations à base de *Bacillus thuringiensis*.

7) Effets sur la santé

Le CS a pris note que l'AFSSA avait fait l'objet d'une saisine parallèle sur la question des impacts sur l'alimentation humaine de l'introduction commerciale du maïs Mon810. Certains aspects des conséquences sur la santé ont été abordés dans les paragraphes précédents.

Le CS a examiné le contenu en mycotoxines du maïs Mon810 (Rapporteur C Regnault-Roger).

Le règlement européen (CE) N°1126/2007 de la commission du 28 septembre 2007 fixe des teneurs maximales en mycotoxines dans les céréales (seuils réglementaires de 4000 ppb pour les fumonisines B₁/B₂, 1750 ppb pour le déoxynivalénol (DON) et 350 ppb pour la zéaralénone) afin de garantir la qualité sanitaire des récoltes) (JO UE, 2007). Les mycotoxines sont en effet source de pathologies sévères autant pour les humains que pour le bétail. Les symptômes diffèrent selon les familles de mycotoxines (AFSSA, 2006 ; Miller, 2008).

En France, pour répondre à cette nouvelle réglementation et afin de vérifier si les récoltes françaises répondaient aux nouvelles exigences européennes, des études ont été réalisées dans le cadre du « Réseau de biovigilance » mis en place par le Ministère de l'Agriculture et plus particulièrement suivies par les Services de la protection des végétaux (SPV) (Delos *et al.*, 2005).

Un premier état des lieux des relations plantes, insectes, champignons toxigènes et toxines associées en conditions naturelles a été dressé (Weissenberger *et al.*, 2006). En matière de mycotoxines, on constate ainsi qu'il existe sur le maïs une prévalence des fumonisines, des trichothécènes et de la zéaralénone selon une distribution géographique où les fumonisines dominent dans le Sud de la France. Les espèces de *Fusarium* productrices de ces mycotoxines sont rencontrées sur le territoire français. *F. graminearum* et *F. culmorum* qui biosynthétisent des trichothécènes, sont abondants dans la partie nord de la France tandis que *F. verticillioïdes (ex-moniliforme)* et *F. proliferatum*, qui se développent sur les épis de maïs et biosynthétisent les fumonisines, préfèrent des températures plus élevées pour se développer et se retrouvent plus fréquemment dans le sud de la France.

Outre les *Fusarium* spp, la culture du maïs en France a comme bio-agresseurs des insectes foreurs inféodés, la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Hübner) et la sésamie *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). D'autres ravageurs, les cirphis et héliothis, sont ponctuellement abondants mais moins couramment retrouvés (Naïbo, 1996).

D'après Sobek et Munkvold (1999), les insectes favorisent le développement des fusarioses, d'une part en véhiculant les spores et d'autre part en causant des blessures sur les grains qui faciliteront l'installation du champignon. La contamination en mycotoxines a été corrélée positivement avec les dégâts dus aux insectes *Ostrinia nubilalis* (Bakan *et al.*, 2002) et *Sesamia nonagrioides* (Avantaggiato *et al.*, 2003). Munkvold *et al.* (1999) observent que les dégâts causés par ces insectes constituent un facteur aggravant en matière d'installation des *Fusarium* spp.

Des observations réalisées à partir des réseaux de surveillance nationale du territoire de la SPV ont souligné qu'un lien pouvait être établi entre des traitements agrochimiques et la réduction des teneurs en mycotoxines. Le traitement par insecticides diminue les concentrations des fumonisines, trichothécènes et zéaralénone et correspond à une diminution de la baisse de pression des ravageurs, tandis qu'un traitement additionnel par fongicide se révèle sans effet (Folcher *et al.*, 2009a).

Des travaux impliquant du maïs *Bt*, contrôlant les lépidoptères, sont en accord avec ces observations. Selon Wu (2006), le maïs *Bt* apparaît comme essentiel pour prévenir la contamination par les mycotoxines. Clements *et al.* (2003) ont étudié l'influence de la protéine Cry1Ab sur la contamination par les fumonisines et les *Fusarium* spp. du maïs, et ont émis l'hypothèse d'un lien entre les dégâts engendrés par la larve d'*O. nubilalis*, l'installation de *Fusarium* spp. et la production de mycotoxines. D'autres expérimentations implantées en Europe centrale ont conclu que les maïs hybrides de type *Bt* réduisaient les teneurs en fusariotoxines du maïs (Magg *et al.*, 2002; Magg *et al.*, 2003).

En France, Grenouillet (2006), dans un essai de 4 micro-parcelles réalisé sur 7 campagnes, démontre que le maïs Mon810 réduit les teneurs en zéaralénone, déoxynivalénol (DON) et fumonisine B1. Durant la même période, des essais au champ ont été menés en conditions naturelles durant les étés 1998, 1999, 2005 et 2006 dans le sud-ouest de la France et surveillés par les Services de la protection des végétaux (SPV) du ministère de l'Agriculture et par les Fédérations régionales de défense contre les organismes nuisibles (FREDON). Après avoir vérifié les niveaux de contrôle de la pyrale du maïs et de la sésamie par les événements transgéniques Bt 176 et Mon810 (Folcher *et al.*, 2006), il a pu être établi qu'une relation liait la mycoflore observée et les teneurs en mycotoxines (fumonisines B1 et B2, trichothécènes et zéaralénone) et les lépidoptères foreurs (Folcher *et al.*, 2009b). Si on constate une réduction importante de la teneur des mycotoxines totales, des fumonisines et de la zéaralénone, les teneurs en DON sont en revanche en augmentation. Sur les 84 parcelles expérimentales dans lesquelles sont plantées en parallèle du maïs isogénique et du maïs Mon810, on constate que 55% des parcelles cultivées avec du maïs isogénique ne peuvent être commercialisées en raison d'une teneur en fumonisines au-delà des seuils européens tandis que 15% des parcelles de maïs Mon810 excèdent le seuil européen en DON, toutes les parcelles ayant une teneur en zéaralénone en dessous du seuil autorisé (Folcher *et al.*, 2008). Des expériences menées au Canada, qui relèvent d'autres conditions climatiques et d'écosystèmes différents, n'observent pas d'augmentation mais une réduction des trichothécènes (Schaafsma *et al.*, 2002).

Ces résultats soulignent que lorsque les insectes sont efficacement contrôlés, les teneurs en mycotoxines sont réduites dans les grains récoltés. Il existe un lien entre les niveaux de population d'insectes et les teneurs en mycotoxines à la récolte. Le contrôle des lépidoptères foreurs, pyrale et sésamie, au-delà des pertes de récolte qu'ils provoquent, a un impact non seulement sur la qualité sanitaire du maïs mais aussi sur sa commercialisation.

Ces aspects économiques sont particulièrement importants dans le Sud-Ouest de la France où les lépidoptères foreurs, pyrale et sésamie, développent plusieurs

génération par an (multivoltinisme). Ils sont peut-être moins aigus dans le nord-est de la France où la pyrale est monovoltine (une seule génération par année) (Delos *et al.*, 2007). Ce multivoltinisme conduit ainsi à plusieurs traitements insecticides au cours de l'été dans le Sud ouest de la France.

Dans ces conditions et au vu des expérimentations réalisées en France, la technologie du maïs Mon810, qui contrôle efficacement la pyrale et la sésamie, apparaît comme une alternative pour satisfaire les exigences sanitaires des aliments de l'homme et de l'animal, diminuer les risques économiques liés aux bio-agresseurs de la culture, et aussi répondre aux objectifs de diminution de 50% des pesticides utilisés en agriculture fixés par le programme Ecophyto 2018.

8) Références bibliographiques

La principale source de documentation est la revue de Clark et coll., 2005, *J. Agric. Food Chem.* 53 : 4643-4653.

AESA, 2009a. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms on applications (EFSA-GMO- RX-MON810) for the renewal of authorisation for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize MON810; (2) feed consisting of and/or containing maize MON810, including the use of seed for cultivation; and of (3) food and feed additives, and feed materials produced from maize MON810, all under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *The EFSA Journal* 1149, 1-84.

AESA, 2009b Scientific Opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) (*The EFSA Journal* 2009; 1250: 1)

Beachy, R.N., Fedoroff, N.V., Goldberg, R.B., McHughen, A., 2008. The burden of proof: A response to Rosi-Marshall et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: E9.

Duan, J.J., Marvier, M., Huesing, J., Dively, G., Huang, Z.Y., 2008. A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS One*, 3: 1-6 (e1415).

Malone, L.A., Burgess, E.P.J., 2009. Impact of genetically modified crops on pollinators. In: Ferry, N., Gatehouse, A.M.R. (Eds.), *Environmental Impact of Genetically Modified Crops*, CAB International, pp. 199-222.

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

Naranjo, S.E. 2009. Impact of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. *CAB Review: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4, No. 011.

Parrot, W., 2008. Study of Bt impact on caddisflies overstates its conclusions: Response to Rosi-Marshall et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: E10.

Rosi-Marshall, E.J., Tank, J.L., Royer, T.V., Whiles, M.R., Evans-White, M., Chambers, C., Griffiths, N.A., Pokelsek, J., Stephen, M.L., 2007. Toxins in transgenic crop by products may affect headwater stream ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 16204-16208.

Sears, M.K., Hellmich, R.L., Siegfried, B.D., Pleasants, J.M., Stanly-Horn, D.E., Oberhauser, K.S., Dively, G.P., 2001. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: a risk assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 11937-11942.

Wolfenbarger, L.L., Naranjo, S.E., Lundgren, J.G., Bitzer, R.J., Watrud, L.S., 2008. Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. *PLoS ONE*, 3: 1-11 (e2118).

Zwahlen, C., Hilbeck, A., Howald, R., Nentwig, W., 2003b. Effects of transgenic Bt

corn litter on earthworm *Lumbricus terrestris*. *Molecular Ecology*, 12: 1077-1086.

Alves, A.P., Spencer, T., Tabashnik, B.E., Siegfried, B.D., 2006. Inheritance of resistance to the Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology*, 99: 494-501.

Alstad D.N., Andow D.A., 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*. 268: 1894-1896.

Andreadis, S.S., Alvarez-Alfageme, F.A., Sánchez-Ramos, I., Stodola, T.J., Andow, D.A., Milonas, P.G., Savopoulou-Soultani, M., Castañera, P., 2007. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 100: 195-201.

Bergé JB ,Ricroch A, 2008, Analyse du rapport Le Maho, AFIS Sciences, <http://agribiotech.free.fr/phpBB2>)

Bourguet, D., Chaufaux, J., Séguin, M., Buisson, C., Hinton, J.L., Stodola, T.J., Porter, P., Cronholm, G., Buschman, L.L., Andow, D.A., 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1225-1233.

Crespo, A.L.B., Spencer, T.A., Alves, A.P., Hellmich, R.L., Blankenship, E.E., Leonardo C Magalhaes, L.C., Siegfried BD. 2009. On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Pesticide Management Science*, 65: 1071-1081.

Dutton A, Romeis J, Bigler F , 2005, Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis* *Entomol Exp Appl*, 114 : 161-169

Farinós, G. P., M. de la Poza, P. Hernández-Crespo, F. Ortego, and P.Castañera. 2004. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomol. Exp. Appl.* 110:23-30.

Fargues J., Bourguet D 2005, La lutte microbiologique contre les insectes ravageurs des cultures : contraintes, bilan et perspectives. *In* : Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, C. Regnault-Roger (Ed), Tec et Doc Lavoisier, Paris, p 549-570

Gassmann, A.J., Carrière, Y., Tabashnik, B.E., 2009. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*. 2009. 54:147-63

Huang, F.N., Buschman L.L., Higgins R.A. Li, H, 2002. Survival of Kansas Dipel resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt and non-Bt corn hybrids. *Journal of Economic Entomology* 95:614-621.

Huang F, Leonard, B.R., Andow, D.A. 2007. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize. *Journal of Economic Entomology* 100: 164-171.

Huarong L., Buschman L.L. , Huang F , Zhu K.Y , Bonning B, Oppert B . (2007) DiPel-Selected *Ostrinia nubilalis* Larvae Are Not Resistant to Transgenic Corn Expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab. J.Econ Entomol, 110(6) : 1862-1870)

Le Maho Y , 2008, Réponse à l'analyse réalisée le 30 janvier 2008 par la Société Monsanto de l'avis de la dissémination du MON 810 sur le territoire français.

Li H., Buschman L.L., Huang F., Zhu K.Y., Bonning B., Oppert B., 2007. Dipelselected *Ostrinia nubilalis* larvae are not resistant to transgenic corn expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab. Journal of Economic Entomology, 100: 1862-1870.

Monsanto Europe SA,2009, Annual monitoring reporting on cultivation of MON 810 in 2008 appendice 8.2 - Thieme, 2009,.

Monsanto Europe SA,2009, Annual monitoring reporting on cultivation of MON 810 in 2008 appendice 8.2 appendice 9 -09_German_Network_monitoring_Report.

Monsanto Europe SA,2009, , Annual monitoring reporting on cultivation of MON 810 in 2008 appendice 7- 07_2008_Farmer _questionnaire_survey,

Regnault-Roger C., Silvy C., Alabouvette C. 2005, Biopesticides : réalités et perspectives commerciales. *In*: Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, C. Regnault-Roger (Ed), Tec et Doc Lavoisier, Paris, p 849-880

Stodola, T.J., Andow, D.A., Hyden, A.R., Hinton, J.L., Roark, J.J., Buschman, L.L., Porter, P., Cronholm, G.B., 2006. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in southern United States corn belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Economic Entomology, 99: 502-507.

Tabashnik, B.E., Gassmann, A.J., Crowder, D.W., Carrière Y., 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory? Nature Biotechnology, 26: 199-202.

Van Rensburg, J.B.J., 2007. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. South African Journal of Plant and Soil, 24: 147-151.

Wu, X, Huang, F., Leonard, B.R., Ghimire, M., 2009. Growth and development of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab-susceptible and Cry1Ab-resistant sugarcane borer on diet and conventional maize plants. Entomologia Experimentalis et Applicata 133: 199-207.

Xu, L., Wang, Z., Zhang, J., He, K., Ferry N., Gatehouse, A.M.R. Cross-resistance of Cry1Ab-selected Asian corn borer to other Cry toxins. Journal of Applied Entomology. Soumis.

Bibliographie mycotoxines :

AFSSA, Agence Française de Sécurité Alimentaire des Aliments 2006. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale, rapport synthétique, 80p

Avantaggiato G., Quaranta F., Desiderio E., Visconti A. (2002) Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*, J. Sci. Food Agr. 83, 13–18.

Bakan B., Melcion D., Richard-Molard D., Cahagnier B. 2002 Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain, J. Agr. Food Chem. 50, 728–731.

Clements M.-J., Campbell K.-W., Maragos C.-M., Pilcher C., Headrick J.-M., Pataky J.-K., White D.-G. 2003. - Influence of Cry1Ab protein and hybrid genotype on fumonisin contamination and *Fusarium* ear rot of corn. *Crop Science*, 43, 1283-1293.

Delos M., Eychenne N., Folcher L., Hervieu F., 2005. La biovigilance : concept et applications dans les pays européens, in Regnault-Roger C.(ed), *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, p. 937-954.

Delos M., Weissenberger A., Ioos R., Folcher L., Rose S., Gérault F., Eychenne N., Regnault-Roger C. 2007. Adaptation à la France des outils de prévention de la contamination par les fusariotoxines sur maïs, *Phytoma La Défense des Végétaux*, 600 :28-31.

Folcher L., Eychenne N., Weissenberger A., Jarry M., Regnault-Roger C. Delos M. 2006 Study of effects of *Bt* maize (*Zea mays* L.) events on lepidoptera *Ostrinia nubilalis*, *Sesamia nonagrioides* in southwestern France, Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 71(2a), 227–232.

Folcher L., Jarry M., Eychenne N., Weissenberger A., Gerault F., Delos M, Regnault-Roger C. 2008 Teneurs comparées en fusariotoxines de maïs (*Zea mays* L.) isogénique et Bt (événement MON 810) dans le sud-ouest de la France pour les campagnes 2005 et 2006 Actes 8ème Conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, 23-24 octobre, Montpellier, France, Association Française des Plantes (AFPP) ISBN 2-905550-17-1, pp 652-661.

Folcher L., Jarry M., Weissenberger A., Gérault F., Eychenne N., Delos M., Regnault-Roger C. 2009a Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields, Crop Prot. 28, 302–308.

Folcher L., Jarry M., Weissenberger A., Eychenne N., Delos M., Regnault-Roger C. 2009b Biocontrol of *Ostrinia nubilalis* and *Sesamia nonagrioides* by *Bt* maize in southwestern France: Search of biological indicators by model-based approach for managing mycotoxin risks, 2009 IOBC/wprs Bull 45, 487-490

Grenouillet C. 2006 Intérêt du maïs Bt Yieldgard® (protégé de la pyrale et de la sésamie) pour limiter le risque de développement de fusarioses des épis et la présence de mycotoxines dans les grains, Actes 8^{ème} Conférence Internationale sur les Maladies des plantes, 5-6 décembre 2006. Association Française des Plantes (AFPP), Tours, France, p 260-876.

Journal Officiel de l'Union Européenne., 2007. RÈGLEMENT (CE) N°1126/2007 DE LA COMMISSION du 28 septembre 2007 modifiant le règlement (CE) N°1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs. JOUE, L255, 14-17.

Magg T., Melchinger A.-E., Klein D., 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, 146-154.

Magg T., Bohn M., Klein D., Merditaj V., Melchinger A., 2003. Concentration of moniliformin produced by *Fusarium* species in grains of transgenic *Bt* maize hybrids compared to their isogenic counterparts and commercial varieties under European Corn Borer pressure. *Plant Breeding*, 122, 22-327.

Miller J.D. 2008 Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges, *Food Addit. Contam.* 25(2), 219–230.

Munkvold G.-P., Hellmich R.-L., Rice L.-G., 1999. Comparaison of fumonisin concentration in kernel of transgenic *Bt* maize hybrids and non transgenic hybrids. *Plant Disease* 83, 130-138.

Naibo B. 1996. Les ravageurs du maïs, les Guides de l'AGPM, Montardon, 90p

Schaafsma, A.W.; Hooker, D.C.; Baute, T.S.; Tamburic-Illinic, L. 2002 Effect of *Bt* corn hybrids on deoxynivalenol content in grain at harvest. *Plant Dis.*, 86(10), 1123–1126.

Sobek E.A., Munkvold G.P. (1999) European Corn Borer (Lepidoptera : Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels, *J. Ecol. Entomol.* 92, 503–509.

Weissenberger A , loos R,, Folcher L., Regnault-Roger C., Rose S,, Gérault F.,Eychenne N., Delos M 2006. Mycotoxines en maïs : état des lieux en France et premiers éléments de gestion Actes 8ème conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours France 5-6 décembre , Association Française des Plantes (AFPP), ISBN 2-905550-07-4, p 68-70

Wu F., 2006. - Mycotoxin reduction in *Bt* corn : potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Research*, 15, 277-289.

Annexes

Cadre légal du PSPC

Objectifs et cadre législatif et réglementaire du PSPC

Selon l'annexe VII de la Directive 2001/18/EC, l'objectif de ce plan de surveillance est de :

- vérifier, par un plan de surveillance spécifique, si les assertions sur l'absence d'effets potentiellement négatifs de la plante génétiquement modifiée dans le cadre de son utilisation ainsi que de l'évaluation du risque environnemental, sont confirmées. Le plan de surveillance spécifique est destiné à mettre en évidence, au cas par cas, les changements prévisibles.
- d'identifier, par un plan de surveillance générale, 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.

Ces plans de surveillance, tels qu'ils sont prévus par la directive 2001/18 et précisés dans la décision 2009/770/CE et l'opinion EFSA-Q-2004-061, doivent permettre de vérifier que ces mesures de gestion sont bien de nature à minimiser les risques identifiés et identifier tout effet non prévu. Il est à noter que la décision 2009/770/CE rappelle l'obligation d'inclure dans les plans de surveillance générale les zones hors cultures OGM.

En France, s'ajoute le dispositif législatif sur la co-existence des filières OGM / non OGM (loi n° 2008-595 du 25 juin 2008), suivant en cela la recommandation européenne 2003/556/CE du 23 juillet 2003 et l'application du principe européen de subsidiarité.

Recommandations en matière du suivi de la surveillance

S'il appartient au Comité de surveillance biologique du territoire 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 régaliennne 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 MON 810, 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 ou autres formes) à des zones sans culture de maïs MonON810 ;
- Meilleure représentativité des pays ayant les surfaces les plus importantes et la plus longue histoire de culture de maïs Mon810 pour mieux appréhender la survenue d'évènements de faible fréquence ;
- 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, mises en place des réflexions et diverses stratégies pour permettre une co-existence des cultures dans le cadre de la gestion des territoires et des paysages.

C'est dans ce cadre que la recommandation du groupe OGM de l'AESA de "continuer à mettre en oeuvre des stratégies de gestion de la résistance des espèces nuisibles », et plus généralement son avis sur le PSPC, prend tout son sens.

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

Transfert plante à plante : Les conclusions de l'AESA dans son avis de juin 2009 concernant la dissémination du pollen de maïs à longue distance sont globalement assez proches des avis exprimés par la France. Il faut cependant noter que l'AESA envisage dans son 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 dans ce qui suit la dissémination via les graines conduisant à la formation de repousses, 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.

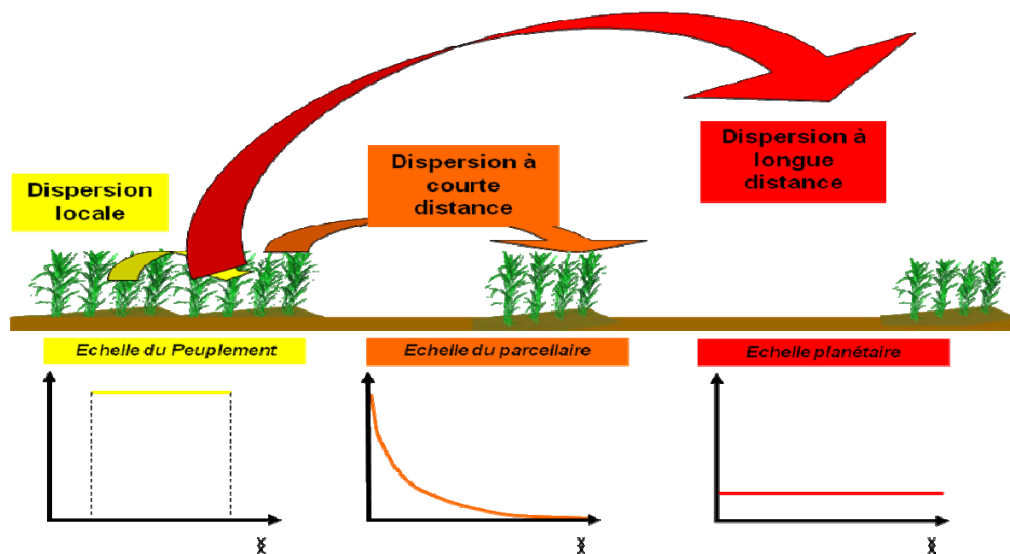


Figure 1. Echelles de dispersion du pollen de maïs (Source : Y. Brunet, INRA)

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 ; Uribe Larrea et al., 2002).

– *Dispersion des gènes via les graines*

En ce qui concerne le risque de présence d'OGM au travers de la dispersion des graines, des observations en Espagne ont mis en évidence une présence de repousses de maïs l'année suivant une culture de maïs de manière quasi-systématique, mais très variée en nombre de pieds de maïs (Palaudemas et al. 2009). L'estimation de la contribution à la pollinisation croisée montre qu'elles pourraient conduire à une présence d'OGM dans la récolte jusqu'à 0,16%. Contrairement au colza, la persistance des repousses dans le temps est limitée à 1 ou 2 ans, les pratiques agricoles ou le froid permettant normalement de les contrôler en Europe alors qu'au Mexique une étude récente de Dyer et al. (2009) met en évidence un rôle important de ces repousses dans les flux de gènes via les graines. Ces repousses devraient néanmoins être prises en compte en Europe lorsqu'un agriculteur désire revenir à une culture de maïs conventionnel l'année suivant une culture de maïs OGM dans les zones où les hivers sont doux. Des observations de repousses ont aussi été rapportées dans des zones plus septentrionales (ex. en Allemagne). Ces observations pourraient se généraliser dans le cadre des changements climatiques.

– *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'introgession 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.

Taux de pollinisation
croisée (en %)

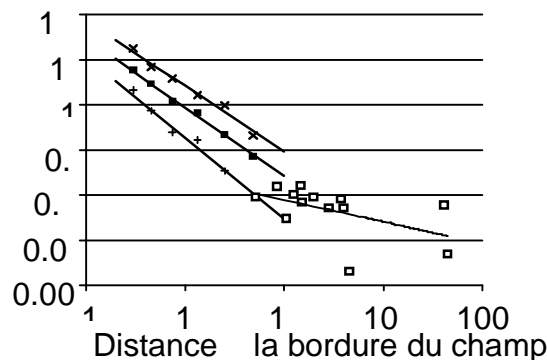


Figure 2. Extraits de jeux de données collectés lors du programme européen SIGMEA. Les points x correspondent au cas où le vent souffle de l'OGM vers le non-OGM et les points + correspondent au cas opposé (Source : étude BBA de dispersion entre deux parcelles). Les carrés blancs correspondent à une dispersion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

- *Transfert vers les bactéries du sol*

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 du transgène, même s'ils ont une origine bactérienne comme c'est le cas pour le maïs Mon810 soient transférés à des bactéries du sol est considérée 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 des bactéries indigènes des sols, on peut estimer que même si un ou plusieurs

événements de transfert de tout ou partie du transgène dans les génomes bactériens du sol venaient à se réaliser ceux-ci seraient sans conséquence pour l'équilibre populationnel et fonctionnel de la communauté bactérienne du sol.

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 Proliférite En Epis. In: Gallais, A. (Ed), Physiologie Du Mais. Inra, Pp199-204.

Brunet Y. 2008. La Disseméination Du Pollen De Maïs, Le Point Sur Les Conséquences 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, Ej, Tank, JI 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.