

**DEMANDE D'AUTORISATION  
PLURIANNUELLE POUR LA  
DISSEMINATION VOLONTAIRE DE MAÏS  
GENETIQUEMENT MODIFIE 1507**

**PIONEER GENETIQUE SARL**



## SOMMAIRE

<b>RESUME DES POINTS PRINCIPAUX.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL .....</b>	<b>18</b>
<b>B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES OU (LE CAS ECHEANT) PARENTALES .....</b>	<b>19</b>
<b>C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE...23</b>	
<b>D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE.....</b>	<b>26</b>
<b>E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION .....</b>	<b>40</b>
<b>F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION.....</b>	<b>41</b>
<b>G. INFORMATIONS SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTROLE ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION.....</b>	<b>43</b>
<b>H. CONCLUSIONS CONCERNANT LES INCIDENCES POTENTIELLES SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA DISSEMINATION DES PLANTES SUPERIEURES GENETIQUEMENT MODIFIEES (PSGM) .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>49</b>
<b>ANNEXES:</b>	
<b>ANNEXE 1 Description du vecteur [CONFIDENTIEL]</b>	
<b>ANNEXE 2 Analyses moléculaires de l'insert [CONFIDENTIEL]</b>	
<b>ANNEXE 3 Expression de l'insert [CONFIDENTIEL]</b>	
<b>ANNEXE 4 Stabilité génétique de l'insert [CONFIDENTIEL]</b>	
<b>ANNEXE 5 Protocoles applicables au programme d'expérimentation [CONFIDENTIEL]</b>	

## RESUME DES POINTS PRINCIPAUX

**Notifiant :** SOCIETE PIONEER GENETIQUE SARL

**Partenaire :** -

**Titre :** Demande d'autorisation pluriannuelle pour la dissémination volontaire de maïs génétiquement modifié 1507.

**Objectif de la transformation :** Obtenir du maïs résistant à certains insectes lépidoptères et tolérant au glufosinate (maïs DAS-Ø15Ø7-1 de Mycogen/Dow AgroSciences et Pioneer, dénommé maïs 1507 ci-après).

**Espèce végétale réceptrice :** *Zea mays* L.

**Gène(s) d'intérêt introduit(s) et séquences de contrôle :**

Le gène *cry1F* (version tronquée), le promoteur *ubiZM1(2)*, le terminateur ORF25PolyA.

Le gène *pat*, le promoteur CaMV35S, le terminateur CaMV35S.

**Durée du projet :** 4 ans

**Localisation des disséminations:**

Implantation potentielle dans les régions suivantes :

- Nord-Pas-de-Calais (Nord)
- Picardie (Aisne, Oise, Somme)
- Bourgogne (Saône et Loire)
- Rhône-Alpes (Ain, Isère, Drome)
- Centre (Eure et Loir, Loir et Cher, Indre, Indre et Loire, Loiret)
- Aquitaine (Landes, Lot et Garonne)
- Midi-Pyrénées (Haute-Garonne, Gers, Tarn, Tarn et Garonne)
- Languedoc-Roussillon (Aude)

**Précautions envisagées :**

Essais en conditions d'isolement géographique de 200 mètres par rapport à toute autre culture non expérimentale de maïs. De plus, le site d'essai sera entouré de 4 rangs de bordure de maïs conventionnel de maturité similaire qui seront également détruits à la fin de l'expérimentation. Tous les résidus de végétaux non prélevés pour analyse seront détruits par broyage et enfouis dans le sol.

**Résumé des expériences antérieures (faits marquants) :**

Pioneer a commencé à tester ce maïs génétiquement modifié en 1996.

La mise en marché du maïs 1507 a été autorisée en octobre 2001 aux Etats-Unis d'Amérique. De nombreux essais au champ avec du maïs 1507 ont été réalisés en Europe depuis 1998. La CGB a récemment examiné le dossier B/FR/05.01.02 (avis en date du 20 janvier 2005).

**Etat de développement :**

En 2000, un dossier d'importation du maïs 1507 pour l'Europe fut soumis aux Autorités compétentes des Pays-Bas (dossier C/NL/00/10). En 2001, une demande d'autorisation de nouvel aliment fut aussi soumise aux Pays-Bas et le dossier de culture de maïs 1507 fut déposé en Espagne (C/ES/01/01).

La mise en marché du maïs 1507 pour l'import et sa transformation pour l'alimentation animale (dossier C/NL/00/10) a été autorisée par la Commission des Communautés européennes le 3 novembre 2005.

**Objectif des essais:**

L'objectif est de continuer à acquérir des connaissances sur le maïs 1507, en particulier en conduisant des études sur l'expression des gènes introduits (en comparaison avec des combinaisons d'OGM contenant le maïs 1507) et d'observation du comportement agronomique.

**Nombre et surface des essais :**

Chaque année, il pourra y avoir jusqu'à 12 sites comprenant chacun jusqu'à 5000 m<sup>2</sup> semés en maïs génétiquement modifié 1507. D'autres OGM pourront être semés sur le même site. La surface totale en essais sur chaque site (toutes variétés et bordure comprises) sera donc supérieure.

## INTRODUCTION

Cette demande d'essais aux champs concerne le maïs génétiquement modifié 1507 résistant à certains insectes lépidoptères ravageurs, comme la pyrale du maïs et la sésamie. La tolérance à l'herbicide glufosinate-ammonium a été introduite comme marqueur dans le processus de sélection.

La pyrale du maïs, présente sur 70% des surfaces de maïs grain cultivé en France et la sésamie, localisée principalement dans le bassin Sud de la France, causent chaque année des dégâts économiques importants. Les dégâts provoqués à l'échelle mondiale par la pyrale du maïs sont estimés à environ un million d'euros si aucune mesure de contrôle n'est appliquée. En creusant des galeries dans les tiges et les épis, les larves de pyrale et sésamie causent d'importants dégâts sur les plantes de maïs engendrant des pertes de rendement. Actuellement ces pertes de récoltes sont limitées, dans certaines régions, par la pulvérisation de produits insecticides sur les maïs. Ces insecticides ne peuvent pas détruire toutes les larves de pyrale ou sésamie, leur action est limitée au moment de l'épandage et ne protège pas la plante pendant toute sa durée de végétation. Il est donc important de développer un moyen de contrôle efficace afin de protéger les cultures de maïs contre ces ravageurs.

Le maïs 1507 a été modifié par l'introduction des gènes *cry1F* et *pat*. Le gène *cry1F*, isolé de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, permet au maïs génétiquement modifié de résister aux attaques de certains insectes lépidoptères ravageurs au stade larvaire de croissance par production de la protéine cristalline insecticide Cry1F. L'utilisation de maïs 1507 modifié pour la résistance à ces insectes permettra donc, d'une part la limitation de l'usage d'insecticides chimiques et d'autre part, d'assurer un meilleur état sanitaire des récoltes, dans les zones qui sont infestées.

Le gène *pat* isolé de *Streptomyces viridochromogenes*, qui confère la tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium par production de la protéine PAT (phosphinothricine acétyltransférase) a été introduit comme marqueur à des fins de sélection dans le maïs 1507.

### **1- La pyrale du maïs : description et cycle biologique, dégâts causés dans les cultures de maïs, présence en France**

#### a) Description et cycle biologique de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*)

Le cycle évolutif de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*, passe par quatre stades : œuf, larve (chenille), nymphe (chrysalide) et papillon.

C'est à l'état de larve parvenue à son complet développement que la pyrale passe l'hiver à l'intérieur de sa plante hôte ou de débris végétaux. Au printemps, la larve de la pyrale se transforme en chrysalide dans son refuge d'hibernation. La nymphe se présente sous la forme d'un cocon de couleur brune (Figure 1). La nymphose dure environ 3 semaines puis le papillon adulte émerge.



Figure 1 : Chrysalide de pyrale du maïs dans un repli de feuille de maïs (INRA).  
La feuille a été en partie rabattue pour montrer le cocon et la nymphe.

A l'état adulte, la pyrale du maïs est un papillon de 2 à 3 cm d'envergure (Figures 2). Les ailes antérieures larges et fines sont jaune pâle avec de fines stries brunes, dentelées et transversales chez la femelle. Elles sont plus foncées chez le mâle: ocre à brun foncé. Au repos, les derniers segments abdominaux du mâle dépassent le bord des ailes repliées.



Figure 2-a : Adulte femelle d'*Ostrinia nubilalis* sur une feuille de maïs. (Coutin R./OPIE)



Figure 2-b : Adulte mâle d'*Ostrinia nubilalis* sur une feuille de maïs. (Coutin R./OPIE)

Sur le territoire français, les pyrales ont des cycles évolutifs à une seule génération (cycle univoltin) ou à deux générations (cycle bivoltin). Dans le Nord et l'Est, il n'existe que des cycles à 1 seule génération. Il y a 2 générations complètes dans le Midi. Partout ailleurs, un nombre variable d'individus de première génération est susceptible de donner naissance à une deuxième génération suivant les conditions climatiques du printemps et de l'été (température essentiellement). En 2003, sous l'effet des températures exceptionnellement élevées, une troisième génération partielle a été observée dans les régions où la pyrale est généralement bivoltine (Sud-Est et Sud-Ouest jusqu'en Corrèze et Vendée), et un début de seconde génération a été observé, jusque dans les Ardennes (Phytoma, janvier 2004).

Lors de la ponte, une vingtaine d'œufs regroupés en ooplaque blanchâtre (Figure 3) est déposée sur la face inférieure des feuilles de maïs.



Figure 3 : Ooplaque d'*Ostrinia nubilalis* sous une feuille de maïs. (Coutin R./OPIE)

Au fur et à mesure que les embryons s'y développent, la couleur de l'ooplaque évolue : elle vire au jaune clair puis au jaune foncé. L'évolution embryonnaire, favorisée par une hygrométrie élevée, dure de 5 à 15 jours. Lorsque la tête des larves devient nettement visible par transparence (stade "tête noire"), les œufs sont prêts à éclore.

Au sortir de l'œuf, la larve (ou chenille) mesure environ 3 mm de long, sa tête est sombre et son corps de couleur gris clair est tacheté (Figure 4-a). Elle présente dorsalement une série de points noirs disposés symétriquement par rapport à une ligne grise médiane. Au cours de son développement, elle passe par cinq stades (Figure 4-b). Au dernier, elle mesure 2 cm.



Figure 4-a : Larve d'*Ostrinia nubilalis* dans une tige de maïs. (B. Drouin, MAPAQ)

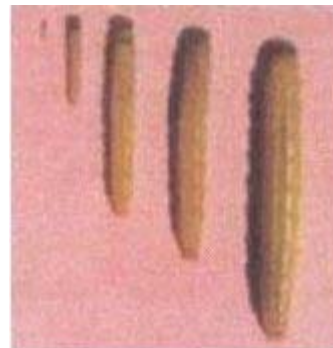


Figure 4-b : Cinq stades larvaires d'*Ostrinia nubilalis* (source B. Naïbo, AGPM)  
Taille en mm : <3 ; 4-6 ; 7-12 ; 13-17 ; >18

A l'éclosion, les jeunes chenilles cheminent sur la plante (phase de vagabondage) en cherchant à se dissimuler à l'intérieur du cornet représenté par la dernière feuille en formation à l'extrémité de la plante. Elles pénètrent à l'intérieur du cornet des feuilles du maïs et s'installent à la base pour s'alimenter aux dépens des jeunes feuilles encore enroulées, lesquelles présentent plus tard des perforations caractéristiques. Elles s'installent ensuite sur la panicule mâle à l'intérieur du cornet. A la floraison, elles l'abandonnent et se logent dans la tige où elles pénètrent en perforant les tissus au niveau de l'aisselle des feuilles. Elles creusent des galeries dans la tige ainsi que dans le pédoncule de l'épi et dans l'épi lui-même (Figure 5).



Figure 5 : Larve d'*Ostrinia nubilalis* dans l'axe d'un épi de maïs. (Coutin R. / OPIE)

Les larves se nymphosent en mai et juin pour la première génération et l'éclosion des papillons s'échelonne sur un mois environ, de fin juin à fin juillet avec un maximum vers le 10 juillet dans la plupart des régions. En zone méditerranéenne, les maximums des vols des deux générations se situent à la mi-juin et à la mi-août.

La grande majorité des pontes est déposée en juillet et au cours de la première quinzaine d'août. Selon la précocité de la ponte par rapport à la végétation du maïs, les chenilles peuvent accomplir tous les types successifs d'attaques ou seulement les derniers : les jeunes chenilles de deuxième génération sont souvent rencontrées sur les épis.

b) Dégâts causés dans les cultures de maïs par les larves de pyrales

Le maïs est vulnérable aux attaques des chenilles de pyrale de la fin du stade verticille jusqu'à la récolte.

Les champs attaqués présentent, surtout dans les régions méridionales, de nombreuses plantes dont la panicule mâle est cassée au niveau de la dernière feuille (Figure 6).



Figure 6 : Dégâts sur maïs causés par *Ostrinia nubilalis* (INRA).  
La tige est cassée au niveau de l'épi mâle.

La larve de pyrale s'introduit dans la tige du maïs et progresse dans la plante en se nourrissant de ses tissus : affaibli, le maïs est plus sujet à la verse et ne se développe



pas normalement. Les perforations sur les plantes sont aussi un lieu privilégié pour le développement de champignons pathogènes (charbon, ...).

Les galeries forées dans la tige peuvent provoquer sa casse plus ou moins précoce et celles creusées dans le pédoncule de l'épi peuvent provoquer la chute de l'épi porteur de grains. En outre, et même sans dégâts apparents, la présence de la chenille entraîne un affaiblissement de la plante se traduisant par une diminution du poids unitaire du grain, les pertes de récolte pouvant atteindre 30%. On estime que le seuil de nuisibilité est atteint lorsque la population en culture de maïs-grain atteint une chenille par plante à la récolte. Par ailleurs, les orifices de pénétration favorisent le développement d'agents pathogènes responsables de pourritures (*Fusarium* en particulier) et produisant des mycotoxines.

Les dégâts les plus importants du point de vue économique résultent des attaques sur les épis (Figure 7). Les larves rongent les grains. Les épis infestés de chenilles ou de leur sciure, ou comportant des grains endommagés, sont impropres à la vente. De surcroît, un champ de maïs infesté par la pyrale est plus susceptible aussi d'attirer des oiseaux qui viennent chercher d'abord des insectes, mais qui se mettent ensuite à picorer les épis.



Figure 7 : Dégâts sur épis de maïs causés par *Ostrinia nubilalis*. (source INRP)

c) Présence de la pyrale du maïs en France

La pyrale du maïs, présente sur 70% des surfaces de maïs grain cultivé en France (Figure 8) cause chaque année des dégâts économiques importants.

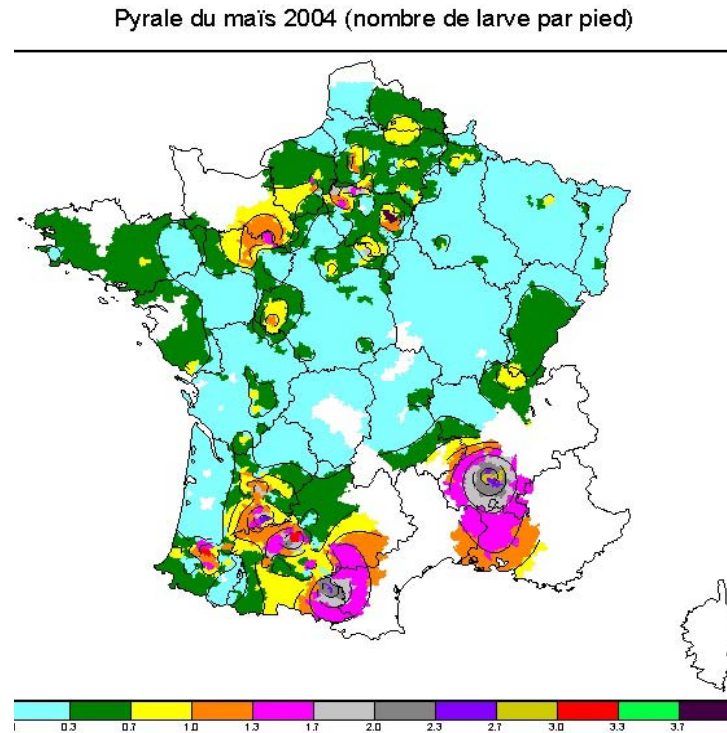


Figure 8 : Cartographie de la pression pyrale sur le territoire français en 2004 (source Réseau de Biovigilance 2004 de la Protection des Végétaux)

## 2- La sésamie du maïs : description et cycle biologique, dégâts causés dans les cultures de maïs, présence en France

### a) Description et cycle biologique de la sésamie du maïs (*Sesamia nonagrioides*)

La sésamie, insecte Lépidoptère faisant partie de la famille des Noctuelles est aussi un ravageur important du maïs. Le cycle évolutif de la sésamie passe par 4 stades : œuf, larve, nymphe, papillon. En France, la sésamie présente un cycle à deux générations.

A l'état adulte, la sésamie du maïs est un papillon de 3 à 4 cm d'envergure (Figure 9). Les ailes antérieures, de couleur gris-jaunâtre, sont ornées d'une ligne marginale courbe de points peu distincts. Les ailes postérieures sont entièrement blanches. Les antennes du mâle sont fortement bipennées.



Figure 9 : Adulte de *Sesamia nonagrioides* au repos sur maïs (Coutin R. / OPIE)

Les adultes pondent des œufs sous la gaine des feuilles, en petits groupes de quelques dizaines d'éléments. Ces œufs sillonnés sont blanchâtres à la ponte, rose crème ensuite. L'éclosion a lieu au bout de 10 à 14 jours.

La chenille nouvellement née (larve) vit quelques jours aux dépens de la gaine des feuilles. Ensuite (souvent après sa première mue) elle gagne la tige où elle se nourrit en y creusant une galerie. La chenille creuse également des galeries dans l'épi (Figure 10). A son complet développement la larve mesure 3 à 4 cm de long ; sa couleur, variable, va du jaunâtre au brunâtre avec le dos teinté de roux.



Figure 10 : Larve de *Sesamia nonagrioides* dans un épi de maïs. (Coutin R./OPIE)  
L'axe de l'épi a été coupé en deux pour montrer la larve.

Après environ 2 mois et après être passée par 7 à 8 stades, la larve se chrysalide (vers la fin de juin ou de juillet). La nymphose a lieu dans un cocon lâche, tissé soit à l'intérieur soit à l'extérieur des galeries (Figure 11).



Figure 11 : Chrysalide de *Sesamia nonagrioides* dans une tige de maïs (Coutin R./OPIE)

Les papillons issus des chrysalides vont pondre sur les fleurs et sur les épis de maïs. L'éclosion survient une semaine plus tard. Les chenilles attaquent alors les inflorescences. Le développement larvaire dure à peu près 45 jours. Certains individus peuvent achever leur développement en fin d'été et il se produit alors un bref vol automnal. La plupart des larves hivernent dans les chaumes des graminées.

#### b) Dégâts causés dans les cultures de maïs par la sésamie

La sésamie présente un cycle à deux générations. La première génération, de fin mai à début juillet, provoque la destruction de jeunes plantes minées à leur base par les chenilles. Les attaques apparaissent en foyers. Les larves de deuxième génération apparaissent de la fin juillet au début d'août et se localisent dans la tige et les épis. Elles provoquent alors de la verse et une perte de grains identiques à celles provoquées par la pyrale.

Les pieds de maïs attaqués très tôt fanent et meurent. Sur les pieds plus développés, le forage des tiges et des axes des panicules mâles est la cause de dessèchements partiels, de cassures sous l'effet du vent, d'un rendement réduit par rupture d'alimentation des grains. Les dégâts les plus graves sont causés aux épis, qui sont attaqués soit par l'extérieur soit par l'intérieur aux différentes étapes de leur développement. Il en résulte des destructions partielles et la réduction du nombre de grains (Figure 12). Comme dans le cas de la pyrale du maïs, les attaques de sésamie favorise le développement d'agents pathogènes responsables de pourritures (*Fusarium*) et produisant des mycotoxines.



Figure 12 : Attaques de *Sesamia nonagrioides* sur épis de maïs (Coutin R./OPIE).

c) Présence de la sésamie du maïs en France

La sésamie du maïs est localisée principalement dans le bassin Sud de la France, avec cependant une présence jusqu'en Vendée en 2004 (Figure 13) et cause chaque année des dégâts économiques importants.

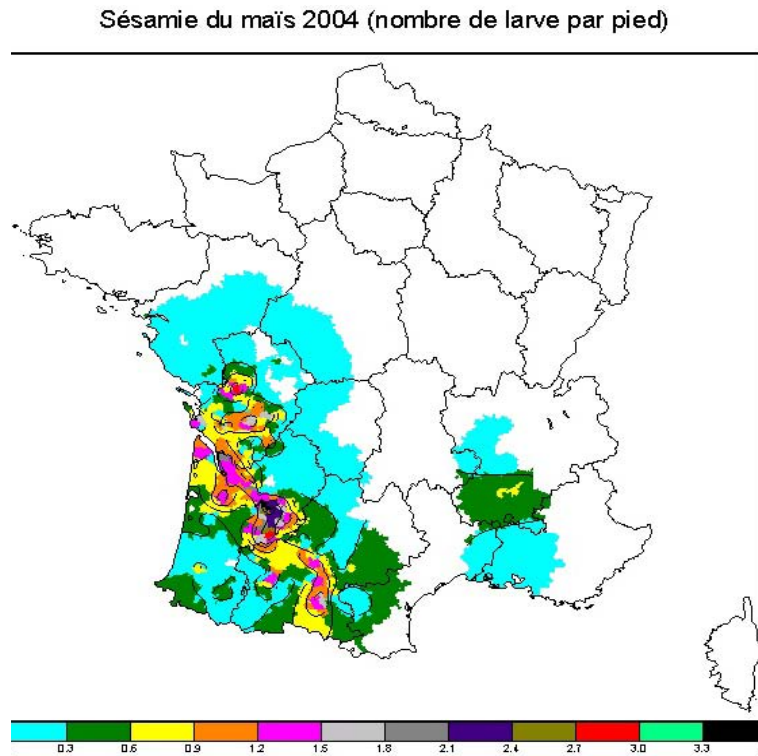


Figure 13 : Cartographie de la pression sésamie sur le territoire français en 2004 (source Réseau de Biovigilance 2004 de la protection des végétaux)

### 3- Méthodes de contrôle des insectes ravageurs du maïs

#### a) Mesures contre la pyrale et la sésamie du maïs

##### i. Les méthodes culturales

Le broyage des pailles en fragments très fins avec des broyeurs rotatifs à axe horizontal permet de réduire le nombre de larves de pyrale et de sésamie hivernantes, de même qu'un labour qui soumet les chenilles aux agents pathogènes du sol et restreint la remontée des papillons au printemps. Ceci freine le développement de la pyrale l'année suivante mais, dans les zones fortement contaminées la seule lutte culturale ne suffit pas.

##### ii. Les méthodes chimiques

Différents insecticides chimiques sous formulation granulée ou liquide sont disponibles pour lutter contre la pyrale et la sésamie. Les principaux produits utilisés sont des insecticides de la famille des pyréthrinoïdes de synthèse, des organophosphorés ou des benzoyl-urées. Les contraintes pour l'utilisation d'insecticides sont que :

- la taille atteinte par les plantes à l'époque du traitement impose l'utilisation de moyens aériens ou de matériels terrestres spécialement adaptés (tracteurs enjambeurs).
- toute intervention par traitement aérien doit être déclarée au moins 3 jours à l'avance au Service Régional de la Protection des Végétaux (SRPV) et un avis de réalisation doit ensuite être transmis dans les 15 jours.

Les chenilles de pyrales ne sont vulnérables au traitement que durant les 2 premiers stades larvaires (larve inférieure à 6mm) car le produit pulvérisé se répartit à l'aisselle des feuilles, point de passage obligé des jeunes chenilles avant leur installation dans les tiges. De manière à mieux définir le moment où il faudra pulvériser un insecticide, les agriculteurs doivent inspecter leurs champs et réaliser un comptage des œufs, des larves de pyrales et/ou sésamie, des lésions fraîches, pour décider de pulvériser ou non. Des bulletins d'alerte signalant un vol de pyrales adultes sont aussi émis par les SRPV. Le suivi des vols de pyrales et sésamies (1<sup>ère</sup> ou 2<sup>ème</sup> générations) est possible grâce à la mise en place dans les champs de pièges contenant des phéromones synthétiques reproduisant les phéromones sexuelles émises par les femelles. Les mâles sont attirés par ces phéromones et pris au piège. Ainsi, en contrôlant régulièrement les pièges, on peut déterminer la période de premiers vols des pyrales et évaluer l'ampleur du phénomène.

Les traitements chimiques, réservés aux zones très infestées, concernent chaque année 500 à 600 000 hectares de cultures en France (source AGPM) (1/5 de la surface totale). Pour lutter contre la pyrale et la sésamie, les agriculteurs consacrent un budget important aux insecticides mais leur efficacité reste limitée : une fois dans la tige, la larve est protégée des insecticides classiques. De plus, les pluies abondantes après l'application d'un insecticide chimique font diminuer l'efficacité du traitement.

L'utilisation de traitements phytosanitaires implique aussi une connaissance et un respect des règles d'hygiène et sécurité pour la préparation et l'épandage des produits,



ainsi que pour leur stockage ou pour l'élimination des résidus afin de limiter les risques. La méthode de lutte chimique est donc onéreuse, d'efficacité aléatoire et elle manque de précision quant à l'entomofaune atteinte.

### iii. Les méthodes biologiques

Les populations de pyrales peuvent être réduites par l'utilisation de Trichogrammes. Les Trichogrammes sont des insectes quasi-microscopiques dont les larves se développent à l'intérieur des œufs de pyrale, empêchant ainsi l'émergence des chenilles qui s'attaquent au maïs.

L'utilisation de trichogrammes repose sur la technique de lâchers inondatifs et saisonniers (200 000 à 360 000 parasites par hectare). L'intervention doit être répétée chaque année au moment de la ponte de la pyrale. Un bon synchronisme entre le lâcher des trichogrammes et la ponte du ravageur est essentiel pour obtenir une efficacité optimale. Il faut donc faire une étude des vols de pyrales (par la mise en place de pièges à phéromones par exemple).

Pour leur épandage, les trichogrammes sont présentés sous la forme d'œufs parasités d'un hôte de substitution (teigne de la farine par exemple), conditionnés dans des petites capsules en carton biodégradables, percées pour permettre la libération des trichogrammes adultes (Figure 14). Les trichogrammes se dispersent alors à la recherche d'œufs de pyrale. Les femelles trichogrammes pondent leurs œufs à l'intérieur des œufs de pyrale (Figure 15). L'œuf parasité devient noir après 4 à 5 jours ; la larve de pyrale est morte. De nouveaux trichogrammes adultes émergent ensuite des œufs parasités.



Figure 14 : Capsule renfermant des Trichogrammes (BASF). La capsule ouverte montre les œufs parasités d'un hôte de substitution. Remarquer la ponte d'*Ostrinia nubilalis* sur la feuille de maïs.



Figure 15 : Femelle de trichogramme pondant dans un œuf de pyrale du maïs. (Daumal J. / INRA Antibes)

Les périodes prolongées de temps chaud et sec, de même que les périodes prolongées de températures fraîches en début de saison ne sont pas favorables au développement ou à la dispersion des trichogrammes. Ils sont aussi sensibles aux insecticides chimiques pouvant être apportés dans les champs aux alentours.

Bien que l'utilisation de trichogrammes soit une méthode plus respectueuse de l'environnement que les insecticides de synthèse, son coût d'utilisation en limite l'adoption.

iv. La méthode microbiologique avec *Bacillus thuringiensis*

La toxine dite Bt, appelée ainsi parce qu'elle est produite par la bactérie *Bacillus thuringiensis*, a des propriétés insecticides vis à vis d'un certain nombre d'insectes Lépidoptères, la pyrale et la sésamie en particulier. Après avoir ingéré cette toxine, les larves des insectes cibles meurent. La toxine est répandue dans les champs sous forme de bactéries inactivées. La toxine agit spécifiquement sur les insectes cibles et présente une innocuité vis à vis de l'environnement et de la faune non sensible. De nombreuses études ont montré l'absence de risque pour les mammifères et a fortiori pour l'homme.

La toxine, produite sous forme cristalline par *Bacillus thuringiensis*, est ingérée par les larves d'insectes cibles et solubilisée dans leur intestin où des protéases vont en libérer la fraction toxique active. La toxine se fixe ensuite sur des récepteurs spécifiques des cellules intestinales de la larve d'insecte ce qui conduit à la formation de pores dans la paroi des cellules, à l'origine de leur destruction. Cela aboutit à la mort de l'insecte, un à trois jours après l'ingestion des cristaux de toxine.

Cependant, cette pratique de lutte micro biologique a des limites. La persistance de l'activité des cristaux de toxine *Bt* dans la nature est généralement faible et dépend des conditions climatiques : les cristaux sont inactivés par les rayonnements ultraviolets et la pluie provoque un lessivage des produits bactériens.

Pour être efficace, le traitement doit être répété plusieurs fois par saison, ce qui augmente les coûts pour l'agriculteur.

Mais surtout, une larve qui se développe à l'intérieur de la plante n'est pas exposée à la toxine épanchée sur les feuilles donc l'utilisation classique de toxine *Bt* est peu efficace sur la pyrale et la sésamie, ravageurs foreurs des tiges et des épis. C'est pourquoi ce moyen de lutte microbiologique est peu développé en France.

v. Le semis de maïs génétiquement résistant aux insectes

Les plantes de maïs transgéniques produisant elles-mêmes, grâce à un gène issu de la bactérie *Bacillus thuringiensis*, une toxine *Bt* comme celle utilisée dans le cas de la lutte microbiologique, apportent de nouvelles solutions pour le contrôle de ces ravageurs. En effet, ce maïs génétiquement modifié est efficace sur les larves de pyrales et sésamies localisées à l'intérieur des tiges ou des épis, contrairement aux autres moyens de lutte diffusés par épandage qui ne peuvent agir qu'en surface de la plante et donc pendant une période très courte du développement larvaire. Les larves de pyrales et sésamies qui se nourrissent des tissus du maïs génétiquement modifié meurent dans les 3 jours qui suivent l'ingestion de la protéine insecticide. La production de protéines de *Bt* par les plantes leur confère une protection interne et continue. L'agriculteur est donc déchargé d'une opération culturale délicate et assuré d'une bonne protection de ses cultures lui permettant d'atteindre un bon rendement. De plus, la culture de ces plantes génétiquement modifiées permet de limiter le recours aux insecticides et ainsi de diminuer leur impact sur l'environnement. Les autres insectes utiles présents dans les champs de maïs sont épargnés car la toxine est efficace spécifiquement sur les insectes cibles, contrairement aux insecticides chimiques qui ont un large spectre d'action.

Tout comme pour l'utilisation d'insecticides chimiques, il existe un risque, dont la probabilité d'occurrence est très faible, que quelques insectes deviennent résistants à



long terme. Ce phénomène est d'autant plus improbable que toutes les variétés de maïs cultivées ne sont pas des variétés de maïs génétiquement modifié pour lutter contre la pyrale et la sésamie. Donc les pyrales (ou sésamies) qui pourraient éventuellement devenir résistantes se reproduiraient avec des pyrales (ou sésamies) sensibles ce qui contribuerait à maintenir la sensibilité à la toxine.

L'objectif de cette dissémination est de continuer à acquérir des connaissances sur le maïs 1507, en particulier en conduisant des études sur l'expression des gènes introduits (en comparaison avec d'autres OGM obtenus à partir de ce maïs 1507) et pour observer le comportement agronomique. Ce type d'étude ne peut être réalisé qu'au champ dans lequel l'interaction entre le génotype et le milieu s'exprime pleinement.

## **A. INFORMATIONS D'ORDRE GENERAL**

### **1- Nom et adresse du notifiant (société ou institut)**

SOCIETE PIONEER GENETIQUE SARL  
Affaires Techniques et Réglementaires  
BP 6  
Chemin de l'Enseigne  
31840 Aussonne

### **2- Nom, qualification et expériences des scientifiques responsables**

Chacun des sites sera supervisé par un ingénieur agronome ou un technicien expérimenté.

### **3- Titre du Projet**

Demande d'autorisation pluriannuelle pour la dissémination volontaire de maïs génétiquement modifié 1507.

### **4- Développements ultérieurs envisagés**

Cette dissémination s'inscrit dans un programme d'acquisition continue de connaissances et d'évaluation du comportement de variétés de maïs 1507.

## B. INFORMATIONS CONCERNANT LES PLANTES RECEPTRICES OU (LE CAS ECHEANT) PARENTALES

### 1- Nom complet

- a) Nom de famille : Gramineae
- b) Genre : *Zea*
- c) Espèce : mays ( $2n = 20$ )
- d) Sous-espèce : aucune
- e) Cultivar/lignée : variétés expérimentales
- f) Nom usuel : maïs

### 2- Reproduction/compatibilité sexuelle

#### a) Information concernant la reproduction

##### i. Mode(s) de reproduction

Le maïs est une plante monoïque anémophile possédant deux inflorescences distinctes :

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

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

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

L'émergence de la panicule, l'émergence des soies et la pollinisation sont les stades les plus critiques du développement du maïs et le stress hydrique ou les dysfonctionnements au niveau de la fertilité ont un fort impact sur le rendement de grain. Généralement, la viabilité du pollen de maïs est courte. Dans des conditions de températures élevées (Herrero et Johnson, 1980) et de dessiccation (Hoekstra *et al.*, 1989), la viabilité du pollen de maïs est mesurée en minutes ; ces conditions peuvent même abîmer la panicule avant que du pollen viable soit émis (Lonnquist et Jugenheimer, 1943). Des conditions plus modérées peuvent rallonger la durée de vie du pollen dans le champ de plusieurs heures (Jones et Newell, 1948).

##### iii. Temps de génération

Le maïs est une plante annuelle avec un cycle de culture pouvant varier de 10 semaines (au plus court) à 48 semaines (au plus long) du semis au stade de maturité (Shaw, 1988). Cette variance du temps de maturation permet de cultiver le maïs dans diverses conditions climatiques.

Dans les conditions françaises les semis ont lieu à partir d'avril jusqu'au 15 mai et la récolte peut intervenir de début septembre (maïs utilisé en fourrage) jusqu'à fin novembre (pour le maïs grain le plus tardif).

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

La téosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana*) est généralement considérée comme la seule espèce apparentée du maïs. La téosinte est une herbe sauvage ancienne que l'on trouve au Mexique et au Guatemala et qui n'est pas présente dans l'Union Européenne. Il n'y a pas d'hybridation interspécifique possible en France du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément sur le territoire français. Il n'y a pas de compatibilité sexuelle de la plante avec des espèces sauvages en Europe.

### **3- Capacité de survie**

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

Le maïs est une plante annuelle sans dormance et les graines sont les seules structures de survie. En règle générale, seuls les épis non battus peuvent permettre aux grains de conserver éventuellement une capacité de germination l'année suivante. Il n'y a pas de régénération naturelle du maïs à partir de tissus végétatif.

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

La survie des graines de maïs dépend de la température, de l'humidité des graines, du génotype, de la protection de l'enveloppe et du stade de développement (Rossman, 1949). Les grains de maïs peuvent survivre seulement dans des conditions climatiques favorables. Le gel a un effet négatif sur la germination des graines de maïs et a été identifié comme un risque majeur dans la production de graines de maïs (Wych, 1988). Les températures supérieures à 45°C ont également été constatées comme ayant un effet destructeur sur la viabilité des graines de maïs (Craig, 1977).

Il n'y a en général pas de repousses à la suite d'une culture de maïs. Lorsque des repousses apparaissent dans les jours qui suivent la récolte, les plantules sont ensuite détruites par le froid. Elles ne sont pas capables de survivre à un hiver froid, de ce fait, s'il y a des repousses après la récolte, elles n'atteignent pas le stade reproductif.

### **4- Dissémination**

- a) Voies et étendue de la dissémination (par exemple, estimation de la manière dont la qualité de pollen viable et/ou des graines à mesure que la distance augmente)

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

Le maïs a été domestiqué depuis des milliers d'années, et de ce fait, la dispersion des grains individuels du maïs ne peut pas se faire naturellement. Le maïs en Europe n'est qu'une espèce de grande culture, sa dissémination n'intervient que dans les espaces agricoles par semis.

La dispersion du pollen à partir des panicules se fait sur une période de 10 à 15 jours. Les grains de pollen sont ronds, lourds et avec une forte teneur en eau. Généralement, la viabilité du pollen est de 10 à 30 minutes, même s'il peut rester viable pendant une plus longue période dans des conditions favorables (Canadian Food Inspection Agency, 1994). Cependant, la dispersion du pollen tend à être limitée car elle est influencée par la taille et le taux de déposition rapide du pollen de maïs. On sait que la déposition du pollen de maïs décline rapidement de  $2.3 \times 10^7$  grains par  $m^2$  à un mètre du bord du champ à  $7.1 \times 10^3$  grains par  $m^2$  à 60m : ceci représente un déclin des concentrations de pollen de plusieurs ordres de magnitude en distance radiale de 1 m à 60 m du bord du champ (Raynor *et al.*, 1972).

Si du pollen viable de plants génétiquement modifiés pouvait être transporté par le vent vers des soies de maïs réceptifs pendant la période de viabilité de 30 minutes du pollen, le transfert de pollen pourrait se produire. Plus la distance par rapport au maïs transgénique augmente, plus ce transfert devient irréalisable. Il devient négligeable lorsque la distance atteint 200 mètres qui est la distance reconnue autorisée pour la production de graines selon les normes de pureté internationales (normes de certification OCDE).

#### b) Facteurs spécifiques affectant la dissémination

La récolte mécanique et le transport sont des voies de dissémination du grain. De plus, les dommages causés par les insectes ou le vent peuvent faire tomber les épis mûrs sur le sol et empêcher leur récolte. Malgré ces voies de dissémination, le maïs ne peut pas survivre sans l'assistance humaine dans les zones non agricoles de l'Union Européenne. En raison de sa nature fortement domestiquée, la semence de maïs requiert les conditions semi-uniformes du sol qui résultent des pratiques agricoles pour pouvoir germer (Canadian Food Inspection Agency, 1994).

La dispersion des graines est généralement limitée aux champs cultivés. Les propriétés inhérentes au maïs, l'existence de spathes enserrant l'épi et la fixation des graines sur la rafle (axe central de l'épi), réduisent de fait la possibilité de dispersion naturelle des graines. La viabilité des semences est fortement limitée car elles sont très sensibles aux maladies et au froid hivernal. C'est pourquoi il n'y a en général pas de repousses de maïs.

Le pollen provenant de l'inflorescence mâle est dispersé par gravité et par le vent. Le début de la libération du pollen a lieu généralement deux ou trois jours avant l'apparition des soies des épis. La durée de floraison mâle est de 6 à 10 jours et pas plus de 15 jours quelles que soient les conditions.

### **5- Distribution géographique de la plante**

Le maïs n'est pas indigène en France ou ailleurs en Europe, mais c'est une plante originaire d'Amérique Centrale. Le maïs est dépendant de l'homme pour sa dispersion géographique. Le maïs est utilisé soit comme ensilage, soit pour la production de grains. Il s'agit de la troisième culture céréalière du monde en terme d'importance. La production française de maïs est localisée principalement dans les régions suivantes :

- Aquitaine et Midi-Pyrénées,
- Façade atlantique et notamment en Bretagne et Poitou-Charentes,
- L'Est avec notamment les régions Rhône-Alpes et Alsace,

- La zone Nord Loire (Centre, Ile-de-France, Picardie, Champagne-Ardenne...).

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

Le maïs est une plante originaire d'Amérique centrale qui ne se développe pas en dessous de 9-10°C et qui a une température optimale de croissance de 30-33°C. Il est cultivé en Europe depuis le 16<sup>ème</sup> siècle. En climat continental (Canada, Russie), le maïs est cultivé jusqu'au 60ème parallèle. Le maïs peut pousser dans la plupart des pays de l'Union Européenne.

Le maïs est sensible aux maladies dues aux champignons (anthracnose, helminthosporiose, fusariose, charbon, mildiou) et aux insectes ravageurs (atomaire, blaniule, scutigérelle, taupin, tipule, vers gris, cicadelle, noctuelle, sésamie, pyrale, chrysomèle des racines, pucerons), et également à la compétition des mauvaises herbes environnantes.

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

On sait que le maïs a une interaction avec d'autres organismes dans l'environnement tels que les insectes, les oiseaux et les mammifères. Le maïs est une espèce de grande culture et, historiquement, son utilisation ne présente pas de danger. Le maïs n'est pas considéré comme étant dangereux ou ayant des effets toxiques sur la santé de l'homme, des animaux ni d'autres organismes (Del Valle *et al.*, 1983).

Dans le cas du maïs génétiquement modifié 1507, il y a des interactions spécifiques avec des insectes lépidoptères cibles tels que la pyrale (*Ostrinia nubilalis*), la sésamie (*Sesamia spp.*) au stade larvaire de croissance.

## C. INFORMATIONS CONCERNANT LA MODIFICATION GENETIQUE

### 1- Description de la méthode utilisée pour la modification génétique

La méthode d'accélération de particules utilisant un canon à gènes comme décrit par Klein *et al.* (1987) a été utilisée pour introduire dans des cellules de maïs un fragment d'ADN linéaire purifié (insert PHI8999A) contenant uniquement les séquences codantes pour les protéines Cry1F et PAT et les composants nécessaires à leur régulation, ce qui a produit l'événement de transformation 1507. Les plantes régénérées à partir de ces cellules de maïs expriment la protéine Cry1F pour la résistance à certains insectes Lépidoptères et la protéine PAT pour la tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium.

Les détails de la transformation sont fournis ci-dessous.

Des embryons immatures isolés d'épis de maïs, récoltés peu après la pollinisation sont cultivés sur un milieu d'initiation de cals pendant plusieurs jours. Le jour de la transformation, des particules microscopiques de tungstène sont enrobées d'inserts purifiés PHI8999A contenant les gènes *cry1F* et *pat* et les composants nécessaires à leur régulation (Annexe 1, Figure 1). Les particules sont accélérées et pénètrent dans les embryons cultivés où l'insert d'ADN s'incorpore aux chromosomes de la cellule. Après transformation, les embryons sont transférés dans un milieu de culture d'initiation de cals contenant du glufosinate d'ammonium comme agent de sélection. Les embryons individuels sont maintenus séparés physiquement durant la culture et la majorité des explants meurt sur le milieu sélectif.

Un code d'identification unique représentant un événement présumé est attribué aux embryons qui survivent et produisent des cals sains et tolérants au glufosinate d'ammonium. Ces embryons sont transférés en continu dans du milieu de sélection frais. Des plantes de maïs sont régénérées à partir de tissu dérivé de chaque événement unique et transférées en serre. Des échantillons de feuille sont prélevés pour l'analyse moléculaire afin de vérifier par méthode PCR la présence des gènes insérés et de confirmer l'expression de la protéine Cry1F par méthode ELISA. Des plantes ont alors été soumises à un essai sur plante entière utilisant des pyrales. Les plantes répondant positivement sont alors croisées avec des lignées conventionnelles de maïs afin d'obtenir des graines provenant des plantes initialement transformées. De nombreuses lignées ont été évaluées dans le champ. La lignée de maïs contenant l'événement 1507 a été sélectionnée pour ses bonnes caractéristiques agronomiques et son excellente résistance à la pyrale et autres lépidoptères.

## 2- Nature et source du vecteur utilisé

Aucun vecteur plasmidique n'a été utilisé pour la transformation du maïs 1507. Comme mentionné ci-dessus (point C.1), un fragment d'ADN linéaire contenant uniquement les séquences codantes des gènes *cry1F* et *pat* avec les composants de régulation nécessaires (insert PHI8999A, Annexe 1, Figure 2) a été utilisé pour la transformation par accélération de particules. Aucune séquence d'ADN supplémentaire n'a été utilisée pour introduire l'insert.

La digestion de l'ADN plasmidique (Annexe 1, figure 1) par l'enzyme de restriction *PmeI* produit un insert de 6.2 kb qui a été purifié et utilisé pour la transformation comme décrit ci-dessus (Point C.1).

Le gène *nptII* qui permet une résistance à la kanamycine, ne fait pas partie du fragment d'ADN linéaire de 6235 pb (PHI8999A) qui a été purifié et utilisé pour la transformation. Le gène *nptII* n'est par conséquent pas présent dans le maïs 1507, comme confirmé par les analyses moléculaires réalisées par Southern.

La portion linéaire d'ADN PHI8999A a été excisée du plasmide complet PHP8999, (Annexe 1, Figure 1). Plus d'informations sur les éléments d'ADN sont données par la carte de l'insert présentée Annexe 1, Figure 2.

Tableau 1 : Plasmide utilisé pour la transformation du maïs 1507 :

Plasmide	Annexes
PHP8999 (Insert PHI8999A)	Annexe 1, Figures 1 & 2

## 3- Taille, origine (nom) des organismes donneurs et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région envisagée pour l'insertion

L'insert utilisé dans la transformation du maïs 1507 (insert PHI8999A, Annexe 1, Figure 2) contenait les séquences codantes optimisées pour les plantes des gènes *cry1F* et *pat* et les éléments de régulations nécessaires à leur expression. La fonction recherchée du gène *cry1F* était de conférer la résistance à certains insectes lépidoptères ravageurs tels que la pyrale et la sésamie. La fonction recherchée du gène *pat* introduit comme marqueur de sélection, était de conférer la tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium.



Tableau 2 : Origine et caractéristique des différentes séquences introduites dans le maïs 1507

Maïs	Éléments génétiques	Taille en kb	Fonction et origine
1507	<i>ubiZM1(2)</i>	1.986	Promoteur ubiquitine de <i>Zea mays</i> (plus la région 5' non traduite) (Christensen <i>et al.</i> , 1992).
	<i>cry1F</i>	1.818	Version synthétique tronquée de <i>cry1F</i> isolée de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> (optimisée plante) (Chambers <i>et al.</i> , 1991).
	ORF25PolyA	0.714	Termineur du plasmide extra-chromosomique, pTi15955 d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Barker <i>et al.</i> , 1983).
	CaMV35S promoteur	0.554	Promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
	<i>pat</i>	0.552	Gène synthétique de tolérance au glufosinate, basé sur une séquence du gène de la phosphinothricine acétyltransférase isolé de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Eckes <i>et al.</i> , 1989)
	CaMV35S termineur	0.204	Termineur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Pietrzak M. <i>et al.</i> , 1986).

## D. INFORMATIONS CONCERNANT LA PLANTE SUPERIEURE GENETIQUEMENT MODIFIEE

### 1- Description du ou des caractères et des caractéristiques qui ont été introduits ou modifiés

Le maïs 1507 a été génétiquement modifié afin de lui permettre de se défendre contre certains insectes lépidoptères ravageurs. La tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium a également été introduite dans le maïs 1507 en tant que marqueur dans le processus de sélection.

Le maïs génétiquement modifié 1507 a été modifié par l'insertion de la version synthétique du gène *cry1F* tronqué dérivé de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* codant une  $\delta$ -endotoxine. Cette  $\delta$ -endotoxine est une protéine Cry1F tronquée, optimisée pour son expression dans la plante. Elle est constituée des acides aminés 1 à 605 de la séquence de la protéine Cry1F native de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, avec la substitution d'un seul acide aminé (F devient L en position 604). Elle comprend le core actif de la protéine Cry1F native.

Les plantes transgéniques produisent la protéine Cry1F qui a été démontrée comme étant spécifiquement efficace pour contrôler certains insectes lépidoptères au stade de croissance larvaire, tels que la pyrale (*Ostrinia nubilalis*), le ver du maïs (*Spodoptera frugiperda*), le ver de l'épi de maïs (*Helicoverpa zea*) et la noctuelle epsilon (*Agrotis ipsilon*).

L'activité biologique de la protéine Cry1F a été testée sur une gamme d'insectes Lépidoptères, y compris certains parasites qui se nourrissent sur les plantes de maïs. Les tests furent menés en exposant les insectes à des substrats diététiques artificiels traités avec des formulations aqueuses de protéines Cry1F d'origine microbiologique. Les résultats de ces tests de laboratoire montrent que la pyrale (*Ostrinia nubilalis*), le ver du maïs (*Spodoptera frugiperda*), le ver de l'épi de maïs (*Helicoverpa zea*) et la noctuelle epsilon (*Agrotis ipsilon*) sont sensibles à la protéine Cry1F (Tableau 3). Dans une autre étude, la sensibilité à la protéine Cry1F d'*Elasmopalpus lignosellus*, de la pyrale du Sud-Ouest américain (*Diatraea grandiosella*) et de la pyrale de la canne à sucre (*Diatraea saccharalis*) fut démontrée, alors qu'il n'y avait aucune activité contre la chrysomèle des racines (*Diabrotica virgifera virgifera*), la cicadelle (*Dalbulus maidis*) et les pucerons verts du maïs (*Rhopalosiphum maidis*) (Tableau 4). D'autres tests sont en cours pour étudier l'efficacité contre l'infestation de la sésamie (*Sesamia* spp.).

Tableau 3: Sensibilité aiguë à la protéine Cry1F d'origine microbienne d'espèces Lépidoptères

Insectes	LC <sub>50</sub> (ng Cry1F par cm <sup>2</sup> )
Pyrale ( <i>Ostrinia nubilalis</i> )	0.58
Noctuelle du tabac ( <i>Heliothis virescens</i> )	1.88
Ver du maïs ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	2.49
Ver de l'épi de maïs ( <i>Helicoverpa zea</i> )	51.6
Noctuelle epsilon ( <i>Agrotis ipsilon</i> )	69.2

Tableau 4 : Sensibilité aiguë à la protéine Cry1F, d'espèces Lépidoptères et de parasites qui se nourrissent de plantes de maïs

Insectes	LC <sub>50</sub> (µg Cry1F par cm <sup>2</sup> )
<i>Elasmopalpus lignosellus</i> [Lepidoptera]	0.11
Pyrale du Sud-Ouest américain ( <i>Diatraea grandiosella</i> ) [Lepidoptera]	0.70
Pyrale de la canne à sucre ( <i>Diatraea saccharalis</i> ) [Lepidoptera]	1.46
Chrysomèle des racines <sup>a</sup> ( <i>Diabrotica virgifera</i> <i>virgifera</i> ) [Coleoptera]	>53.8
Puceron vert de l'épi du maïs <sup>b</sup> ( <i>Rhopalosiphum maidis</i> ) [Homoptera]	>70.0
Cicadelle <sup>b</sup> ( <i>Dalbulus maidis</i> ) [Homoptera]	>70.0

LC<sub>50</sub>: Concentration en Cry1F estimée devant tuer 50% des insectes

a: Pas de mortalité à 53.8 µg Cry1F par cm<sup>2</sup>

b: La quantité maximale n'a pas provoqué plus de 50 % de mortalité chez les espèces d'insectes

De plus, le maïs génétiquement modifié 1507 a été modifié par l'introduction du gène *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*. Il a été introduit comme marqueur de sélection pour le criblage des cellules et les plantes transformées montrent une tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium en comparaison avec les plantes non transformées. En effet, la phosphinothricine, l'ingrédient actif de l'herbicide glufosinate d'ammonium, se lie à la glutamine synthétase dans les plantes empêchant la détoxification du surplus d'ammoniaque qui entraîne la mort de la plante. La phosphinothricine acétyltransférase (protéine PAT) codée par le gène *pat* dans les plantes transgéniques, acétyle la phosphinothricine. Celle-ci est convertie en une forme (N-acétyl-phosphinothricine) qui n'est plus active dans les plantes génétiquement modifiées. La détoxification de l'ammoniaque peut donc se poursuivre procurant aux plantes génétiquement modifiées une tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium.

Aucun autre caractère n'a été introduit ou modifié dans le maïs 1507.

## 2- Information sur les séquences réellement insérées ou délétées

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

### Méthode :

Des feuilles ont été prélevées sur des plantes de maïs 1507 et sur des plantes de maïs témoin non génétiquement modifié cultivées en serre aux Etats-Unis en 2001, puis l'ADN génomique a été extrait. L'ADN isolé a ensuite été digéré par des enzymes endonucléases de restriction et soumis à électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments d'ADN obtenus ont été transférés et fixés sur des membranes à base de nylon.

Des sondes spécifiques des séquences *cry1F*, *pat* et *npt II* ont été marquées par incorporation d'un nucléotide marqué à la digoxigenine (DIG), dans une réaction de marquage par PCR. Chaque sonde marquée fut hybridée à l'ADN immobilisé sur des membranes de nylon. Les signaux de ces sondes hybridées après détection par chemiluminescence puis exposition aux rayons X ou détection de signal sur un Lumi-Imager ont permis une analyse de la structure du transgène dans le génome.

La digestion des enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, les conditions d'hybridation et l'identification du signal ont été mises en œuvre selon des méthodes de biologie moléculaire standard de laboratoire.

### Résultats :

Les analyses moléculaires de l'insert dans le maïs 1507 sont présentées en Annexe 2.

Les résultats montrent que les plantes de maïs 1507 contiennent 1 copie intacte et au moins une copie partielle du gène *cry1F* ainsi qu'une copie intacte et au moins deux copies partielles du gène *pat*. Une seconde copie partielle du gène *cry1F* et une troisième copie partielle du gène *pat*, non détectable dans ces Southern, ont été révélées par le séquençage de l'ADN de l'insertion fourni dans le dossier de mise en culture du maïs 1507 (C/ES/01/01).

De plus, comme prévu, l'absence du gène de résistance à la kanamycine dans les plantes génétiquement modifiées a été confirmée par la méthode d'analyse Southern.

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

Ne s'applique pas.

- c) Nombre de copies de l'insert

L'insertion dans le maïs 1507 a été caractérisée et consiste en une copie du fragment linéaire PHI8999A utilisé pour la transformation (contenant une copie intacte des gènes *cry1F* et *pat* et les éléments de régulation nécessaires à leur expression), plus deux fragments non fonctionnels du gène *cry1F* et trois fragments non fonctionnels du gène *pat* (comme décrit précisément dans le dossier C/ES/01/01).

- d) Localisation de l'insert dans la cellule (intégrée au génome nucléaire, chloroplastique ou mitochondrial ou sous forme non intégrée), et méthodes de sa détermination

L'insert est intégré dans le génome nucléaire du maïs.

### **3- Information concernant l'expression de l'insert**

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

➤ L'expression de l'insert dans le maïs 1507 a été évaluée par la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (Analyses immuno-enzymatiques par fixation d'enzymes).

Plusieurs tissus végétaux (feuille, plante entière, pollen, tige et grain) ont été prélevés à différents stades de croissance des plantes de maïs (V9\*, R1, R4, R6 et sénescence) et analysés par ELISA pour mesurer les niveaux d'expression des protéines Cry1F et PAT. L'étude comprenait 6 essais aux champs distincts situés dans des régions de culture commerciale du maïs en Europe (Bulgarie, France, Italie) en 2000. Sur chaque site, l'essai concernait des hybrides de maïs 1507 traités au glufosinate d'ammonium, des hybrides de maïs 1507 non-traités au glufosinate d'ammonium et leur équivalent non-modifié.

L'information détaillée concernant la méthode ELISA utilisée et le niveau d'expression des protéines Cry1F et PAT dans les tissus de maïs 1507 sont présentés en Annexe 3.

Les résultats montrent que la protéine Cry1F est exprimée à des niveaux mesurables dans les échantillons de tous les types de tissus de maïs 1507 testés. Les niveaux d'expression moyens de Cry1F allaient de 1.6 ng/mg de tissu sec dans la plante entière (aux stades fourrage sénescence) jusqu'à un maximum de 22.4 ng/mg de tissu sec dans le pollen. Les niveaux de Cry1F étaient identiques dans les plantes traitées au glufosinate d'ammonium et dans les plantes non-traitées. Comme prévu, l'expression de la protéine Cry1F n'a été détectée dans aucun des échantillons de plantes contrôles non-modifiées.

Les résultats montrent aussi que la protéine PAT est exprimée dans le maïs 1507 à des niveaux mesurables dans les feuilles et la plante entière au stade V9 de croissance. Les niveaux moyens de protéine PAT s'étendaient de 0.04 à 5.2 ng/mg de tissu sec respectivement dans la plante entière et la feuille. Les niveaux moyens de protéine PAT étaient en dessous du seuil de détection dans le grain, le pollen, la tige, le fourrage et la plante entière sénescence. Comme prévu, l'expression de la protéine PAT n'a été détectée dans aucun des échantillons de plantes contrôles non génétiquement modifiées.

---

\* Stades de développement du maïs : V9 : 9 feuilles développées, R1 : stade d'apparition des soies, R4 : stade grain pâteux, R6 : maturité du grain

➤ Un autre moyen de vérifier l'expression de l'insert dans les plantes génétiquement modifiées est d'étudier l'efficacité des plantes génétiquement modifiées sur les insectes cibles.

L'efficacité des hybrides de maïs 1507 sur une série d'insectes ravageurs a été déterminée et comparée avec celle de maïs témoins conventionnels dans des conditions d'essais aux champs. Les résultats, présentés en Annexe 3, montrent que le maïs 1507 offre une protection du maïs statistiquement supérieure contre la pyrale (*Ostrinia nubilalis*), le ver du maïs (*Spodoptera frugiperda*), le ver de l'épi de maïs (*Helicoverpa zea*), la pyrale du Sud-Ouest américain (*Diatraea grandiosella*), la noctuelle ipsilon (*Agrotis ipsilon*) et la pyrale de la canne à sucre (*Diatraea saccharalis*) en comparaison avec les plantes témoins non-transgéniques. Ces résultats sont en accord avec l'étude en laboratoire décrite au point **D.1**, menée afin d'évaluer l'activité biologique de la protéine Cry1F.

Une autre étude sur le terrain a été conduite en 2000 en France afin d'évaluer le maïs 1507 et le contrôle non-transgénique après application d'un insecticide synthétique (Karate Express dont l'ingrédient actif est la lambda-cyhalothrine) habituellement utilisé pour contrôler les infestations de pyrale (*Ostrinia nubilalis*). Le maïs 1507 démontra une efficacité significative dans le contrôle à la fois de la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) et de la sésamie (*Sesamia nonagrioides*) et fournit une protection contre ces deux ravageurs meilleure que des applications d'insecticide traditionnel. Les résultats détaillés sont donnés en Annexe 3.

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

L'expression de la protéine Cry1F est observée de façon constitutive dans la plante ; l'expression de la protéine PAT a été mesurée dans la feuille et la plante entière au stade 9 feuilles développées mais était en dessous du seuil de détection dans le grain, le pollen, la tige, le fourrage et la plante entière sénescence.

#### **4- Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice**

Lors de précédents essais au champ, menés en différents lieux à travers les régions de culture de maïs aux Etats-Unis d'Amérique, au Chili et en Europe, les plantes transgéniques sont apparues normales en tous points. Elles étaient indifférenciables des plantes de maïs non-transgéniques sauf pour leur résistance à certains insectes lépidoptères et leur tolérance au glufosinate-ammonium, traits dus à la modification génétique.

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

Aucun changement dans la production de pollen, la production de graines, la viabilité ou la capacité à germer des grains du maïs 1507 n'a été observé comparativement au maïs témoin non génétiquement modifié. La capacité à devenir une mauvaise herbe n'a pas été augmentée.

b) Dissémination

Les plantes de maïs 1507 n'ont pas montré de différence de dissémination par rapport au maïs non génétiquement modifié équivalent. Par exemple, les plantes n'ont pas développé de nouveau mécanisme de dispersion des graines.

c) Capacité de survie

La capacité de survie est la même, la plante génétiquement modifiée reste une plante annuelle. Les gènes introduits n'ont pas d'effet sur les aptitudes à coloniser de la plante. Le maïs, dans les conditions européennes, ne peut pas s'implanter en dehors des zones cultivées et de toute façon, même si des repousses apparaissaient après récolte, elles ne survivraient pas au gel de l'hiver ; elles n'atteindraient donc pas le stade reproductif l'année suivante.

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

La ségrégation Mendélienne du gène *pat* a été analysée pendant le processus de sélection des plantes.

Les résultats détaillés fournis en Annexe 4 montrent que pour les différentes générations de maïs 1507 analysées, il n'y avait pas de différence significative entre le ratio de ségrégation observé et le ratio de ségrégation attendu.

Les résultats montrent que pour les différentes générations analysées pour le maïs 1507, il n'y avait pas de différence significative entre le ratio de ségrégation observé et le ratio de ségrégation attendu.

Donc, les données sur la ségrégation Mendélienne des transgènes apportent la preuve d'une hérédité stable du matériel génétique nouvellement introduit.

**6- Toute modification de la capacité de la plante génétiquement modifiée à transférer du matériel génétique dans d'autres organismes**

a) Transfert horizontal

Le transfert de matériel génétique issu du maïs 1507 vers des bactéries est un aspect négligeable. Il n'y a pas de mécanisme connu, ni de démonstration définitive, de transfert d'ADN de plantes à des microorganismes dans les conditions naturelles. Même si un transfert horizontal de gène avait lieu, le transfert des gènes *cry1F* et *pat* du maïs 1507 ne présente pas de risque pour la santé humaine ou animale, de même qu'il ne présente pas de risque de ravage sur les plantes.

b) Transfert interspécifique ou inter générique

Le potentiel de transfert de matériel génétique du maïs 1507 vers d'autres organismes n'a pas été changé et il est négligeable puisqu'il n'y a pas d'espèces compatibles sexuellement ou d'espèces sauvages parentes de *Zea mays* connues en Europe.

c) Transfert intra spécifique

Si du pollen viable des plantes transgéniques peut être apporté par le vent sur des stigmates réceptifs de maïs pendant la période de viabilité de 30 minutes du pollen, un transfert de matériel génétique peut se faire.

Ce transfert potentiel devient de plus en plus improbable quand la distance avec le maïs transgénique augmente. Il devient négligeable quand on se situe à la distance de 200 mètres reconnue comme permettant de produire des semences aux normes de pureté internationalement autorisées (normes de certification OCDE).

Dans cette expérimentation, une distance d'isolement de 200 mètres sera maintenue par rapport à toute autre culture de maïs non expérimental. De plus, le site d'essai sera entouré de quatre rangs de bordure de maïs conventionnel de maturité relative similaire qui seront également détruits à la fin de l'expérimentation.

**7- Informations concernant les effets toxiques, allergisants ou autres effets nocifs résultant de la modification génétique sur la santé publique**

Le maïs 1507 exprime les protéines Cry1F et PAT. La sécurité de ces protéines a déjà été confirmée (Opinions de l'EFSA sur le maïs 1507, du 24 septembre 2004 pour l'import et la transformation, du 19 janvier 2005 pour l'utilisation dans l'alimentation humaine, du 19 janvier 2005 pour la culture). La mise en marché du maïs 1507 pour l'import et sa transformation pour l'alimentation animale a été autorisée par la Commission des Communautés européennes le 3 novembre 2005.

L'évaluation de la sécurité des protéines Cry1F et PAT exprimées dans le maïs 1507 s'est basée sur un grand nombre d'éléments, comme résumé ci-dessous. Ceci inclut l'utilisation précédente des protéines Cry1F et PAT; leurs modes d'action; spécificité d'activité biologique; similitude avec d'autres protéines ayant une longue pratique d'utilisation sûre; absence de toxicité vis à vis des mammifères; absence d'homologie avec des toxines connues; absence de résistance à la protéolyse; et, absence de stabilité à la chaleur.

Un résumé des caractéristiques principales des protéines Cry1F et PAT pertinentes pour l'évaluation de leur sécurité est fourni ci-dessous. L'évaluation complète de la sécurité est incluse dans le dossier de demande de mise en marché du maïs 1507.

En particulier, la sécurité de la protéine Cry1F elle a été confirmée sur la base de :

- Une longue pratique d'utilisation sûre des protéines Cry en tant que pesticides microbiens ;
- L'absence d'une évidence d'effets dangereux sur la santé humaine et la santé animale des protéines Cry provenant de *Bacillus thuringiensis*;
- Une toxicité spécifique et bien caractérisée de la protéine Cry1F vis à vis de certains insectes lépidoptères ravageurs;



- Un degré de spécificité très élevé vis à vis de certains insectes lépidoptères ravageurs comme la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*), le ver du maïs (*Spodoptera frugiperda*), le ver de l'épi (*Helicoverpa zea*) et la noctuelle (*Agrotis ipsilon*);
- L'absence dans les tissus des mammifères de récepteurs spécifiques de protéines Cry voisines telles que la protéine Cry1A(b);
- L'absence de toxicité de la protéine Cry1F vis à vis des hommes et des animaux comme l'ont montré les résultats d'une étude de toxicité orale aiguë chez les souris avec la protéine Cry1F et ceux d'une étude de toxicité chez les rongeurs pendant treize semaines (90 jours) avec du maïs 1507;
- L'absence d'homologie de séquence en acides aminés significative avec des toxines connues ou des protéines allergéniques;
- La dégradation rapide de la protéine Cry1F dans des conditions digestives simulées;
- La sensibilité de la protéine Cry1F à la chaleur et son inactivation à ou au-dessus de 70°C. Les protéines labiles à la chaleur sont dénaturées lorsqu'elles sont transformées ou chauffées et présentent des sites supplémentaires labiles aux protéases, ce qui augmente normalement le taux de dégradation.

La sécurité de la protéine PAT a été confirmée sur la base de :

- Une longue pratique d'utilisation sûre de la protéine PAT pour la consommation humaine et animale, basée sur des études précédentes avec des espèces tolérantes à l'herbicide glufosinate-ammonium;
- Le gène *pat* a été obtenu à l'origine à partir de la souche Tü494 de *Streptomyces viridochromogenes* qui n'a pas de potentiel toxique ou pathogène connu;
- La protéine PAT est enzymatiquement active mais elle a une grande spécificité de substrat pour l'ingrédient actif du glufosinate-ammonium (L-PPT), et un tel substrat ne se trouve pas dans la plante de maïs ou dans l'alimentation des hommes et des animaux;
- L'absence de toxicité vis à vis des hommes et des animaux comme démontré par une étude de toxicité aiguë chez les souris avec la protéine PAT;
- L'absence d'homologie avec des protéines connues;
- La dégradation rapide de la protéine PAT dans les fluides gastriques simulés;
- La sensibilité de la protéine PAT à la chaleur.

Une description détaillée de la protéine PAT est présentée dans le document consensus de l'OCDE (1999) d'information générale concernant les gènes et leurs enzymes qui confèrent la tolérance à l'herbicide phosphinothricine.

### *Allergénicité*

Le potentiel allergénique des protéines Cry1F et PAT a été évalué à travers: (i) l'évaluation du potentiel allergénique du donneur du gène, (ii) les recherches d'homologie avec des protéines allergènes connues (iii) l'évaluation de la sensibilité à la digestion simulée *in vitro* et de la thermolabilité, (iv) l'évaluation de la glycosylation de la protéine et, (v) l'estimation de l'exposition à la protéine. Les résultats obtenus ont confirmé qu'il n'y a pas de risque significatif que les protéines Cry1F et PAT deviennent des allergènes potentiels.

En particulier, le facteur le plus important à prendre en considération lors de l'évaluation du potentiel allergénique est si le donneur du gène introduit dans la plante est connu comme étant allergénique (FDA, 1992). Ni *Bacillus thuringiensis* (donneur du gène *cry1F*), ni *Streptomyces viridochromogenes* (donneur du gène *pat*) n'ont historiquement causé des allergies. De plus, ces organismes donneurs sont des bactéries communes du sol.

En conclusion, les protéines Cry1F et PAT exprimées dans le maïs 1507 ne présentent pas les caractéristiques associées aux protéines allergéniques. Donc, le maïs 1507 ne présente aucun risque allergénique significatif pour les hommes et les animaux.

De plus, le produit de la récolte de ces essais sera détruit et n'entrera pas dans la chaîne alimentaire. Donc, les mesures prises éviteront toute exposition pour les humains.

#### **8- Informations concernant la sécurité de la PSGM pour la santé des animaux notamment en ce qui concerne tout effet toxique, allergisant ou autre effet nocif résultant de la modification génétique lorsque la PSGM est destinée à être utilisée dans l'alimentation des animaux**

La sécurité du maïs 1507 pour l'import et sa transformation dans l'alimentation animale a été déterminée par l'EFSA (Opinion de l'EFSA sur le maïs 1507 du 24 septembre 2004). La mise en marché du maïs 1507 pour l'import et sa transformation pour l'alimentation animale a été autorisée par la Commission des Communautés européennes le 3 novembre 2005.

Le maïs génétiquement modifié 1507 objet de la présente demande de dissémination au champ n'est pas destiné à être utilisé dans l'alimentation des animaux. Le grain issu de ces essais sera détruit et ne rentrera pas dans la chaîne de consommation animale ou humaine.

#### **9- Mécanismes d'interaction entre la plante génétiquement modifiée et les organismes cibles (le cas échéant)**

L'expression de la protéine Cry1F dans le maïs 1507 permet la résistance contre certains insectes lépidoptères ravageurs au stade larvaire de croissance tels que la pyrale (*Ostrinia nubilalis*), le ver du maïs (*Spodoptera frugiperda*), le ver de l'épi de maïs (*Helicoverpa zea*) et la noctuelle (*Agrotis ipsilon*).

Le mécanisme d'interaction entre la protéine Cry1F exprimée dans le maïs 1507 et les organismes cibles est extrêmement spécifique des insectes cibles ravageurs et il est similaire aux interactions bien caractérisées entre les protéines Cry de *Bacillus thuringiensis* et les organismes cibles. De nombreuses  $\delta$ -endotoxines naturelles sont produites par les souches de *Bacillus thuringiensis* sous forme d'inclusions cristallines parasporales insolubles contenant des protéines (protoxines) d'une taille approximativement de 120-140 kDa (Schnepf *et al.*, 1998).

Après ingestion par les insectes sensibles, ces classes de protoxines cristallines se dissolvent dans les conditions alcalines de l'intestin de l'insecte et sont transformées par les protéases pour relâcher le core actif de la toxine comprenant la partie amino-

terminale de la molécule (par exemple les résidus 28 à 612 de la protéine Cry1F native). Les toxines activées ont typiquement une taille de 65-70 kDa. Ces toxines se lient aux récepteurs spécifiques sur les microvillosités apicales des cellules épithéliales de l'intestin des insectes cibles. La liaison de la toxine activée entraîne un changement conformationnel de la toxine et son insertion dans la membrane de l'intestin des insectes. L'oligomérisation de la toxine a lieu avec la formation de pores dans la membrane des cellules de l'intestin causant la lyse osmotique des cellules conduisant à la mort des insectes.

### **10- Modifications potentielles des interactions de la PSGM avec les organismes non-cibles résultant de la modification génétique**

Pour les plantes de maïs génétiquement modifié, il n'y a pas, jusqu'à présent, d'interactions avec des organismes non-cibles. Aucun écosystème non-cible ne devrait être affecté étant donné que l'activité de la  $\delta$ -endotoxine Cry1F est spécifique de certaines larves d'insectes lépidoptères seulement (point **D.1**) et affectera seulement ces larves se nourrissant sur le maïs génétiquement modifié. De plus, de multiples études ont été réalisées pour démontrer l'absence de toxicité de la protéine Cry1F vis à vis des organismes non-cibles et des organismes utiles.

Les résultats d'études spécifiques sur une série d'organismes non-cibles sont résumés ci-dessous (la protéine Cry1F d'origine microbienne a été utilisée dans certaines de ces études après avoir obtenu la confirmation de son équivalence à la protéine Cry1F produite dans le maïs).

Aucune espèce testée à ce jour n'a montré d'effet néfaste aux niveaux testés. Certaines espèces testées comprennent les chrysopes (*Chrysoperla carnea*), les coccinelles convergentes (*Hippodamia convergens*), les parasites utiles *Nasonia vitripennis*, les abeilles domestiques (*Apis mellifera* L.), les vers de terre (*Eisenia foetida*) et le cladocère (*Daphnia magna*).

#### *Etudes de toxicité sur des organismes non-cibles*

##### **Arthropodes non-cibles**

Une série d'études de toxicité alimentaire a été réalisée sur des insectes non-cibles représentatifs. Ceux-ci comprenaient les chrysopes (*Chrysoperla carnea*), les coccinelles convergentes (*Hippodamia convergens*), les parasites utiles hyménoptères (*Nasonia vitripennis*). Aucun décès ou signe de toxicité n'a été observé pour la larve de chrysope (*Chrysoperla carnea*), les coccinelles convergentes (*Hippodamia convergens*) ou les parasites utiles hyménoptères (*Nasonia vitripennis*). Il en résulte que les valeurs de concentration létale à 50% (LC50<sup>\*</sup>) pour chaque insecte non-cible n'ont pu être établies et furent donc estimées comme étant supérieures à 480 ppm pour les chrysopes (*Chrysoperla carnea*), les coccinelles convergentes (*Hippodamia convergens*) (c'est-à-dire jusqu'à 30 fois la concentration en protéine Cry1F présente dans le pollen de maïs 1507) et supérieures à 320 ppm pour le parasite utile Hyménoptère *Nasonia vitripennis* (c'est-à-dire jusqu'à 20 fois la concentration en protéine Cry1F présente dans le pollen de maïs 1507).

---

\* Concentration estimée de Cry1F pour tuer 50% des insectes

De plus, bien que la protéine Cry1F présente un spectre relativement large d'activité contre les insectes Lépidoptères cibles spécifiques, elle a été découverte non-toxique pour les Lépidoptères non-cibles tels que le papillon Monarque (*Danaus plexippus*) (Hellmich *et al.*, 2001).

En outre, les niveaux d'arthropodes bénéfiques présents dans les parcelles de maïs 1507 ont été comparés à ceux de parcelles de maïs non-transgéniques équivalents. Le nombre d'adultes et de larves des scarabées *Cycloneda munda* et *Coleomegilla maculata*), d'*Orius insidiosus*, des punaises de la famille des *Reduviidae*, des libellules de la famille des *Nabidae*, des chrysopes bruns de la famille des *Hemerobiidae*, des chrysopes (*Chrysoperla plorabunda*), des insectes prédateurs de la famille des *Carabidae* et des Hyménoptères parasites des familles des *Ichneumonidae* et *Brachonidae*, des libellules de l'ordre des *Odonata*, et d'araignées a été évalué visuellement et/ou avec des pièges. Les résultats montrent que l'expression de la protéine Cry1F dans le maïs 1507 n'a aucun effet sur la présence des arthropodes utiles observés.

Une étude de la faune sur le terrain a été réalisée en 2000 en France pour étudier les interactions tritrophiques complexes dans l'écosystème du maïs 1507 comparées aux effets non-cibles observés après application d'un insecticide synthétique (Karate Xpress dont l'ingrédient actif est la lambda-cyhalothrine) habituellement utilisé pour contrôler l'infestation par *Ostrinia nubilalis*. Les résultats ont montré clairement que le traitement au Karate Xpress réduisait de manière significative la population d'arthropodes non-cibles tels que thrips, *Orius sp* ou les cicadelles alors qu'il n'y avait aucun effet défavorable du maïs 1507 sur la population d'arthropodes non-cibles.

#### Abeilles

Aucun effet n'a été observé sur la survie de la larve ou le comportement des adultes chez les abeilles (*Apis mellifera*). Une dose unique de 2 mg de pollen de maïs 1507 ou de 5.6 µg de protéine Cry1F d'origine microbienne en suspension dans une solution à 30% de saccharose a été administrée. Les résultats montrent que la protéine Cry1F n'a pas d'effet défavorable sur la survie de la larve d'abeille ni sur sa croissance.

#### Organismes terrestres

La protéine Cry1F d'origine microbienne ne montre aucune toxicité pour les vers de terre (*Eisenia foetida*) à une concentration équivalente jusqu'à 100 fois l'incorporation de plantes 1507 sénescents dans les 15 cm supérieurs du sol (à un taux de 62000 plantes par hectare). Donc, la  $LC_{50}$  \* n'a pu être déterminée et fut donc estimée comme étant supérieure à 1.7 mg de Cry1F par kg de sol sec.

Une étude en laboratoire a aussi été réalisée pour déterminer les effets chroniques de la protéine Cry1F sur la survie et la reproduction de l'invertébré du sol du genre *Collembola* (*Folsomia candida*). Il joue un rôle majeur dans les écosystèmes du sol car il se nourrit de matériaux de plantes en décomposition. Les résultats montrent que les concentrations représentant les taux d'exposition estimés qui sont 1560-, 388- et 79- fois plus élevés que ceux qui seraient rencontrés dans le champ ne causaient aucun effet défavorable sur cet invertébré après avoir été nourri à ce régime alimentaire pendant 28 jours.

---

\*  $LC_{50}$  : Concentration en Cry1F estimée nécessaire pour tuer 50% des insectes.

### Oiseaux sauvages

Des graines de maïs 1507 ont été broyées et données à de jeunes cailles (*Colinus virginianus*) dans l'alimentation pendant 5 jours. Les résultats ont montré qu'il n'y avait aucun effet défavorable et la valeur  $LC_{50}^{**}$  alimentaire n'a pu être déterminée et fut donc estimée comme étant supérieure à 100000 mg de grains de maïs 1507 par kg d'alimentation.

### Organismes aquatiques

Une étude de toxicité aiguë sur 48 heures avec le cladocère *Daphnia magna* a été réalisée en utilisant la protéine Cry1F d'origine microbienne et du pollen de maïs 1507. La concentration effective à 50%,  $EC_{50}^*$ , en 48 heures pour *Daphnia magna* exposé à la protéine Cry1F, n'a pu être déterminée et fut donc estimée comme étant supérieure à 100 mg de Cry1F par litre. Du pollen de maïs 1507 n'entraîna pas de mortalité et la valeur  $EC_{50}$  n'a pu être déterminée et fut donc estimée comme étant supérieure à 100 mg de pollen de maïs 1507 par litre.

L'activité biologique spécifique de la protéine Cry1F exprimée dans le maïs 1507 et l'absence de toxicité de la protéine Cry1F vis à vis d'organismes non-cibles et utiles vont fortement dans le sens d'une absence de toute toxicité significative vis à vis d'organismes non-cibles qui pourrait intervenir suite à l'exposition au maïs 1507.

## 11- Interactions potentielles avec l'environnement abiotique

L'expression des protéines Cry1F et PAT dans le maïs 1507 n'altère pas les interactions naturelles des plantes de maïs avec l'environnement abiotique. La persistance très limitée des protéines Cry1F dans l'environnement du sol couplé à l'ubiquité naturelle des gènes *cry1F* et *pat* dans le sol et à l'absence d'effets nuisibles sur les biota du sol (point D.10.) signifie une possibilité négligeable d'interactions néfastes avec l'environnement abiotique et aucun effet néfaste attendu sur les cycles biogéochimiques.

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

### a) Techniques de description phénotypique :

Le maïs est une espèce de la famille des *Gramineae* et a été largement caractérisée par sa taxonomie, ce qui permet de l'identifier visuellement.

Les plantes transgéniques exprimant la protéine Cry1F peuvent être identifiées par bio-test en utilisant des larves de lépidoptères tels que la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) ou la sésamie (*Sesamia nonagrioides*). La présence de la protéine Cry1F conduira à la mort des larves de pyrales ou sésamie.

---

\*\*  $LC_{50}$  : Concentration en Cry1F estimée nécessaire pour tuer 50% des insectes.

\*  $EC_{50}$  : (Concentration effective à 50%) : concentration en Cry1F qui inhibe la croissance de 50% par rapport aux témoins non traités.

L'identification des plantes transgéniques peut aussi se faire en appliquant des petites quantités d'herbicide glufosinate d'ammonium sur les feuilles des plantes. La présence de la protéine PAT se traduira par des feuilles en bonne santé, sans nécrose au point d'application du glufosinate d'ammonium.

b) Techniques de description génotypique (mise en évidence des séquences spécifiques dans le génome des plantes) :

L'identification des gènes introduits peut être faite à l'aide d'analyse PCR ou Southern.

**13- Information, le cas échéant, sur les précédentes disséminations de la plante génétiquement modifiée**

Pioneer a commencé à tester ce maïs génétiquement modifié en 1996.

La mise en marché du maïs 1507 a été autorisée en octobre 2001 aux Etats-Unis d'Amérique. De nombreux essais au champ avec du maïs 1507 ont été réalisés en Europe depuis 1998.

Aucun effet sur l'environnement n'a à ce jour été rapporté pour ces essais.

Les plantes de maïs 1507 se sont comportées comme prévu, sans qu'il n'y ait de caractéristiques morphologiques ou phénotypiques inattendues. En particulier, la capacité du maïs 1507 à devenir une mauvaise herbe n'a pas été accrue.

Pour les essais menés en Europe, un rapport suivant la décision 2003/701/CE a été remis et devrait être accessible sur le site web du jrc (<http://gmoinfo.jrc.it/>).

Tableau 5 : Liste des permis approuvés pour la dissémination de maïs 1507

Numéro de permis	Année	Localisation
98-040-10N	1998	Texas
98-040-13N	1998	Porto Rico
99-028-01R	1999	Iowa, Illinois, Indiana, Texas, Minnesota, Michigan, Dakota du Sud, Dakota du Nord, Wisconsin
B/IT/98/19	1998	Italie
B/FR/99.03.09	1999	France
B/FR/00.03.04	2000	France
00-021-03R	2000	Californie, Delaware, Géorgie, Illinois, Iowa, Indiana, Kansas, Maryland, Michigan, Minnesota, Missouri, Nebraska, Caroline du Nord, Dakota du Nord, Pennsylvanie, Dakota du Sud, Tennessee, Texas, Wisconsin, Porto Rico
B/FR/01.03.02	2001	France (semis en 2001, 2003 et 2004)
B/ES/01/09	2001	Espagne
01-022-03R	2001	Alabama, Californie, Colorado, Delaware, Floride, Géorgie, Indiana, Iowa, Kansas, Kentucky, Louisiane, Maryland, Michigan, Minnesota, Missouri, Nebraska, Caroline du Nord, Dakota du Nord, Ohio, Oklahoma, Pennsylvanie, Dakota du Sud, Tennessee, Texas, Wisconsin, Porto Rico
01-022-04R	2001	Hawaii
CFIA#01-PHI-183-COR01	2001	Canada
1827	2001	Chili
2256	2001	Chili
2751	2001	Chili
109/25.04.2000	2000	Bulgarie
23/13.04.2001	2001	Bulgarie
76/22.05.2002	2002	Bulgarie
B/ES/02/11	2002	Espagne
B/ES/03/11	2003	Espagne
24.111/2003	2002	Hongrie
B/ES/04/06	2004	Espagne
B/ES/04/11	2004	Espagne
B/FR/04.03.04	2004	France
B/FR/04.02.06 (GEVES)	2004	France (semis en 2004 et 2005)
B/FR/05.01.02	2005	France
113/5.04.2005	2005	Bulgarie
B/PL/05/02-01	2005	Pologne
B/ES/05/02	2005	Espagne
B/ES/05/07	2005	Espagne

## **E. INFORMATIONS CONCERNANT LE SITE DE DISSEMINATION**

### **1- Localisation et étendue des sites de dissémination :**

Le programme d'essais pourra être implanté dans les régions suivantes :

- Nord-Pas-de-Calais (Nord)
- Picardie (Aisne, Oise, Somme)
- Bourgogne (Saône et Loire)
- Rhône-Alpes (Ain, Isère, Drome)
- Centre (Eure et Loir, Loir et Cher, Indre, Indre et Loire, Loiret)
- Aquitaine (Landes, Lot et Garonne)
- Midi-Pyrénées (Haute-Garonne, Gers, Tarn, Tarn et Garonne)
- Languedoc-Roussillon (Aude)

Chaque année, il pourra y avoir jusqu'à 12 sites comprenant chacun jusqu'à 5000 m<sup>2</sup> semés en maïs génétiquement modifié 1507. D'autres OGM pourront être semés sur le même site. La surface totale en essais sur chaque site (toutes variétés et bordure comprises) sera donc supérieure.

### **2- Description des écosystèmes des sites de dissémination, y compris le climat, la flore et la faune.**

Les lieux d'essais sont situés dans des zones de culture traditionnelle du maïs. La faune et la flore n'ont pas de caractéristiques particulières et les champs ne sont pas situés dans des zones protégées ou à proximité de celles-ci.

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

On ne trouve pas d'espèces apparentées sexuellement compatibles en France ou en Europe.

### **4- Proximité du site de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées susceptibles d'être affectées.**

Les sites choisis pour cette dissémination se situent dans des zones agricoles qui ne sont pas à proximité de biotopes officiellement reconnus ou de zones protégées.



## F. INFORMATIONS CONCERNANT LA DISSEMINATION

### 1- Objectif de la dissémination

L'objectif de ce programme de recherche est de continuer à acquérir des connaissances sur le maïs 1507.

Différents types d'essais sont envisagés :

- Des essais en vue d'analyses de l'expression des protéines dans différents tissus de maïs prélevés à plusieurs stades de croissance, pour comparaison avec des combinaisons d'OGM contenant l'insert 1507.
- Des essais ayant pour objectif la collecte de données sur la valeur agronomique et la résistance aux insectes de variétés de maïs 1507.
- Des essais d'observation du comportement des plantes, pouvant faire l'objet de notations de données morpho-physiologiques

### 2- Date(s) et durée de l'expérimentation

Il est envisagé de réaliser l'expérimentation durant 4 campagnes de culture du maïs.

Tableau 6: Date et durée prévues de l'expérimentation

Campagne	Durée de la dissémination
2006	du 1 <sup>er</sup> avril à fin décembre
2007	du 1 <sup>er</sup> avril à fin décembre
2008	du 1 <sup>er</sup> avril à fin décembre
2009	du 1 <sup>er</sup> avril à fin décembre

### 3- Méthode de dissémination envisagée

Le semis se fera grain à grain en lignes espacées de 70 à 80 cm. La longueur de chaque ligne sera adaptée selon le type d'expérimentation. Les semences seront espacées d'environ 25 cm sur chaque rang. Aux extrémités des rangs, des allées seront pratiquées pour faciliter l'accès aux parcelles.

Les protocoles d'expérimentation sont présentés en Annexe 5.

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

La préparation et la gestion du site seront réalisées dans les conditions habituelles nécessaires à la bonne conduite des essais de maïs.

Pour les besoins de l'étude, des échantillons pourront être prélevés. A la fin de la dissémination, toutes les plantes ou déchets de plantes qui n'auront pas été récoltés

pour les analyses seront détruits par broyage et enfouis sur le site, de même que les plantes non-transgéniques qui auront servi de bordure.

A la fin des essais, le site sera régulièrement visité pendant l'année suivante, afin de contrôler l'apparition éventuelle de repousses. La culture suivante, qui ne sera pas une culture de maïs commercial, sera menée dans des conditions de culture normales, avec l'utilisation d'herbicides autres que le glufosinate-ammonium.

#### **5- Nombre approximatif de plantes (ou de plantes par mètre carré)**

La densité de peuplement sera approximativement de 80 000 plantes/ha.

## **G. INFORMATIONS SUR LES PLANS DE SURVEILLANCE, DE CONTROLE ET DE TRAITEMENT DU SITE ET DES DECHETS APRES DISSEMINATION**

### **1- Précautions prises**

- a) Distances des autres espèces végétales sexuellement compatibles, espèces parentales sauvages et cultivées

Il n'y a pas d'espèces végétales sexuellement compatibles susceptibles de se croiser avec le maïs en Europe.

- b) Mesures visant à minimiser ou à empêcher la dissémination de tout organe reproducteur de la PSGM (par exemple pollen, graines, tubercules)

La dissémination du pollen des plantes transgéniques sera contrôlée afin d'éviter que le pollen n'aille féconder d'autres plantes de maïs. Une distance d'isolement de 200 mètres sera maintenue par rapport à toute autre culture non-expérimentale de maïs. De plus, le site de dissémination sera entouré de 4 rangs de bordure de maïs conventionnel de maturité relative similaire qui seront détruits à la fin de la dissémination.

Les graines sur l'épi de maïs ne peuvent pas se disperser. Elles sont insérées sur une rafle et protégées d'un contact extérieur par de nombreuses spathes (prolongements foliaires).

Dans le cadre de l'expérimentation des graines pourront être prélevés pour analyse, et cela sera effectué par prélèvement de l'épi entier puis destruction du reste de l'épi et des grains non utilisés. Le grain récolté dans ces essais ne rentrera pas dans la chaîne alimentaire.

### **2- Description des méthodes de traitement du site après dissémination**

En fin de dissémination tous les éléments végétaux qui n'auront pas été récoltés pour être utilisés dans les analyses seront détruits par hachage et enfouissement sur le site. L'apparition de repousses fera l'objet d'une surveillance durant l'année suivant la dissémination. Pendant la jachère hivernale un traitement par un herbicide adapté (différent du glufosinate) sera effectué afin d'assurer leur destruction.

### **3- Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées y compris pour les déchets**

Les échantillons de plantes prélevés pour analyse seront conservés dans un laboratoire ayant reçu un agrément de la Commission de Génie Génétique. Les résidus des plantes ayant servi aux analyses seront incinérés.

Les déchets des plantes génétiquement modifiées produites par la dissémination, non récoltés, seront détruits par broyage et enfouissement sur le site.

#### **4- Description des plans et techniques de surveillance**

Les sites seront visités régulièrement pour les besoins agronomiques et expérimentaux.

Ces visites seront mises à profit pour observer le développement des plantes et vérifier la non dispersion de matériel.

Ces essais feront l'objet d'un suivi et de visites par les agents assermentés du service de la Protection des Végétaux pour vérifier la conformité de la dissémination par rapport aux conditions de l'autorisation.

#### **5- Description des plans d'urgence**

Le suivi régulier des essais permettra d'identifier de façon précoce tout événement ou développement non souhaitable, dû par exemple à un phénomène extérieur comme des conditions climatiques défavorables.

En cas d'urgence, la personne responsable de l'essai activera le plan d'urgence et informera immédiatement le Service Régional de la Protection des Végétaux en charge du contrôle des essais.

En cas d'urgence, l'essai pourra être détruit par application d'un herbicide autre que le glufosinate ou par destruction mécanique et enfouissement.

Néanmoins, l'évaluation des risques pour l'environnement n'a pas identifié d'effets néfastes pour la santé humaine et animale ou pour l'environnement concernant la dissémination volontaire de maïs 1507.

#### **6- Méthodes et procédures de protection du site**

Le site sera entouré de 4 rangs de bordure de maïs conventionnel de maturité relative similaire qui seront également détruits à la fin de la dissémination.

## **H. CONCLUSIONS CONCERNANT LES INCIDENCES POTENTIELLES SUR L'ENVIRONNEMENT DE LA DISSEMINATION DES PLANTES SUPERIEURES GENETIQUEMENT MODIFIEES (PSGM)**

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

La probabilité que le maïs 1507 devienne persistant dans l'environnement et donne naissance à une mauvaise herbe invasive est négligeable. Le maïs ne possède aucun caractère invasif et l'expression des protéines Cry1F et PAT ne donne pas un trait permettant le développement d'une caractéristique de ce type.

Les caractères de l'implantation invasive ont été généralement décrits comme : (1) l'aptitude des graines de la plante à germer dans de nombreux environnements ; (2) une germination discontinue et une grande longévité des graines ; (3) une croissance rapide depuis la phase végétative jusqu'à la floraison ; (4) une production continue de graines aussi longtemps que les conditions de culture le permettent ; (5) une auto-compatibilité mais partiellement autogame et apomictique ; (6) l'aptitude à être fécondé par des visiteurs non-spécialisés ou sous l'action du vent ; (7) une grande émission de graines dans un environnement favorable et une certaine émission de graines dans une large palette d'environnements ; (8) l'adaptation de la dispersion sur des distances courtes comme longues ; (9) la reproduction végétative ou la régénération à partir de fragments et la production de nombreux fragments (difficiles à enlever du sol) et (10) l'aptitude à la compétition interspécifique par des moyens spéciaux.

Le maïs ne présente aucune des caractéristiques de colonisation ci-dessus et il n'est pas invasif dans les écosystèmes naturels. Quelques espèces de *Zea* sont des plantes sauvages en Amérique Centrale, mais elles n'ont pas de tendances prononcées à coloniser. Le maïs hybride a été domestiqué de telle façon que les grains ne se séparent pas de la rafle sans l'intervention humaine. Les plantes de maïs sont annuelles et ne survivent pas généralement en Europe d'une saison de végétation à l'autre à cause de la faible capacité de dormance et la sensibilité des graines aux basses températures.

En cas de dissémination non intentionnelle du maïs génétiquement modifié 1507, les pratiques culturelles habituelles pour contrôler les autres maïs non génétiquement modifiés, telles que l'application d'un herbicide non-sélectif (autre que le glufosinate d'ammonium) ou la destruction mécanique et l'incorporation dans le sol pourront être utilisées.

### **2- Avantages ou inconvénients sélectifs conférés aux PSGM**

Comme cela était voulu, l'expression des protéines Cry1F et PAT dans le maïs 1507 confère des avantages spécifiques dans l'environnement agricole tels que la résistance à certains insectes Lépidoptères ravageurs comme la pyrale *Ostrinia nubilalis* ou la sésamie *Sesamia nonagrioides*, et la tolérance à l'herbicide glufosinate-ammonium.

Toutefois, le maïs est fortement domestiqué, à tel point qu'il ne peut pas s'établir comme espèce férale en dehors d'un environnement agricole à cause de ses caractéristiques de survie limitées dans des conditions européennes. Les avantages spécifiques présents dans le maïs 1507 ne confèrent pas à ces plantes un quelconque avantage sélectif dans un environnement naturel, c'est-à-dire hors de l'environnement agricole. Les attaques d'insectes font partie des multiples facteurs biotiques et abiotiques qui empêchent le développement du maïs en dehors d'environnements culturels très élaborés. Ainsi, l'expression de la protéine Cry1F permettant la résistance à certains insectes Lépidoptères ravageurs ne peut pas être considérée comme un avantage sélectif en dehors du milieu cultivé.

De plus, l'application d'un herbicide à large spectre, tel que le glufosinate d'ammonium, n'est pas communément utilisée en dehors de l'environnement agricole. Donc l'expression de la protéine PAT dans le maïs génétiquement modifié 1507 n'apporte pas un avantage sélectif en dehors du milieu de culture.

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

Il n'y a pas d'espèces végétales sexuellement compatibles ou apparentées sauvages de *Zea mays* existant en Europe, ce qui élimine tout potentiel de transfert de gènes à de telles espèces. La possibilité du transfert de gènes est donc limitée aux autres maïs cultivés. Toutefois ceci sera considérablement réduit par les conditions imposées pour la mise en place de ces essais dans lesquels une distance d'isolement de 200 mètres sera maintenue par rapport à toute autre culture de maïs commercial. De plus, le site sera entouré de 4 rangs de bordure de maïs conventionnel de maturité similaire qui seront également détruits à la fin de l'expérimentation.

Comme cela est décrit au point 2 ci-dessus, la modification génétique du maïs 1507 n'induit pas d'avantage sélectif pour ces plantes en dehors d'un environnement agricole de haute technicité.

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

Le maïs génétiquement modifié 1507 est un outil très performant et bénéfique pour l'environnement afin de contrôler certains insectes Lépidoptères, tels que la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) et la sésamie (*Sesamia spp.*). Toutefois, l'efficacité de ce maïs pourrait être diminuée si les insectes cibles développaient une résistance à la protéine insecticide Cry1F qui s'exprime dans le maïs génétiquement modifié. L'occurrence d'un tel phénomène, la résistance des insectes cibles, est négligeable dans le cas des essais prévus ici compte-tenu de la surface très limitée de dissémination. Le risque de développement d'une résistance des insectes est donc quasi-nul.

Pour la culture commerciale du maïs 1507, une proposition de gestion du développement de la résistance des insectes a été faite dans le contexte général de la surveillance de la mise en marché et sera mise en œuvre, le moment venu. Par

exemple, l'implantation de refuges (zones cultivées avec du maïs non résistant aux insectes lépidoptères) sera réalisée pour s'assurer que les rares insectes qui pourraient devenir résistants aux toxines Cry1F, et survivre, pourront s'accoupler avec des insectes sensibles. De cette façon, leur descendance restera sensible et pourra être contrôlée par les futurs champs de maïs Bt.

Aucun impact environnemental potentiel, immédiat et/ou différé, résultant d'interactions directes ou indirectes du maïs génétiquement modifié 1507 sur les organismes cibles dans l'environnement receveur n'est attendu pour cette dissémination volontaire de maïs 1507.

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

La dissémination volontaire du maïs génétiquement modifié 1507 aura un impact négligeable, immédiat et/ou différé résultant de l'interaction directe ou indirecte entre le maïs génétiquement modifié 1507 et les organismes non-cibles, sur l'environnement. Ceci tient aussi compte des organismes associés aux organismes cibles, y compris l'incidence sur les niveaux des populations des autres organismes. La spécificité de l'activité biologique et l'absence de toxicité pour les organismes non-cibles des protéines Cry1F et PAT confirment qu'il n'y aura pas d'effets nuisibles sur les organismes non-cibles découlant du maïs 1507.

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

Le maïs n'est pas considéré comme ayant des effets dangereux sur la santé humaine. De plus, le maïs a une longue pratique d'utilisation sûre dans l'alimentation humaine et animale. Le maïs 1507 n'introduit pas de nouvelles substances connues pour causer ou supposées causer des effets potentiels immédiats et/ou différés sur la santé humaine résultant des interactions directes ou indirectes potentielles entre le maïs 1507 et les personnes travaillant avec, étant en contact ou dans le voisinage de la dissémination du maïs 1507.

Comme discuté au point D.7., la sûreté des protéines Cry1F et PAT a été confirmée et le maïs 1507 ne présente pas de risque toxique ou allergénique significatif pour les hommes.

De plus, le maïs 1507 objet de ces essais sera détruit à la fin de la dissémination et n'entrera pas dans la chaîne alimentaire.

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

La dissémination du maïs 1507 n'a pas pour but l'alimentation animale. Le grain issu des essais sera détruit à la fin de l'expérimentation et n'entrera pas dans la chaîne alimentaire.

De plus, la modification génétique du maïs 1507 n'introduit pas de nouvelles substances connues pour causer ou supposées causer des effets potentiels immédiats et/ou différés sur la santé animale liés aux interactions directes ou indirectes entre le maïs génétiquement modifié.

**8- Incidences immédiates et/ou différées sur les processus bio géochimiques résultant des interactions directes et indirectes potentielles de l'OGM et des organismes cibles et non-cibles à proximité du ou des OGM disséminés**

Comme discuté aux points 4 et 5 ci-dessus, l'expression des protéines Cry1F et PAT dans le maïs 1507 aura des effets immédiats et/ou différés négligeables sur les processus bio géochimiques résultant des interactions directes et indirectes entre le maïs 1507 et les organismes cibles et non cibles dans le voisinage du maïs 1507.

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

Les techniques culturales, de gestion et de récolte utilisées pour le maïs 1507 seront identiques à celles qui sont appliquées pour du maïs non génétiquement modifié, à l'exception du traitement herbicide et du plan de surveillance proposé pour la mise sur le marché du maïs 1507.

Pour les besoins de l'étude, des échantillons pourront être prélevés. A la fin de la dissémination, toutes les plantes ou déchets de plantes qui n'auront pas été récoltés pour les analyses seront détruits par broyage et enfouis sur le site. Après la dissémination, la parcelle sera visitée régulièrement pendant une période d'un an après la destruction de l'essai, de façon à surveiller les repousses. La culture suivante, qui ne pourra pas être une culture commerciale de maïs, sera conduite selon les pratiques culturales usuelles, avec comme particularité l'emploi d'un désherbant différent du glufosinate-ammonium.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V. and Kemp, J.D. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2, pp. 335-350.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72:248-54.

Canadian Food Inspection Agency (1994) Regulatory Directive 94-11: The Biology of *Zea mays* L. (Corn/Maize). CFIA, Variety Section, Plant Health and Production Division, Plant Biotechnology Office, Ottawa

Chambers, J.A., Jelen, A., Gilbert, M.P., Jany, C.S., Johnson, T.B. and Gawron-Burke, C. (1991) Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* sbsp. *aizawai*. *J. Bacter.*, 173, 13, pp. 3966-3976.

Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol.*, 18:675-689.

Commission Decision of 3 November 2005 concerning the placing on the market, in accordance with Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council, of a maize product (*Zea mays* L. line 1507) genetically modified for resistance to certain lepidopteran pests and for tolerance of glufosinate ammonium (2005/772/EC). Official Journal of the European Union, L 291: 42-44. <http://europa.eu.int/eur-lex/>

Craig, W.F. (1977) Production of hybrid corn seed. *In: Corn and Corn Improvement*, Sprague, G.F. (ed). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, pp.671-719.

Del Valle, F.R., Pico, M.L., Camacho, J.L. and Bourges, H. (1983) Effect of processing parameters on trypsin inhibitor and lectin contents of tortillas from whole raw corn-soybean mixtures. *J. Food Sci.*, 48, pp. 246-252.

Eckes, P., Vijtewaal, B., Donn, G. (1989) Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-phosphinothricin in plants. *J. Cell. Biochem.*, 13D, p. 334.

EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Notification (Reference C/NL/00/10) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for import and processing, under Part C of Directive 2001/18/EC from Pioneer Hi-Bred

International/Mycogen Seeds (Question No EFSA-Q-2004-011). Opinion adopted on 24 September 2004.

EFSA (2005a) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for food use, under Regulation (EC) No 1829/2003 from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds (Application No EFSA-GMO-NL-2004-02) Opinion adopted on 19 January 2005.

EFSA (2005b) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/ES/01/01) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for import, feed and industrial processing and cultivation, under Part C of Directive 200/18/EC from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds (Question No EFSA-Q-2004-015) Opinion adopted on 19 January 2005.

FDA (1992). Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. Fed Reg., 57, 104, pp22984-23005.

Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Daniels, M. J., Mattila, H. R., Spencer, T., Bidne, K. G. and Lewis, L. C. (2001) Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *P.N.A.S.*, 98, 21, pp. 11925-11930.

Herrero, M.P. and Johnson, R.R. (1980) High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Science*, 20:796-800.

Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. and Crow J.H. (1989) Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant, Cell and Environment*, 12:83-91.

Jones, M.D. and Newell, L.C. (1948) Longevity of pollen and stigmas of grasses: buffalograss, *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm. and corn, *Zea Mays* L. *Journal of American Society of Agronomy*, 40:195-204.

Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. and Sanford J.C. (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327, 7, pp. 70-73.

Lonnquist, J.H. and Jugenheimer, R.W. (1943) Factors affecting the success of pollination in corn. *Journal of the American Society of Agronomists*, 35:923-933.

OECD (1999) Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. ENV/JM/MONO(99)13

Pietrzak, M., Shillito, R.D., Hohn, T. and Potrykus, I. (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Res*, 14:5857-5868.

Raynor, G.S., Ogden, E.C. and Hayes, J.V. (1972) Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy J.*, 64, pp. 420-427

Rossmann, E.C. (1949) Freezing injury of inbred and hybrid maize seed. *Agronomy Journal*, 41:574-583.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 3, pp. 775-806

Shaw, R.H. (1988) Climate requirement. *In: Corn and Corn Improvement*, Sprague, G.F. and Dudley, J.W. (eds). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, pp.609-638.

Wych, R.D. (1988) Production of hybrid seed corn. *In: Corn and Corn Improvement*, Sprague, G.F. and Dudley, J.W. (eds). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, pp.603-608.