

Avis en réponse à la saisine HCB - dossier NL-2005-23. Paris, le 21 octobre 2015

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie Anne M. A. Barny, Florence Bellivier, Philippe Berny, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno B. Chauvel, et al.

▶ **To cite this version:**

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie Anne M. A. Barny, Florence Bellivier, et al.. Avis en réponse à la saisine HCB - dossier NL-2005-23. Paris, le 21 octobre 2015. [0] Haut Conseil des Biotechnologies. 2015, 39 p. hal-02917605

HAL Id: hal-02917605
https://hal.inrae.fr/hal-02917605

Submitted on 19 Aug 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

Haut Conseil des Biotechnologies

COMITÉ SCIENTIFIQUE

AVIS

en réponse à la saisine HCB - dossier NL-2005-23[1].

Paris, le 21 octobre 2015

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 17 juillet 2015 par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt) d'une demande d'avis relative au dossier **EFSA-GMO-NL-2005-23** de demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié 59122 pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Ce dossier a été déposé conjointement par les sociétés Pioneer Hi-Bred International et Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC sur le fondement du règlement (CE) n°1829/2003 auprès de l'Autorité européenne de sécurité des aliments via les autorités compétentes néerlandaises, sous la référence EFSA-GMO-NL-2005-23.

Par cette saisine, les autorités compétentes françaises consultent le HCB au stade ultime de la préparation au vote des Etats membres à la Commission européenne.

Le Comité scientifique (CS)[2] du HCB a examiné le dossier en séance du 24 septembre 2015 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Le présent avis a été adopté par voie électronique le 21 octobre 2015 et publié le 2 décembre 2015.

[1] La saisine « **saisine HCB - dossier NL-2005-23** » est reproduite dans l'Annexe 1.

[2] La composition du CS ainsi que le rapporteur externe ayant contribué à l'élaboration de l'avis sont indiqués dans l'Annexe 2.

RESUME DE L'AVIS[3]

La saisine reçue par le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) porte sur l'évaluation du dossier EFSA-GMO-NL-2005-23. Ce dossier, déposé conjointement par les sociétés Pioneer Hi-Bred International et Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC, correspond à une demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié 59122 pour la culture, l'importation, la transformation et l'alimentation humaine et animale dans l'Union européenne.

Description du produit

Le maïs 59122 exprime les gènes *cry34Ab1* et *cry35Ab1* de la souche de *Bacillus thuringiensis* PS149B1. Ces séquences codent des endotoxines dont l'action conjointe confère une résistance à certains coléoptères (chrysomèles). Le maïs 59122 exprime également le gène *pat* de la bactérie du sol *Streptomyces viridochromogenes,* conférant une tolérance au glufosinate d'ammonium (phosphinotricine).

Les transgènes ont été caractérisés au niveau moléculaire : l'insert est localisé en un site unique dans le génome du maïs. Aucune autre région du vecteur de clonage n'a été transférée dans le génome du maïs 59122 en dehors de l'ADN-T. La séquence d'insertion comporte deux modifications portant sur des nucléotides situés dans le promoteur du gène de la *TA peroxydase*. Ces modifications situées dans des régions non traduites n'affectent pas les protéines codées par les transgènes. L'ADN-T est inséré en aval (1032 nt) de la séquence de terminaison 3' du gène *emp4* qui code une protéine PPR essentielle au développement du grain de maïs. La production de grains n'étant pas affectée dans les conditions de culture étudiées du maïs 59122, l'insertion de l'ADN-T ne semble pas altérer la fonction du gène *emp4*.

L'insert est stable au cours de plusieurs générations et est transmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant. Les protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT sont présentes dans les différents organes de la plante, à l'exception du pollen où la protéine PAT n'est pas détectable.

Enfin, concernant les caractéristiques agronomiques du maïs 59122 autres que celles liées aux transgènes, le CS du HCB conclut à l'absence de signification biologique des différences observées entre le maïs 59122 et la variété quasi-isogénique non GM.

Impact sur la santé humaine et animale

Dans son expertise rendue le 2 décembre 2005[4], l'Afssa considère qu'au regard de l'ensemble des éléments fournis par les pétitionnaires (résultats de composition chimique, des études de toxicité chez l'animal de laboratoire et de l'étude d'alimentarité chez le poulet), les produits dérivés des variétés de maïs 59122 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que le maïs conventionnel et ses produits dérivés. Le CS du HCB prend acte des résultats de cette évaluation.

[3] Ce résumé ne se substitue pas à l'analyse du dossier développée dans cet avis.

[4] Afssa – Saisine n°2005-SA-0303. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié 59122 résistant à des insectes et tolérant à un herbicide, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.

Impact sur l'environnement

Les risques potentiels pour l'environnement couvrent les conséquences d'une dissémination des transgènes, et les effets non intentionnels des transgènes sur les organismes cibles et non-cibles ainsi que les impacts indirects.

Dissémination

Le maïs est une plante annuelle non envahissante et aucune installation de populations férales n'a été observée en Europe. Toutefois, les graines peuvent survivre deux années dans le sol et donner quelques repousses qui devront être gérées par d'autres moyens que les herbicides à base de glufosinate d'ammonium pour lequel ce maïs est tolérant. La pollinisation maïs à maïs ne représente pas un risque pour l'environnement mais doit être prise en compte dans le cadre de la coexistence entre les filières GM et non GM incluant la filière « sans OGM ». Le maïs n'est pas interfécond avec d'autres espèces endogènes d'Europe.
Les risques de transfert des transgènes du maïs génétiquement modifié 59122 aux bactéries de l'environnement tellurique sont extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, négligeables pour la santé et l'environnement.

Impacts potentiels sur les organismes cibles

L'apparition, en quelques générations (*i.e.* en moins de 3-4 ans), de populations de *D. virgifera virgifera* résistantes aux protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 a été mise en évidence en laboratoire et en serre (mais pas en champ). Ces résultats de sélection soulignent l'importance de la mise en place des plans de gestion de la résistance des insectes cibles dans le cas où le maïs 59122 serait autorisé à la culture.

Une des possibilités pour retarder l'apparition de la résistance consisterait *a priori* à déployer plusieurs méthodes de lutte (avec des pratiques culturales adaptées comme la rotation des cultures). Le plus efficace, en matière de gestion de la résistance aux toxines Bt, serait de combiner les toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1 avec d'autres toxines Bt dans un seul et même maïs Bt (par un empilage de gènes). L'empilage de toxines – combiné avec la stratégie Haute Dose/Refuge et avec des pratiques culturales adaptées – apparaît être la meilleure stratégie pour contrecarrer l'apparition d'insectes cibles résistants.

Impacts potentiels sur les organismes non-cibles

Les premières conclusions du panel OGM de l'EFSA (EFSA, 2013a) semblent dans leur ensemble justifiées : en cas de culture du maïs Bt 59122, les effets sur les organismes non-cibles seraient sans doute limités. Toutefois, l'impossibilité de conclure à un effet des toxines exprimées par le maïs 59122 sur certaines espèces de coccinelles et l'incertitude associée au manque de données concernant un impact éventuel du maïs 59122 sur les insectes pollinisateurs ont conduit l'EFSA (EFSA, 2013b) à réviser ses conclusions. Dans les deux cas, le panel OGM a recommandé qu'une étude de laboratoire supplémentaire soit effectuée avant l'autorisation. La réponse des pétitionnaires ne figure pas dans le dossier examiné à la date du 24 septembre 2015 par le CS du HCB et n'a donc pas pu être étudiée.

Le CS du HCB s'accorde avec l'EFSA sur le fait qu'il ne peut conclure sur l'impact du maïs 59122 sur les organismes non-cibles dans l'attente des compléments d'information demandés aux pétitionnaires.

Mesures propres à assurer la coexistence

Le CS du HCB rappelle que, si elle était autorisée, la culture de maïs 59122 devrait être accompagnée de mesures propres à permettre la coexistence avec les filières de maïs non GM, incluant le cas particulier des filières dites « sans OGM », aux seuils réglementaires définis par le décret N°2012-128 du 30 janvier 2012, en prenant en compte les caractéristiques locales des paysages agricoles. Ces mesures devront être appliquées au titre de la coexistence des filières selon la loi n° 2008-595 du 25 juin 2008.

Plans de surveillance post-commercialisation

Les pétitionnaires prévoient un plan de surveillance générale, peu détaillé et s'étendant seulement sur la durée de l'autorisation. Concernant la santé, une surveillance générale n'est prévue pour les santés humaine et animale, que sur les exploitations agricoles (par le biais de questionnaires). Compte tenu des spécificités existantes dans chaque Etat-membre, il est demandé aux pétitionnaires de se rapprocher des autorités de santé françaises pour établir un plan de surveillance générale des santés humaine et animale.

Le CS du HCB demande que le plan de surveillance générale (sanitaire et environnementale) s'étende au-delà de la durée d'autorisation et que les coordonnées GPS / cadastrales des points étudiés soient fournies dans les rapports annuels, de façon à assurer un suivi pluri-annuel des cultures. Ces données géolocalisées pourraient être centralisées et interconnectées avec les autres données de pratiques agricoles. Le plan de surveillance générale environnementale des pétitionnaires mérite d'être actualisé en tenant compte des lignes directrices de l'EFSA les plus récentes et devrait fournir des précisions sur la façon dont les lignes de base propres aux diverses régions pédoclimatiques seront établies. Ce plan devrait être fourni pour évaluation avant toute autorisation.

Le plan de surveillance spécifique est destiné à mettre en évidence les changements prévisibles. Bien qu'un plan de surveillance concernant l'apparition d'insectes cibles résistants soit proposé par les pétitionnaires, les nouvelles données demandées par l'EFSA au sujet de l'impact potentiel du maïs 59122 sur les insectes pollinisateurs et des coccinelles n'ont pas été fournies. Le CS du HCB examinera ces données une fois qu'elles seront disponibles. Si un risque était identifié, notamment pour les coccinellidées de la tribu des *Stethorini* (consommatrices de tétranyques dans lesquelles les protéines Cry sont connues pour s'accumuler), et que ce risque était considéré comme non rédhibitoire à l'autorisation de la culture, une stratégie de gestion devra être proposée par les pétitionnaires. Le CS du HCB demandera que soit alors mise en place une surveillance spécifique appropriée.

En conclusion

Au terme de l'analyse de l'ensemble des données fournies par les pétitionnaires et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique et dans les avis pertinents d'autres agences d'évaluation, le CS du HCB retient les points suivants :

- les produits dérivés des variétés de maïs 59122 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que le maïs conventionnel et ses produits dérivés. Le CS du HCB note toutefois que les lignes directrices de l'EFSA, postérieures au dépôt du dossier, qui exigent une analyse de puissance pour l'évaluation de la toxicité et des tests statistiques d'équivalence pour l'analyse comparative de composition ne sont pas suivies ;
- les risques de transfert de gènes du maïs 59122 aux bactéries du sol sont extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, seraient négligeables pour la santé et l'environnement ;

- l'apparition de populations d'insectes cibles résistantes aux toxines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 au laboratoire et en serre souligne l'importance de la mise en place de plans appropriés de gestion de la résistance des organismes cibles et la nécessité de surveiller l'évolution de cette résistance dans le cas où le maïs 59122 serait autorisé à la culture. Le CS du HCB note que le recours à la culture d'empilages (maïs contenant une combinaison de toxines ciblant le même ravageur) sans avoir mis en culture préalablement un événement simple permettrait de retarder l'apparition de résistance aux toxines Bt chez les organismes cibles ;
- considérant l'impossibilité de conclure à un effet des toxines exprimées par le maïs 59122 sur certaines espèces de coccinelles et l'incertitude associée au manque de données concernant un impact éventuel du maïs 59122 sur les insectes pollinisateurs, le CS du HCB s'accorde avec l'EFSA sur le fait qu'il ne peut conclure sur l'impact du maïs 59122 sur les organismes non-cibles et attend les compléments d'information demandés aux pétitionnaires ;
- en termes de coexistence avec des cultures de maïs non GM, la dissémination de gènes par pollinisation est possible dans certaines conditions et le risque de repousses actuellement faible en Europe continentale pourrait cependant évoluer avec les changements climatiques. Le CS du HCB rappelle, que si la culture était autorisée, des dispositifs et des mesures doivent être mis en place, afin de permettre la coexistence entre les filières GM et non GM, incluant la filière « sans OGM » aux seuils réglementaires définis par le décret N°2012-128 du 30 janvier 2012 ;
- le plan de surveillance proposé mérite d'être actualisé au regard des lignes directrices de l'EFSA les plus récentes. Le CS du HCB demande que la surveillance soit étendue au-delà de la durée d'autorisation.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION 7

2. CARACTERISTIQUES DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES 7

2.1. DESCRIPTION DU PRODUIT 7

2.2. CARACTERISTIQUES DE LA CONSTRUCTION GENETIQUE 9

2.3. METHODE DE TRANSFORMATION 10

2.4. CARACTERISTIQUES DU MAÏS 59122 10

3. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE HUMAINE ET ANIMALE 14

4. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT 14

4.1. DISSEMINATION POTENTIELLE DU TRANSGENE PAR LES GRAINES ET CAS DES REPOUSSES 15

4.2. DISSEMINATION POTENTIELLE DU TRANSGENE PAR LE POLLEN VERS D'AUTRES PLANTES (TRANSFERT DE GENE VERTICAL) 15

4.3. DISSEMINATION POTENTIELLE DU TRANSGENE VERS LES BACTERIES DU SOL (TRANSFERT DE GENE HORIZONTAL) 16

4.4. IMPACT POTENTIEL SUR LES ORGANISMES CIBLES : EVALUATION DU RISQUE DE DEVELOPPEMENT DE RESISTANCE CHEZ LES INSECTES CIBLES 18

4.5. IMPACT POTENTIEL SUR LES ORGANISMES NON-CIBLES 21

4.6. IMPACTS ECOLOGIQUES INDIRECTS DE L'ADOPTION DE MAÏS 59122 25

5. COEXISTENCE DES FILIERES 25

6. PLAN DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION 27

6.1. PLAN DE SURVEILLANCE GENERALE 27

6.2. PLAN DE SURVEILLANCE SPECIFIQUE 28

7. CONCLUSIONS 28

8. BIBLIOGRAPHIE 29

ANNEXE 1 : SAISINE 38

ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS 39

1. Introduction

Le dossier EFSA-GMO-NL-2005-23, soumis par les sociétés Pioneer Hi-Bred International et Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC sur le fondement du règlement (CE) n°1829/2003[5] auprès de l'EFSA[6], est une demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié 59122 pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Par cette saisine, le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) est saisi par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt) d'une demande d'avis sur ce dossier au stade ultime de la préparation au vote des Etats membres à la Commission européenne. Cependant, un nouvel avis de l'EFSA, en complément de l'avis adopté le 6 mars 2013 et de l'avis complémentaire adopté le 23 octobre 2013, est susceptible d'être publié avant ce vote.

En effet, en mars 2013, l'EFSA a rendu un avis scientifique sur le maïs 59122. Le Panel OGM concluait que le maïs GM 59122 ne présentait aucun risque pour la santé humaine ou animale.

Cependant, peu après avoir rendu son avis et dans le cadre de son processus de surveillance continue de la littérature scientifique, l'EFSA a identifié des biais ou des manquements dans les données utilisées pour établir ses conclusions en ce qui concerne les effets indésirables potentiels du maïs 59122 sur des organismes spécifiques tels que les abeilles et les coccinelles. Par conséquent, l'EFSA a révisé son évaluation des risques, n'étant plus en mesure de conclure sur la sécurité environnementale du maïs GM 59122. L'EFSA recommandait alors au demandeur dans un avis complémentaire adopté le 23 octobre 2013 de fournir les données manquantes (à l'issue d'une étude supplémentaire menée en laboratoire) afin de mener à terme l'évaluation des risques environnementaux.

2. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

2.1. Description du produit

Le maïs 59122 exprime les versions optimisées des gènes *cry34Ab1* et *cry35Ab1* de la souche de *Bacillus thuringiensis* PS149B1. Ces séquences codent des endotoxines dont l'action conjointe confère une résistance à certains coléoptères tels que les chrysomèles *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi* et *Diabrotica undecimpunctata howardi*.

Le maïs 59122 exprime également une version synthétique de la séquence *pat* de la bactérie du sol *Streptomyces viridochromogenes,* codant la phosphinothricine acétyl-transférase et conférant une tolérance au glufosinate d'ammonium (phosphinotricine), un herbicide de contact non spécifique à large spectre. Il agit en inhibant l'activité de la glutamine synthétase, entraînant ainsi une accumulation létale d'ammoniac dans les cellules végétales.

[5] Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. (Plus précisément, pour clarifier une confusion inhérente à la traduction française de ce titre, ce règlement concerne les denrées alimentaires et les aliments, pouvant consister en des OGM, contenir des OGM, ou être issus d'OGM, utilisés pour l'alimentation animale.):
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML

[6] EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments, traduction de *European Food Safety Authority*.

Les pétitionnaires précisent que le caractère de tolérance à l'herbicide utilisé ici en tant que marqueur pour la sélection des plantes génétiquement transformées, n'est pas destiné à être exploité dans la gestion agronomique des cultures de maïs 59122 en Europe[7].

Plusieurs publications rapportent des données concernant les propriétés et le mode d'action des protéines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 (Ellis et al., 2002; Li et al., 2013; Masson et al., 2004; Moellenbeck et al., 2001; Schnepf et al., 2005). La protéine Cry34Ab1 présente à elle seule une certaine activité larvicide, alors que la protéine Cry35Ab1 ne semble pas avoir d'effet toxique par elle-même. Elle agit en revanche de façon synergique, en renforçant l'activité insecticide de Cry34Ab1.

La protéine Cry35Ab1 a respectivement 26 et 29% d'identité de séquence avec les protéines BinA et BinB de *Lysinibacillus sphaericus* connues pour leur activité insecticide vis-à-vis de certains diptères (Ellis et al., 2002). La structure tridimensionnelle des deux protéines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 a récemment été déterminée (Kelker et al., 2014). L'analyse de la structure de la protéine Cry35Ab1 montre des similitudes avec la structure des protéines Bin, susceptibles de former des pores dans des membranes reconstituées formées de bicouches lipidiques (Schwartz et al., 2001) ou dans des cellules épithéliales produisant un récepteur spécifique (Pauchet et al., 2005), suggérant que la protéine Cry35Ab1 peut aussi conduire à la formation de pores dans les cellules cibles. Comme les toxines Bin, les toxines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 sont en effet aussi capables de former des pores en membrane reconstituée (bicouches lipidiques planes ou liposomes), et leur activité est plus efficace si les deux protéines sont utilisées ensemble (Masson et al., 2004).

Ces structures 3-D révèlent aussi que ces deux toxines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 présentent des analogies avec des protéines, comme l'aérolysine, connues pour être impliquées dans la formation de pores membranaires (Kelker et al., 2014; Palma et al., 2014).

Bien que la protéine Cry34Ab1 semble jouer un rôle majeur dans l'activité insecticide sur les larves de *Diabrotica*, des essais biologiques réalisés sur des larves de *D. undecimpunctata howardi* montrent que l'association des deux protéines confère une activité accrue (Herman et al., 2002). Cependant, des ratios de concentration Cry34Ab1/Cry35Ab1 optimaux n'ont pas pu être définis de façon précise. Selon les expériences, les concentrations de protéines (Cry34Ab1 + Cry35Ab1) requises pour obtenir 50 % de létalité des larves de *Diabrotica* sont comprises entre 5 et 50 µg de protéines par cm^2 de nourriture (Ellis et al., 2002; Herman et al., 2002; Moellenbeck et al., 2001; Schnepf et al., 2005). Ces valeurs sont relativement élevées si on les compare aux doses de toxines Cry1A (~ 5 ng / cm^2 de nourriture) utilisées pour tuer certaines larves de lépidoptères, ou aux protéines Bin actives sur moustiques qui ont une DL_{50} d'environ 300 ng / ml (Nicolas et al., 1993).

Les résultats publiés ne permettent pas de décrire plus précisément le mode d'action des toxines Cry34Ab1 et Cry35Ab1. Il n'existe pas de données sur la perméabilisation de vésicules de membranes à bordure en brosse de l'intestin, de cellules épithéliales intestinales ou de l'intestin isolé (ce qui a par exemple été démontré pour les toxines Cry1 et Cry3). Il n'y a pas non plus de données sur des récepteurs à Cry34Ab1/Cry35Ab1 et sur leur rôle éventuel dans le processus de perméabilisation. Les seules observations publiées, résultant d'une analyse histopathologique, indiquent que l'ingestion des protéines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 par des larves de *D. virgifera virgifera* induit un gonflement des cellules épithéliales de l'intestin et l'apparition de nombreuses

7 Par ailleurs, les conditions d'approbation de la substance active glufosinate en Europe ont été limitées aux utilisations en tant qu'herbicide pour l'épandage en bandes ou ponctuel par le règlement d'exécution (UE) n° 365/20132 de la Commission modifiant le règlement d'exécution (UE) n° 540/2011 en ce qui concerne les conditions d'approbation de la substance active glufosinate. Par conséquent, l'épandage généralisé sur les champs de maïs ne peut être autorisé.

vacuoles (Moellenbeck et al., 2001). Si l'on se fonde uniquement sur les données publiées, il apparaît donc que le mode d'action et la spécificité des protéines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 ne sont pas clairement déterminés.

2.2. Caractéristiques de la construction génétique

La construction transgénique à l'origine de l'événement 59122 est portée par le plasmide binaire PHP176 62 (50 321 pb).

Le vecteur contient :

- les gènes de virulence *virC1* et *virC2* d'*A. tumefaciens* nécessaires au transfert de l'ADN-T
- le gène de virulence *virG* d'*A. tumefaciens* qui régule la transcription des opérons *vir*
- l'opéron *virB* qui permet le passage de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* à la cellule végétale
- l'origine de réplication ORI ColE1 permettant la réplication du plasmide dans *Escherichia coli*
- deux sites *cos* correspondant aux extrémités cohésives du bactériophage lambda
- l'ADN-T qui est transféré à la cellule végétale
- le gène *spc* de résistance à la spectinomycine, originaire du transposon Tn7
- l'origine de réplication ORI ColE1 permettant la réplication du plasmide dans *E. coli*
- les gènes *tet R* et *tet A* conférant la résistance à la tétracycline
- le gène *1 TRFA* nécessaire à l'initiation de la réplication du plasmide
- ORI T, l'origine de transfert du plasmide
- l'opéron CTL, nécessaire à la partition du plasmide.

L'ADN-T (7 390 pb) porté par le plasmide PHP17662 comprend (Figure 1) :

- 25 pb correspondant à la bordure droite de l'ADN-T d'*A. tumefaciens*
- le promoteur constitutif *ubi1ZM* (1993 pb) du gène de l'ubiquitine 1 de *Zea mays* comprenant la région 5' UTR et 1009 pb de l'intron 1 du gène d'ubiquitine
- le gène synthétique *cry34Ab1* (372 pb) qui code une endotoxine dont la séquence peptidique est identique à celle produite par la souche de *Bacillus thuringiensis* PS149B1
- la séquence de terminaison *PINII* (315 pb) du gène de l'inhibiteur de protéinase II de *Solanum tuberosum*
- le promoteur *TA* du gène de peroxydase (1298) de *Triticum aestivum*
- le gène synthétique *cry35Ab1* (1152 pb) qui code une endotoxine dont la séquence peptidique est identique à celle produite par la souche de *Bacillus thuringiensis* PS149B1 ; les codons de la séquence nucléotidique ont été optimisés pour le maïs
- la séquence de terminaison *PIN II* (315 pb) du gène de l'inhibiteur de protéinase II de *Solanum tuberosum*
- le promoteur constitutif *35S* du virus de la mosaïque du chou-fleur
- une version synthétique du gène *pat* (552 pb) de *Streptomyces viridochromogenes*, dont les codons ont été optimisés
- le terminateur *35S* (194 pb) du virus de la mosaïque du chou-fleur
- la bordure gauche (25 pb) de l'ADN-T.

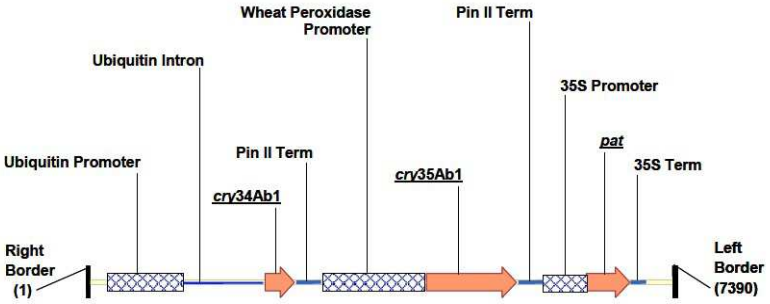


Figure 1 : Structure de l'ADN-T porté par le plasmide PHP17662 (Figure 2, p. 106)

2.3. Méthode de transformation

L'événement de transformation 59122 a été obtenu par transformation génétique d'embryons immatures de la lignée de maïs Hi-II par la souche désarmée d'*A. tumefaciens* LBA4404 contenant le vecteur binaire PHP17662. Après coculture, la sélection des régénérants génétiquement modifiés a été réalisée par l'ajout de glufosinate d'ammonium dans les milieux nutritifs.

2.4. Caractéristiques du maïs 59122

Des analyses génétiques, moléculaires et bioinformatiques, ont permis de caractériser l'événement 59122.

- Nombre de sites d'insertions et de copies des transgènes

Des analyses d'hybridation par Southern Blot ont été réalisées sur l'ADN génomique extrait de feuilles prélevées sur des individus T1S1 issus du croisement entre le transformant initial 59122 (T0) et la lignée PH09B, suivi d'une autofécondation. Des ADN extraits de feuilles de maïs HI-II utilisé pour la transformation génétique et du maïs PH09B, ont été utilisés comme témoins négatifs. Les résultats des hybridations réalisées avec huit sondes correspondant aux gènes *cry34Ab1, cry35Ab1, pat*, aux promoteurs *ubi, TA peroxydase, 35S*, à l'intron *ubi*, et au terminateur *PIN II* sur des digestions *Xho*I, *Sac*I, *Bsa*I et *Hind*III, mettent en évidence l'insertion d'une copie unique de l'ADN-T.

Aucune hybridation n'a été mise en évidence avec cinq sondes situées à l'extérieur de l'ADN-T, correspondant aux séquences *spc, tet, virG* et à deux séquences situées à proximité des bordures droite et gauche du plasmide PHP17662. Ces résultats ont été complétés en 2010 avec des sondes couvrant l'intégralité du plasmide vecteur. Les données d'hybridation permettent de conclure à l'absence de transfert du vecteur plasmidique dans le maïs 59122 en dehors de l'ADN-T.

- Structure et séquence de l'insert

L'événement d'insertion 59122 a été caractérisé après séquençage de fragments PCR couvrant l'intégralité de l'ADN-T (7343 pb). Les résultats obtenus mettent en évidence que la séquence d'insertion dans le maïs 59122 comporte deux modifications portant sur des nucléotides situés dans le promoteur du gène de la *TA peroxydase* (remplacement d'une adénine par une cytosine en position 3955, et d'une adénine en guanine en position 3991). Ces modifications situées dans des régions non traduites n'affectent pas les protéines codées

par les transgènes. Leur éventuel impact sur le niveau d'expression conféré par le promoteur du gène de la *TA peroxydase* n'a pas été étudié. Deux délétions sont également observées dans les bordures de l'ADN-T, l'une de 22 pb en 5', et la seconde de 25 pb en 3'.

- Séquençage des régions flanquantes

Des régions de 2593 pb en 5' de l'insertion et 1986 pb en 3' ont été séquencées. Des amplifications PCR ont été réalisées dans ces régions ; les résultats obtenus ont été comparés aux amplifications réalisées sur de l'ADN génomique extrait des maïs non transgéniques Hi-II et PH09B. La taille des fragments obtenus est conforme à celle attendue. Les résultats de séquençage montrent que les régions flanquantes correspondent à de l'ADN génomique de maïs.

L'analyse bioinformatique présentée dans le dossier en date du 15 octobre 2005 met en évidence en 5' des homologies avec des EST de maïs portant sur deux séquences, l'une de 179 pb et l'autre de 74 pb. La séquence de 179 pb présente des homologies avec des marqueurs moléculaires, des séquences chromosomiques et des séquences consensus de maïs ; la séquence de 74 pb présente des similitudes avec diverses ESTs de maïs et des séquences génomiques.

Dans la région flanquante en 3', deux séquences non contiguës de 162 pb et 57 pb, homologues à des séquences génomiques de maïs, ont été identifiées. La séquence de 162 pb présente des similitudes avec l'extrémité 3' non traduite d'un gène d'alcool déshydrogénase de maïs et avec plusieurs ESTs non caractérisées. La séquence de 57 pb montre des similitudes avec des régions non codantes du génome de maïs.

Ces résultats ont été complétés en 2012 (Krauss, 2012). En 5', 16 régions présentant des homologies avec des séquences génomiques de maïs ont été identifiées, dont cinq correspondent à des protéines hypothétiques. En 3', des homologies sont observées avec 17 séquences. Les nouvelles données permettent de préciser que l'ADN-T s'est inséré en aval (1032 nt) de la séquence de terminaison 3' du gène *emp4* (emp4 : « empty pericarp 4 ») qui code une protéine PPR (« pentatricopeptide repeat protein ») essentielle au développement du grain de maïs (Gabotti et al., 2014; Gutiérrez-Marcos et al., 2007). La production de grains n'étant pas affectée dans les conditions de culture étudiées du maïs 59122, l'insertion de l'ADN-T ne semble pas altérer la fonction du gène *emp4*.

- Identification des ORFs[8] potentiels présents dans les inserts et leurs jonctions

Un total de 457 ORF potentiels d'au moins huit acides aminés a été identifié dans l'insertion et les régions en 5' et 3' de l'insertion, correspondant à la région nt 2414-9993 (Krauss, 2012). A l'exception des gènes d'intérêt, les ORF ne possèdent pas l'ensemble des éléments nécessaires à une transcription et une traduction. La présence d'ARNs correspondant aux ORF potentiels n'a pas été recherchée.

Tous les ORF ont été analysés pour la production éventuelle de peptides allergènes (huit acides aminés contigus étant la séquence minimale pour constituer un épitope ou 35% d'identité sur une séquence d'au moins 80 acides aminés) et de toxines. Un intérêt particulier a été porté à un ORF appelé RB-2 situé du côté de la bordure droite de l'ADN-T et qui consisterait en 45 acides aminés. Pour l'ensemble des ORF, y compris RB-2, l'analyse *in silico* n'a pas mis en évidence d'homologies avec des allergènes ou des toxines.

[8] ORF (*Open Reading Frame*) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes informatiques, correspondant à une séquence d'ADN qui peut coder, si elle est préalablement transcrite, un peptide ou une protéine. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour tester si un ORF potentiel ainsi détecté est effectivement transcrit en ARN et traduit en peptide ou protéine.

- Stabilité et héritabilité des transgènes et de leur phénotype

La stabilité de l'insert a été étudiée par des analyses par Southern Blot (enzyme *Sac*I, sondes *cry34Ab1, cry35Ab1* et *pat*) réalisées sur l'ADN extrait de plantes de quatre générations différentes de maïs 59122 : T1S1, T1S2, BC1 et BC2S1. Les résultats obtenus mettent en évidence la stabilité de l'insertion jusqu'à la quatrième génération.

La tolérance au glufosinate d'ammonium et la présence des protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT ont été également étudiées au cours des différentes générations afin d'établir la stabilité d'expression des gènes introduits dans le maïs 59122. Les analyses montrent que les transgènes sont exprimés au cours des différentes générations ; ils sont cotransmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant (rapport 3:1 de plantes positives et négatives dans la descendance en ségrégation BC2S1).

L'analyse par Southern Blot réalisée sur 55 individus de la descendance BC2S1, positifs pour la tolérance à l'herbicide et exprimant le gène *cry34Ab1*, a confirmé l'intégrité et la stabilité génétique de la cassette d'expression. Aucune hybridation n'a été observée dans les ségrégants BC2S1 n'exprimant pas les transgènes, utilisés comme témoins négatifs.

- Expression des transgènes

Les protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT ont été quantifiées par ELISA sur : 1) différents organes de maïs 59122 cultivés au Chili (6 sites, années 2002-2003), aux Etats Unis et Canada (5 sites, année 2003), et en Europe (3 sites en 2003, et 6 sites en 2004). Les échantillons incluent des feuilles et des racines prélevées sur des plantes à différents stades de développement ; des plantes entières, du pollen, des tiges, des grains et du fourrage. Des dosages ont été réalisés sur des explants prélevés sur des plantes non traitées à l'herbicide, ou ayant reçu deux traitements au glufosinate d'ammonium ; des maïs non transgéniques ont été inclus dans les expérimentations.

Les analyses effectuées lors des essais 2003 en Europe (Bulgarie) mettent en évidence les quantités de protéines suivantes dans les grains : 31,3 à 95,9 ng/mg de poids sec pour Cry34Ab1 ; 1,3 à 3,4 ng/mg de poids sec pour Cry35Ab1 ; et 0,068 à 0,24 ng/mg de poids sec pour PAT. Dans le fourrage, les valeurs sont les suivantes : 73,4 à 104 ng/mg de poids sec pour Cry34Ab1 ; 38,7 à 76,6 ng/mg de poids sec pour Cry35Ab1 ; et 3,52 à 6,94ng/mg de poids sec pour PAT. Des variations du même ordre sont observées que les plantes soient ou non traitées à l'herbicide. Les essais réalisés en 2004 en Europe (Espagne et Bulgarie), et en 2003 au Chili et aux Etats-Unis ont conduit à des dosages protéiques voisins, des variations étant cependant observées en fonction des essais.

Les tests ELISA réalisés sur feuilles, racines, tiges, plantes entières, plantes sénescentes et pollen, mettent en évidence que les protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT sont présentes dans les différents organes, à l'exception du pollen où la protéine PAT n'est pas détectable, la limite de quantification étant de 0,27 ng/mg de poids sec. On observe des quantités de protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT plus faibles dans le système racinaire que dans les parties aériennes. Ces résultats ont été complétés en 2012 par des dosages des protéines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 dans le pollen de maïs transgéniques traités ou non par l'herbicide. La quantité de protéine Cry34Ab1 varie de 16,5 à 146 ng/mg de poids sec. Cry35Ab1 n'est pas détectable dans le pollen des maïs 59122 cultivés lors de trois des quatre essais réalisés en Europe en 2002 et 2003 ; des valeurs comprises entre 0,0172 ±0,073 et 0,1 ±0,17 ng/mg de poids sec ont été observées lors des autres essais au champ.

- Analyse comparative des caractéristiques agronomiques

La comparaison agronomique de la variété de maïs 59122 avec la variété hybride quasi-isogénique a été effectuée sur la base d'essais au champ qui ont été conduits :

- au Chili en 2002-2003 : 6 localités
- aux USA et au Canada en 2003 : 5 localités
- en Europe en 2003 : 3 localités en Bulgarie
- en Europe en 2004 : 6 localités, 3 en Bulgarie et 3 en Espagne

Pour chaque essai, le dispositif expérimental consiste en trois blocs complets randomisés. Chaque bloc étant divisé en deux micro-parcelles (plots), chacune comprenant deux lignes de semis de six mètres de long. Les traits mesurés incluent le nombre d'émergences après semis, le nombre final de plantes, huit traits liés à la croissance et la phénologie de la reproduction, deux traits concernant la morphologie du pollen (taille et couleur), la présence de maladies et la présence de dégâts d'insectes, soit quatorze traits au total. Le rendement n'a été mesuré que dans trois localités aux USA en 2003.

Le choix des localités d'expérimentation n'est pas explicité par les pétitionnaires. Pour l'Europe, les deux pays choisis (Espagne, Bulgarie) ne sont pas positionnés au sein des conditions pédoclimatiques de l'ensemble de la zone de culture du maïs. Le cas particulier des conditions de culture en climat tropical dans les départements et régions d'outre-mer n'est pas abordé, cependant le CS du HCB note que la présence du ravageur n'y a jamais été détectée.

Pour les trois premières expérimentations (Chili 2003, USA et Canada 2003, Europe 2003), aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le maïs 59122 et le maïs quasi-isogénique non GM. Par contre, pour l'expérimentation menée en Europe en 2004, les pétitionnaires mentionnent que des différences statistiquement significatives ont été observées pour plusieurs traits, pour certaines localités : taux d'émergence, hauteur des plantes, hauteur de l'épi et nombre final de plantes, sans préciser l'ampleur de ces différences en comparaison au témoin non GM. Le CS du HCB note aussi que les données de rendements sont manquantes.

Les pétitionnaires concluent à l'absence de signification biologique des différences observées entre le maïs 59122 et la variété quasi-isogénique non GM. Cependant, des différences statistiquement significatives étant observées, le CS du HCB aurait attendu une analyse plus détaillée et plus quantitative des résultats, ainsi qu'une proposition de justification à ces différences observées (pouvant potentiellement s'expliquer par la faible puissance des tests statistiques sur les jeux de données de taille réduite pour chaque localité ou encore par les caractéristiques pédoclimatiques de chacune des localités (interaction génotype-environnement)).
Sans prétendre remettre en question la validité des conclusions avancées par les pétitionnaires concernant les analyses comparatives des caractéristiques agronomiques , le CS du HCB note que la conclusion des pétitionnaires quant à l'absence de signification biologique des différences observées entre le maïs 59122 et le maïs quasi-isogénique mériterait d'être étayée en situant les différences observées en regard de la variation des traits (et leurs normes de réactions aux conditions environnementales) parmi les variétés de maïs actuellement commercialisées en Europe.

3. Evaluation des risques pour la santé humaine et animale

Les risques pour la santé humaine et animale associés à la consommation de maïs 59122 ont été évalués par l'Afssa[9] dans le cadre d'une saisine des autorités compétentes sur le dossier EFSA-GMO-NL-2005-23.

Dans son expertise rendue le 2 décembre 2005[10], l'Afssa considère qu'au regard de l'ensemble des éléments fournis par les pétitionnaires (résultats de composition chimique, des études de toxicité chez l'animal de laboratoire et de l'étude d'alimentarité chez le poulet), les produits dérivés des variétés de maïs 59122 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que le maïs conventionnel et ses produits dérivés.

Après présentation et discussion de l'analyse de l'Afssa, le CS du HCB prend acte des résultats de cette évaluation.

De nouveaux éléments publiés en 2008 et 2009 ont également été présentés et discutés (Appenzeller et al., 2009; He et al., 2008; Herman et al., 2007), et confirment les conclusions de l'avis initial de l'Afssa.

Le CS du HCB note cependant que les lignes directrices de l'EFSA qui exigent une analyse de puissance pour l'évaluation de la toxicité (EFSA, 2011a) et des tests statistiques d'équivalence pour l'analyse comparative de composition (EFSA, 2010, 2011b) ne sont pas suivies : aucune étude de puissance n'est proposée et aucun test d'équivalence n'est réalisé. Bien que le dépôt du dossier par les pétitionnaires soit antérieur à la publication de ces lignes directrices, une mise à jour du dossier sur ces points aurait été nécessaire. En effet, sans prétendre remettre en question la validité des conclusions avancées par les pétitionnaires concernant les analyses de composition, le CS du HCB rappelle que, d'un point de vue statistique, l'absence d'un risque ne peut être formulée sans y associer une probabilité d'erreur, ce qui nécessiterait une analyse de puissance, absente de ce dossier.

4. Evaluation des risques pour l'environnement

Les risques potentiels pour l'environnement incluent les conséquences d'une dissémination des transgènes, et les effets non intentionnels des transgènes sur les organismes cibles et non-cibles ainsi que les impacts indirects.

La dissémination des transgènes pourrait provenir d'une dispersion de graines, d'une dispersion de pollen, ou d'un transfert d'ADN vers des bactéries. Cette dissémination potentielle est, de plus, un point à considérer dans le cadre de la coexistence entre les filières GM et les filières non GM, incluant le cas particulier des filières non GM qualifiées de « sans OGM » (voir partie 5).

[9] Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments, devenue aujourd'hui l'Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, suite à sa fusion avec l'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail)

[10] Afssa – Saisine n°2005-SA-0303. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié 59122 résistant à des insectes et tolérant à un herbicide, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.

4.1. Dissémination potentielle du transgène par les graines et cas des repousses

Les grains de maïs restent attachés à l'épi à maturité ce qui limite leur dispersion (Doebley et al., 1990) sans que l'on puisse exclure cependant une dispersion des grains par des oiseaux délitant l'épi. Le risque de dispersion des graines se déroule essentiellement pendant la récolte dans les champs et pendant le transport des grains.

A la récolte, des grains, des épis ou des fragments d'épis peuvent rester sur la parcelle. Le risque d'apparition de repousses est supposé faible dans la mesure où les grains germent normalement à l'automne, les plantules issues de ces grains étant alors sujettes aux maladies fongiques et aux basses températures de l'hiver. Cependant, les conditions climatiques plus clémentes du sud de l'Europe (cas de l'Espagne) permettent l'apparition de repousses, ce qui dans le cas d'une succession maïs GM maïs conventionnel pourrait conduire à un mélange dans la récolte de maïs conventionnel. Palaudelmàs et al. (2009) ont spécifiquement étudié l'effet des repousses sur le flux de gènes dans la région de Foixà en Espagne. Dans 12 parcelles de maïs non GM, la densité de repousses issues de la culture de maïs génétiquement modifié l'année précédente atteignait jusqu'à 10 % du nombre total de plantes dans le champ (soit plus de 8000 plantes par hectare dans le cas étudié). Dans ce cas précis, les repousses se caractérisaient par une faible vigueur et formaient rarement des épis, la pollinisation croisée étant très réduite. Dans la situation la plus infestée, la proportion d'ADN génétiquement modifié dans la récolte atteignait 0,16 % (Palaudelmàs et al., 2009). Les repousses peuvent donc contribuer aux mélanges, mais leur rôle est significatif seulement dans le cas d'infestations de grande ampleur. Ces repousses ne persistant qu'un ou deux ans en Europe devraient néanmoins être prises en compte lorsqu'un agriculteur désire revenir à une culture de maïs conventionnel l'année suivant une culture de maïs GM. Par ailleurs, des observations de repousses ont aussi été rapportées dans des zones plus septentrionales (en Allemagne (Gruber, 2008), en France, Autriche et Slovénie (Czarnak-Kłos et al., 2010)). Ces observations pourraient se généraliser dans le cadre des changements climatiques. De plus, il faut noter que le climat des DROM-COM[11], où ce maïs serait susceptible d'être cultivé, pourrait permettre des repousses.

La dispersion des graines est possible pendant le transport. Ceci a été observé en Corée (Kim et al., 2006; Lee et al., 2009; Waminal et al., 2013) ce qui souligne que ce type de pertes doit être considéré lors des transports. En ce qui concerne la persistance des plants GM hors des champs issus du transport comparativement aux plants non GM, celle-ci pourrait résulter d'un avantage sélectif lié à sa tolérance au glufosinate-ammonium et à sa résistance aux insectes.

4.2. Dissémination potentielle du transgène par le pollen vers d'autres plantes (Transfert de gène vertical)

- <u>Dissémination potentielle du transgène par le pollen vers d'autres espèces :</u>

Concernant la dispersion du pollen vers des espèces apparentées, l'hybridation de maïs est possible avec d'autres espèces du genre *Zea*. S'il n'en existait pas de représentant sauvage ou cultivé autre que le maïs jusque récemment en Europe (Goodman, 1976), plusieurs sources d'information concordantes indiquent que des plants de téosinte (graminée du genre *Zea*) ont été ponctuellement signalés, en particulier comme adventice envahissante, en France depuis quelques années. Les possibilités de croisement avec des plantes sauvages apparentées restent donc encore très limitées en Europe, mais il serait pertinent de surveiller la progression de ces téosintes en France. Il est à noter que les pétitionnaires n'ont pas prolongé leur analyse dans certains DROM-COM dans lesquels ce maïs pourrait être cultivé, dans des conditions potentiellement plus favorables au maintien de repousses.

[11] DROM-COM : Départements et régions d'outre-mer - Collectivités d'outre-mer

- Dissémination potentielle du transgène par le pollen de champ de maïs à champ de maïs :

Le maïs est une plante essentiellement allogame et son pollen est disséminé de plante à plante par contact physique et par le vent (Bateman, 1947a; Treu and Emberlin, 2000). Les fleurs mâles (panicules) et femelles (soies) sont séparées sur la plante et la plupart des variétés actuelles expriment de la protandrie (fleur mâle démarrant sa floraison avant la fleur femelle) ce qui favorise l'allogamie. Le pollen est relativement lourd et la dispersion décroît rapidement avec la distance (Bateman, 1947b; Raynor et al., 1972). Toutefois, bien que les fécondations diminuent avec la distance, la dispersion à longue distance intervient également (Bannert and Stamp, 2007; Byrne and Fromherz, 2003; Jones and Brooks, 1950; Sanvido et al., 2008). Ainsi, certains paramètres largement soumis à des aléas peuvent influencer la pollinisation croisée et la survenue d'événements de dispersion à longue distance. Il s'agit de la dynamique de la floraison, les hétérogénéités spatiales (haies, forêts, relief, etc.), les mouvements convectifs du vent, sa vitesse et sa direction (Langhof et al., 2010). Ainsi, le pollen de maïs est susceptible d'être transporté sur de longues distances dans l'atmosphère sous l'effet du vent et des courants ascendants (i.e. altitude de 2 km (Brunet et al., 2012)) ceci contribuant à un « bruit de fond de dispersion ». On peut donc identifier trois dispersions qui ne sont pas suffisamment explicitées par les pétitionnaires : une dispersion locale à l'échelle du peuplement, une dispersion à courte distance à l'échelle du parcellaire qui peut attendre plusieurs centaines de mètres (Jarosz et al., 2005) et une dispersion à longue distance pouvant donner lieu à une pollinisation efficace (pollen encore viable) à 2 km (Brunet et al., 2012; Hofmann et al., 2014).

Les pétitionnaires ne font pas allusion au cas spécifique de la culture des variétés populations également surnommées variétés de pays ou variétés de conservation. Ces variétés sont utilisées pour des usages spécifiques (comme la production de polenta en Italie) ou pour l'agriculture biologique. Elles impliquent le re-semis continuel des semences produites *in situ*, sur l'exploitation ou à proximité (échanges entre agriculteurs). Dans le cas d'une présence dans un même bassin de production de champs de maïs génétiquement modifié et de champs de variétés populations, il en résulterait des mélanges possibles par pollinisation croisée aboutissant à des taux d'impuretés variétales dans les lots de semences qui s'amplifieraient avec le temps (van Heerwaarden et al., 2012). Dans leur étude menée en Italie, Bitocchi *et al.* montrent que le taux d'introgression depuis des hybrides cultivés varie selon les pratiques de l'agriculteur (Bitocchi et al., 2009).

4.3. Dissémination potentielle du transgène vers les bactéries du sol (Transfert de gène horizontal)

La possibilité de transfert de gènes entre plantes transgéniques et bactéries de l'environnement a été démontrée au laboratoire sur des modèles d'étude composés de plantes transgéniques variées et de quelques bactéries naturellement transformables utilisées comme réceptrices, principalement *Acinetobacter baylyi* (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008).

La plante en décomposition (résidusphère) constitue un écosystème extrêmement favorable à l'acquisition de gènes de la plante génétiquement modifiée par les bactéries du sol qui le colonisent (Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008). Comme dans le cas de la plante infectée par un pathogène, la décomposition du matériel végétal contribue à la libération de l'ADN au contact de bactéries métaboliquement très actives du fait de la disponibilité de nutriments, ce qui leur permet de développer un stade de compétence pour l'acquisition de gènes de plante par transfert horizontal. Il est toutefois important de rappeler que de tels événements de transfert de gène entre bactéries et plantes n'ont jamais été observés au champ (Demanèche et al., 2008).

La possibilité de transfert de l'ADN du transgène est liée à la présence de séquences procaryotiques, qui peuvent être intégrées par recombinaison homologue ou homéologue dans les régions de forte similarité nucléotidique présentes dans les génomes bactériens à des fréquences significatives, donc détectables. En théorie, les autres séquences typiquement végétales des génomes des plantes génétiquement modifiées pourraient également être intégrées dans les génomes bactériens par recombinaison illégitime, mais à des fréquences extrêmement faibles. De plus, de telles séquences constituent généralement un fardeau génétique pour la bactérie – puisque ne pouvant s'y exprimer –, leur fixation dans les génomes est donc improbable, comme le montre l'analyse des séquences des génomes bactériens dans lesquelles très peu de séquences d'origine végétale sont détectées.

Pour évaluer les potentialités de transfert de séquences transgéniques du maïs génétiquement modifié 59122 aux bactéries de l'environnement, il convient donc de considérer la structure de la cassette transgénique, et l'origine des gènes et des séquences qui la composent (section 2.2).

Des analyses par hybridation Southern ont mis en évidence l'insertion d'une copie unique de l'ADN-T et permettent de conclure à l'absence de transfert du vecteur plasmidique dans le maïs 59122 en dehors de l'ADN-T. La cassette transgénique comporte aussi les séquences promotrices et de terminaison d'origine végétale.

L'occurrence élevée dans le sol de bactéries donatrices des transgènes insérés dans le maïs 59122 (actinobactéries pour *pat* et *Bacillus thuringiensis* pour les gènes *cry*) signifie d'abord qu'il y aura dans les génomes des bactéries telluriques de nombreuses séquences de totale similarité avec l'ADN du transgène sur lesquelles pourra s'amorcer la recombinaison homologue et donc se réaliser le transfert entre la plante transgénique et les bactéries. Dans la majorité des cas cet événement conduira à remplacer une copie indigène par la copie provenant de la plante, sans conséquence notable sur l'expression. Au pire, l'événement de transformation rendrait fonctionnelle une copie jusque-là non fonctionnelle d'une de ces bactéries environnementales. Si ces gènes sont transférés avec leurs séquences promotrices et de terminaison (d'origine végétale) leur expression dans un contexte procaryotique est hautement improbable et le segment transféré deviendra un fardeau génétique susceptible d'être contre-sélectionné. Le maïs n'est pas une plante développant des symbioses fixatrices d'azote avec des nodosités sur les racines. De ce fait, il n'existe pas vraiment de niches à l'intérieur desquelles une bactérie spécifique pourrait être en contact avec l'ADN du végétal et potentiellement soumise à une exposition importante avec le transgène.
La présence dans le sol à des niveaux populationnels élevés de bactéries pourvues des séquences similaires à celles des transgènes signifie que l'acquisition par une bactérie d'une copie fonctionnelle grâce à l'ADN du transgène n'aura qu'une probabilité très faible de modifier la structure de la communauté bactérienne tellurique déjà pourvue d'un nombre élevé de bactéries possédant naturellement ces mêmes gènes.

Dans le cas où l'intégration dans le génome d'une bactérie se réaliserait de telle sorte que ces gènes puissent s'y exprimer, la question serait alors de savoir si la présence de bactéries ayant acquis l'un, l'autre ou même les trois gènes à partir de la plante pourrait avoir un impact sur l'équilibre populationnel et fonctionnel de la communauté bactérienne ou en d'autres termes si un avantage adaptatif pourrait être directement associé à cet événement :
- En ce qui concerne le gène *pat,* son acquisition par une bactérie pourrait accroître sa valeur adaptative en offrant un accès à de nouveaux nutriments, notamment dans le cadre d'une dégradation complète des sous-produits assurée par d'autres microorganismes. Dans de tels cas, la modification généralement observée au sein de la communauté bactérienne est un accroissement de la taille de la population dégradatrice sans changement majeur du reste de la communauté bactérienne. Cet effet est généralement transitoire, limité à la présence du composé avec un retour rapide à la structure taxonomique précédant l'emploi du composé.

- En ce qui concerne les gènes *Cry34Ab1* et *Cry35Ab1* codant des toxines leur réplication et potentielle expression chez un nouvel hôte devraient plutôt être considérées comme un fardeau génétique diminuant leur valeur adaptative.

Les risques de transfert des transgènes du maïs génétiquement modifié 59122 aux bactéries de l'environnement tellurique sont donc extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, négligeables pour la santé et l'environnement.

4.4. Impact potentiel sur les organismes cibles : Evaluation du risque de développement de résistance chez les insectes cibles

Les organismes cibles sont les organismes pour lesquels les traits spécifiques d'une plante GM sont insérés, généralement des ravageurs ou des pathogènes de la plante. Tous les autres organismes sont considérés comme des organismes non-cibles.

Ici, le maïs génétiquement modifié 59122 exprime les toxines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 dont l'action conjointe confère une résistance à certains insectes de l'ordre des coléoptères. Parmi ces insectes, certains sont des ravageurs du maïs, comme les chrysomèles *D. virgifera*. Ils sont dits cibles du maïs 59122 car les toxines qu'il exprime lui confèrent une protection contre ces ravageurs. D'autres insectes pourraient éventuellement être sensibles à la toxine sans pour autant être des ravageurs du maïs ; ils sont considérés parmi les organismes non-cibles (voir 4.5).

Espèce cible et risque de résistances

L'insecte cible du maïs 59122 en Europe est la chrysomèle du maïs *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera : Chrysomelidae). Le risque est celui d'une évolution de la résistance aux protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1, produite par ce maïs, dans les populations de ce ravageur (Siegfried et al., 1998). Cette évolution serait problématique pour deux raisons. Cette protéine, comme l'ensemble des protéines Cry de *Bacillus thuringiensis*, peuvent en effet être considérées comme des biens communs (Gassmann and Hutchison, 2012) ; à ce titre, il est essentiel de préserver leur activité insecticide. D'autre part, une évolution de la résistance pourrait conduire à un retour à d'autres pratiques (e.g. notamment l'utilisation d'insecticides) qui ont un impact environnemental beaucoup plus fort (Andow, 2008).

Les protéines Cry34Ab1/ Cry35Ab1, par un mode d'action singulier (Li et al., 2013), pourraient conférer à l'événement DAS-59122-7 une durabilité supérieure à l'événement MON 88017 (qui, lui, ne produit qu'une toxine, la protéine Cry3Bb1) (Devos et al., 2013). Les risques d'évolution de la résistance aux toxines de Bt semblent toutefois plus importants pour *D. virgifera virgifera* que pour d'autres ravageurs comme la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae) contrôlée par des maïs Bt comme le MON810 (Onstad et al., 2001). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence (Cullen et al., 2013) :

- La première est une fréquence d'allèles de résistance aux toxines Cry visiblement plus importante dans les populations de chrysomèles que dans les populations de lépidoptères (aux Etats-Unis) (Gassmann et al., 2011; Génissel et al., 2003; Onstad and Meinke, 2010; Tabashnik and Gould, 2012).

- La seconde est le fait que les maïs Bt ciblant la chrysomèle du maïs sont moins efficaces que ceux développés contre la pyrale du maïs (Siegfried and Hellmich, 2012; Tabashnik et al., 2009). Par exemple, le maïs 59122 n'engendre pas une mortalité de 100% des larves de chrysomèles sensibles : les maïs Bt qui produisent les toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1 ne font que ralentir le développement des larves de *D. virgifera virgifera*, les taux de mortalité n'étant pas supérieurs à ceux observés sur des maïs conventionnels non Bt (Rudeen and Gassmann, 2013). Les

événements homologués produisant d'autres toxines de Bt actives contre *D. virgifera virgifera* n'engendrent qu'une mortalité relative des larves de ce ravageur (Gassmann, 2012; Hibbard et al., 2010a, 2010b, 2011; Petzold-Maxwell et al., 2012; Storer et nal., 2006).

Dès lors, l'événement 59122, comme pour les autres événements homologués contre *D. virgifera virgifera*, ne peut pas être considéré comme un événement « haute-dose » (Rudeen and Gassmann, 2013). La stratégie haute-dose/refuge (HDR, (Alstad and Andow, 1995)), généralement mise en place pour limiter l'évolution de la résistance dans les populations des ravageurs cibles des maïs Bt, et recommandée par les pétitionnaires s'en trouve grandement fragilisée (Storer, 2003). En effet, en cas d'allèles majeurs de résistance, les hétérozygotes ont toutes chances de survivre, indépendamment du niveau de dominance des résistances conférées par ces allèles. Deitloff *et al*. (2015) ont d'ailleurs pu vérifier, expérimentalement, que la mise en place de refuges avait une efficacité limitée pour contrecarrer l'évolution de la résistance à l'événement 59122 dans des souches de *D. virgifera virgifera* (Deitloff et al., 2015).

Mise en évidence de résistances

La sélection, en quelques générations (*i.e.* en moins de 3-4 ans), en laboratoire et en serre de populations de *D. virgifera virgifera* résistantes aux quatre protéines Bt homologuées contre ce ravageur (Cry34Ab1/Cry35Ab1, Cry3Bb1, mCry3A et eCry3.1Ab) illustre le risque encouru (Cullen et al., 2013). Cette évolution rapide de la résistance, en quelques générations, avait d'ailleurs été prédite par les modélisations de Onstad *et al.* (2001) (Onstad et al., 2001).

Des résistances au maïs Bt exprimant les événements MON863 ou MON88017 – produisant la toxine Cry3Bb1 – ont ainsi été décrites en laboratoire et au champ (Gassmann, 2012; Gassmann et al., 2011, 2012; Gray, 2011a, 2011b, Meihls et al., 2008; Oswald et al., 2011; US EPA, 2011a; Wangila et al., 2015). Cette résistance à Cry3Bb1 engendre par ailleurs une résistance croisée à une autre toxine de Bt active contre *D. virgifera virgifera* et produite par l'événement MIR604 : mCry3A (Gassmann et al., 2014; Wangila et al., 2015). Des résistances à la toxine mCry3A ont ainsi été sélectionnées en laboratoire (Meihls et al., 2011) et détectées en champ (Gassmann et al., 2014; Wangila et al., 2015).

Une résistance à une troisième toxine de Bt, eCry3.1Ab, également active contre ce ravageur, a pu être rapidement sélectionnée en laboratoire (Frank et al., 2013).

Concernant les protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1, produites par le maïs 59122, il n'y a pour le moment aucune évidence de résistance au champ. Des sélections en laboratoire et en serre montrent toutefois des diminutions de la sensibilité des larves de *D. virgifera virgifera* au maïs 59122 en 10 à 15 générations (Deitloff et al., 2015; Lefko et al., 2008; Thompson, 2014). Les facteurs de résistance issus de ces sélections sont faibles et ne semblent pas liés à un gène majeur de résistance. A noter enfin que les estimations de CL50 et EC50 des populations de *Diabrotica virgifera virgifera* aux Etats-Unis entre 2004 et 2010 – fournies par les pétitionnaires – suggèrent une très légère diminution de la sensibilité au fil des ans.

Ces sélections sur des populations de *D. virgifera virgifera* rejoignent les autres cas de résistances développées ces dernières années, par d'autres ravageurs, aux toxines de Bt (Tabashnik et al., 2013). Par ailleurs, d'autres résistances – à des insecticides (Meinke et al., 1998; Siegfried et al., 2004; Wright et al., 2000) ou, moins classiquement, apparaissant malgré la mise en place de rotations de type maïs/soja (Dunbar and Gassmann, 2013; Gray et al., 2009; Levine and Oloumi-Sadeghi, 1996; Levine et al., 2002; Miller et al., 2009)– ont également été décrites dans les populations de *D. virgifera virgifera*.

Caractéristiques de ces résistances

Les résistances de *D. virgifera virgifera* aux toxines de Bt présentent trois caractéristiques qui compliquent leur gestion.

Premièrement, la résistance à la toxine Cry3Bb1 n'est associée qu'à un faible coût de la résistance (Hoffmann et al., 2015; Ingber and Gassmann, 2015), une grande partie des traits d'histoire de vie (fécondité, survie des mâles, longévité des adultes…) n'étant pas affectée (Hoffmann et al., 2014; Ingber and Gassmann, 2015; Petzold-Maxwell et al., 2012) voire même positivement affectée (Hoffmann et al., 2015; Oswald et al., 2012) par cette résistance. Les premières données sur la résistance aux toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1 suggèrent également une absence de coût (Thompson, 2014). Autrement dit, il n'y a pas de véritable réduction de la valeur sélective des individus porteurs de ces mutations en l'absence de pression de sélection. Cela ne laisse donc pas espérer une diminution de la fréquence des gènes conférant ces résistances en l'absence des maïs Bt produisant ces toxines.

Deuxièmement, les résistances sélectionnées à ce jour chez *D. virgifera virgifera* sont non-récessives (voir (Ingber and Gassmann, 2015; Meihls et al., 2008; Petzold-Maxwell et al., 2012) pour la résistance à la toxine Cry3Bb1 et (Thompson, 2014) pour la résistance aux toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1)), une caractéristique qui, couplée avec le fait que les événements ne produisent pas de « hautes-doses » de toxines (Gassmann et al., 2012; Hibbard et al., 2010a, 2010b, 2011; Petzold-Maxwell et al., 2012; Storer et al., 2006), fragilise la stratégie HDR (Alstad and Andow, 1995) et accélère donc leur sélection au champ.

Troisièmement, les individus résistants, même s'ils sont capables de se développer sur les maïs Bt ont une émergence, lorsqu'ils atteignent le stade adulte, retardée (Hitchon et al., 2015; Keweshan et al., 2015) ou avancée (Oswald et al., 2012) par rapport aux individus sensibles issus des maïs conventionnels (et donc des zones refuges). Ce décalage de phénologie engendre une plus faible probabilité de croisements entre les individus résistants et sensibles, limitant, là encore, l'efficacité de la stratégie HDR ((Alstad and Andow, 1995), mais voir (Kang et al., 2014)).

Conclusions

Ces résultats de sélection en laboratoire soulignent l'importance de mettre en place des plans de gestion de la résistance et d'en surveiller l'évolution dans le cas où la culture du maïs 59122 serait autorisée.

Le meilleur moyen de retarder l'apparition de la résistance serait *a priori* de déployer plusieurs méthodes de lutte incluant en particulier les rotations des cultures, si possible d'une année sur l'autre (Cullen et al., 2013). Toutefois la combinaison de maïs Bt et de traitements insecticides ne serait que d'une faible utilité en termes de protection des maïs et de rendement (Petzold-Maxwell et al., 2013; Tinsley et al., 2015). Cette combinaison risquerait même d'augmenter les risques d'évolution de résistances aux toxines de Bt (Petzold-Maxwell et al., 2013).

Les populations françaises de *D. virgifera virgifera*, fondées à partir d'un nombre limité d'individus en provenance des Etats-Unis (Ciosi et al., 2008; Miller et al., 2005), pourraient être exemptes d'allèles de résistance à la toxine de Cry3Bb1 (ce point pourrait être facilement déterminé par les pétitionnaires). Dans cette configuration, le plus efficace, en matière de gestion de la résistance, serait sans aucun doute de combiner les toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1 avec d'autres toxines de Bt dans un seul et même maïs Bt (par un empilage de gènes). Elle pourrait par exemple être couplée avec la toxine Cry3Bb1 – sachant qu'il n'y a pas de résistance croisée entre ces deux types de toxines (Gassmann et al., 2012). L'empilage de toxines est en effet la meilleure stratégie – couplée avec la stratégie HDR – pour contrecarrer la résistance (Consortium REX 2013). La combinaison de deux événements dans un même maïs améliore d'ailleurs la protection contre les attaques de *D. virgifera virgifera* (Head et al., 2014; Hitchon et

al., 2015; Keweshan et al., 2015; Prasifka et al., 2013). Aux Etats-Unis, des hybrides combinant entre autre les événements MON 88017 et 59122– et donc les toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1 et Cry3Bb1 – sont d'ailleurs en vente (e.g. maïs SmartStax®, développé par Monsanto Company and Dow AgroSciences LLC (Head et al., 2014; US EPA, 2011b) et vendus sous les marques de *Genuity* (pour Monsanto) et de *Mycogen* (pour Dow) (Cullen et al., 2013). Enfin, les protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 pourraient aussi être combinées avec les toxines de Bt Cr3Aa, Cry6Aa et Cry8Ba car ces toxines, actives contre les coléoptères, ne se lient pas sur le même site de liaison (Li et al., 2013), ce qui limite d'autant les risques de résistances croisées.

Se pose alors la question de la pertinence et du risque de mettre en culture des maïs ne contenant qu'un seul trait Bt. Pour exemple, la mise en culture du maïs MON 88017 aux Etats-Unis a conduit à une sélection rapide, au champ, de résistances à la toxine Cry3Bb1, diminuant l'efficacité – en termes de gestion de la résistance – des maïs combinant cette toxine avec les toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1. Le recours à la culture d'empilages (maïs contenant une combinaison de toxines) sans avoir mis en culture préalablement un événement simple permettrait de retarder cette apparition de résistance.

4.5. Impact potentiel sur les organismes non-cibles

Une préoccupation environnementale majeure est l'impact potentiel des plantes génétiquement modifiées sur la biodiversité et ses fonctions écologiques, à travers des interactions directes ou indirectes avec les populations d'organismes non-cibles. Les organismes non-cibles comprennent tous les organismes, animaux et plantes, dont les populations peuvent être non intentionnellement affectées, par un mécanisme spécifique ou non spécifique, résultant de l'insertion ou de l'expression des transgènes dans la plante génétiquement modifiée.

Effets liés à des changements non intentionnels dans la composition du maïs 59122

La caractérisation moléculaire de l'insert d'ADN et des régions adjacentes du maïs 59122 n'indique pas de changement dû à l'insertion des transgènes. En outre, aucune différence biologiquement pertinente n'a été détectée dans la composition du maïs 59122 en comparaison avec son homologue conventionnel (Herman et al., 2007). Plusieurs études suggèrent que les changements non intentionnels dans le maïs 59122, s'ils existent, n'ont pas d'effet substantiel sur les organismes non-cibles. La liste des études menées par les pétitionnaires et/ou publiées dans la littérature, est la suivante :

Herbivores

(1) Étude, par les pétitionnaires, du développement larvaire et de la survie de larves de *Danaus plexippus* (Lepidoptera : Danaidae), *Vanessa cardui* (Lepidoptera : Nymphalidae) et *Pieris rapae* (Lepidoptera : Pieridae) avec du pollen de maïs 59122.

(2) Essais de terrain aux États-Unis (2005-2007), en Hongrie (2006-2008) et en Espagne (2005-2007) sur l'abondance de populations d'herbivores comme les pucerons, les lépidoptères ravageurs, les cicadelles et les thrips.

Ennemis naturels

(1) Études en laboratoire du développement et de la survie larvaire ainsi que du poids des adultes des prédateurs *Coleomegilla maculata* et *Coccinella septempunctata* (Coleoptera : Coccinellidae). Les larves de ces deux coccinelles ont été nourries avec un milieu contenant (ou non) du pollen du maïs 59122.

(2) Essais de terrain aux États-Unis (2004-2005) et (2005-2007), en Espagne (2005-2007) et en Hongrie (2006-2008) pour comparer des densités de populations de carabes, coccinelles, staphylins, nabidés, *Orius* et plusieurs espèces du genre *Chrysopa*.

Insectes pollinisateurs

Étude en laboratoire sur la survie et le développement de larves d'abeilles (*Apis mellifera*, Hymenoptera : Apidae) de trois à cinq jours. Les abeilles ont été choisies comme représentantes des insectes pollinisateurs potentiellement exposés à des champs de maïs (Meissle et al., 2012). L'étude décrit des larves nourries avec du pollen issu de maïs GM (présenté dans le dossier comme du maïs 59122) ou de son équivalent quasi-isogénique (Maggi, 2001 (Annexe 26 du dossier). Cependant, il est apparu ultérieurement que l'étude avait été effectuée avec du pollen de maïs TC5639 et non de maïs 59122 (EFSA, 2013b). Le CS du HCB note que ces maïs expriment tous deux les protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1, mais que l'objectif de cette étude était d'évaluer les effets non intentionnels spécifiques à l'événement intégré dans le maïs 59122 et non l'impact associé aux protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1.

Un complément d'information concernant l'étude des effets non intentionnels du maïs 59122 sur les insectes pollinisateurs est donc attendu des pétitionnaires.

Décomposeurs

(1) Étude en laboratoire de la survie et la reproduction de *Folsomia candida* (Collembola : Isotomidae). Cette espèce de collembole a été choisie comme représentant des décomposeurs potentiellement exposés dans le sol.

(2) Suivi de la communauté du sol (collemboles et acariens) par les pétitionnaires réalisée aux États-Unis (2004-2005).

Ces études et suivis n'ont révélé aucun effet significatif du maïs 59122 sur ces organismes non-cibles à l'exception du poids des larves de *P. rapae* nourries avec du pollen de maïs 59122. Ce poids était significativement inférieur à celui des larves nourries de pollen de maïs non Bt. Cette différence n'est pas considérée comme biologiquement pertinente par les pétitionnaires, car la différence de poids était faible et le poids des larves ayant consommé du pollen de maïs 59122 était dans la gamme des poids observés sur l'ensemble des traitements.

Le manque de données sur les insectes pollinisateurs pose toutefois problème et l'incertitude résiduelle associée fait partie des raisons qui ont conduit l'EFSA à invalider les conclusions de son avis initial sur le maïs GM 59122 (EFSA, 2013b). Dans son avis complémentaire du 23 octobre 2013, l'EFSA demande aux pétitionnaires de fournir les données manquantes (à l'issue d'une étude supplémentaire menée en laboratoire) afin de mener à terme l'évaluation des risques environnementaux. La réponse des pétitionnaires ne figure pas dans le dossier examiné par le CS du HCB à la date du 24 septembre 2015 et n'a donc pas pu être étudiée.

<u>Effets liés aux toxines Cry34Ab1 et Cry35Ab1</u>

Toutes les espèces exposées ne pouvant faire l'objet d'une évaluation, la toxicité des protéines Bt est généralement testée sur un échantillon représentatif d'espèces à l'aide d'une approche dite « étagée » (eg (Romeis et al., 2008)). Dans le cas du maïs 59122, en accord avec les recommandations du panel OGM de l'EFSA sur l'évaluation des risques environnementaux des PGM (EFSA 2010), les pétitionnaires ont sélectionné un échantillon représentatif d'espèces d'arthropodes non-cibles en fonction de leur pertinence écologique, leur probable exposition aux éventuelles cultures de maïs 59122, leur sensibilité aux protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 et la

possibilité de les tester en laboratoire.

Herbivores appartenant à la même famille que l'espèce cible (Coleoptera : Chrysomelidae)

La chrysomèle de l'oseille, *Gastrophysa viridula*, paraît sensible aux toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1 : le poids moyen des adultes est plus faible lorsque les larves ont été exposées à du pollen de maïs 59122 – cette différence étant toutefois inférieure à 10% et ne survenant que pour les concentrations de pollen les plus élevées. Les espèces de la même famille que *D. virgifera virgifera* pourraient donc être sensibles aux toxines produites par le maïs DAS-59122-7.

La sensibilité aux protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 des larves de la plupart des espèces de chrysomèles non-cibles est inconnue. Pour ces espèces, le risque engendré par la mise en culture du maïs 59122 est toutefois intrinsèquement faible en raison (1) de leur faible abondance dans et autour des champs de maïs et (2) de la faible probabilité d'ingérer des quantités de pollen de maïs 59122 qui pourraient se déposer sur leurs plantes hôtes dans et autour des champs de maïs.

En outre, la seule espèce de chrysomèle protégée en Europe, *Macroplea pubipennis*, n'est pas présente dans les champs de maïs en raison de son mode de vie aquatique et n'est pas susceptible d'être affectée par des résidus de maïs dans les cours d'eau voisins en raison de son habitat marin.

Herbivores n'appartenant pas à la même famille que l'espèce cible

Les pétitionnaires ont testé la sensibilité aux toxines Cry34Ab1/35Ab1 d'une gamme d'herbivores qui sont soit taxonomiquement apparentés à la famille des Chrysomelidae, soit susceptibles d'être exposés à ces toxines en raison de leurs habitudes alimentaires. A ainsi été testée la sensibilité des larves de *Rhyzopertha dominica*, du petit perceur des grains (Coleoptera : Bostrichidae) ; *Sitophilus oryzae*, du charançon du riz (Coleoptera : Curculionidae) ; *Trogoderma variabile*, du trogoderme des entrepôts (Coleoptera : Dermestidae) ; *Cryptolestes pusillus*, du cucujide plat (Coleoptera : Laemophloeidae) ; *Oryzaephilus surinamensis*, du silvain (Coleoptera : Silvanidae) ; *Tenebrio molitor*, du ver de farine et *Tribolium castaneum*, du petit ver de farine (Coleoptera : Ténébrionidés) ; *Sitotroga cerealella*, de l'alucite des grains (Lepidoptera : Gelechiidae) ; *Ostrinia nubilalis*, de la pyrale du maïs (Lepidoptera : Crambidae); *Agrotis ipsilon*, de la noctuelle baignée et *Helicoverpa zea*, du ver de l'épi du maïs (Lepidoptera : Noctuidae) et *Rhopalosiphum maidis,* du puceron vert du maïs (Hemiptera : Aphididae).

Tous les tests se sont révélés négatifs – *ie* pas de différence significative de survie ou de développement larvaire – à l'exception de tests sur deux lépidoptères : la pyrale du maïs, *O. nubilalis* et l'alucite des grains *S. cerealella.* L'effet sur la pyrale ne se révèle qu'à forte concentration de toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1 et les larves de cette espèce ne semblent pas affectées par le pollen du maïs 59122. Ces résultats suggèrent que les protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 sont toxiques – sans doute à forte concentration – sur certaines espèces de lépidoptères (ce qui est en accord avec les effets sur *P. rapae*). En cas de culture de ce maïs Bt, le risque pour les lépidoptères non-cibles serait *a priori* très limité, les larves de ces papillons se nourrissant rarement sur des plantes localisées dans ou au voisinage des champs de maïs.

Ennemis naturels des ravageurs (prédateurs et parasitoïdes)

Les pétitionnaires ont effectué des tests de sensibilité et des suivis de populations en champ sur les espèces suivantes : le poécile cuivré *Poecilus cupreus* (Coleoptera : Carabidae), les coccinelles *Hippodamia convergens*, *C. maculata* et *C. septempunctata* (Coleoptera : Coccinellidae), la chrysope verte *Chrysoperla carnea* (Neuroptera : Chrysopidea), la punaise prédatrice des Thrips

Orius laevigatus (Hemiptera : Anthocoridae), le moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) et la guêpe hyménoptère parasite *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera : Pteromalidae).

Les données montrent que les protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 peuvent être toxiques pour *C. maculata* à des doses qui dépassent toutefois l'exposition aux champs. La croissance des larves de *C. maculata*, nourries avec un milieu contenant Cry34Ab1/Cry35Ab1, est en effet réduite de 80 %. À noter qu'aucun effet du pollen de maïs 59122 n'a pu être mis en évidence sur le développement et la survie larvaire ainsi que sur le poids des adultes de cette espèce. Aucun effet négatif n'a pu être détecté sur les deux autres coccinelles *C. septempunctata* et *H. convergens* ou sur les autres ennemis naturels testés.

La teneur en protéines Cry34Ab1 de pucerons se nourrissant de maïs 59122 est négligeable. Les données des pétitionnaires suggèrent également qu'il n'y a pas de « bioaccumulation » des protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 dans les acariens (eg *Tetranychus urticae*) nourris avec du maïs 59122. Ainsi, les prédateurs de ces deux types de proies ne devraient pas être surexposés aux toxines produites par ce maïs.

Toutefois, dans son avis de 2013, le COGEM – la commission néerlandaise indépendante sur les modifications génétiques en charge de l'évaluation environnementale du dossier – note que dans les études pour évaluer les effets néfastes possibles sur *Coccinella septempunctata*, les coccinelles ont été exposées à des niveaux de protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 faibles ou inconnus, de telle sorte qu'il est impossible de tirer des conclusions sur l'absence ou non d'un effet. Dans les essais supplémentaires sur le terrain réalisés en Hongrie en 2007 et 2008, les coccinelles étaient trop peu nombreuses sur le terrain de telle sorte qu'il demeurait difficile de tirer des conclusions robustes sur les effets possibles du maïs 59122 sur les coccinelles. Suite à une nouvelle analyse des données par l'EFSA, incluant une étude supplémentaire de laboratoire réalisée en 2009 (Califf and Ostrem, 2009), l'EFSA s'accordait avec le COGEM sur la nécessité de données supplémentaires pour pouvoir conclure sur les effets possibles des toxines du maïs 59122 sur les coccinelles (EFSA, 2013b). Un complément d'information supplémentaire a donc été demandé aux pétitionnaires.

Insectes pollinisateurs

Une autre étude que celle de Maggi (2001) sur les insectes pollinisateurs montre que le développement et la survie des larves d'abeille, *A. mellifera*, ne sont pas significativement affectés par l'ingestion directe de toxines à des concentrations de protéines Cry34Ab1/Cry35Ab1 100 fois plus importantes que celles qui sont présentes dans le pollen des maïs 59122.

Arthropodes du sol et aquatiques

Les pétitionnaires ont également réalisé des tests toxicologiques – en utilisant soit le pollen, soit directement les toxines Cry34Ab1/Cry35Ab1 – et des suivis d'abondances en champs sur des arthropodes du sol (notamment le collembole *F. candida*) et aquatiques (notamment la grande daphnie *Daphnia magna* (Cladocera : Daphniidae)). Aucune différence d'abondance, de survie ou de reproduction n'a pu être mise en évidence.

Non-arthropodes

Les données de toxicité présentées par les pétitionnaires ne font état d'aucun risque pour le ver du fumier *Eisenia fetida* (Haplotaxida : Lumbricidae) et pour les annélides en général.

Conclusion

Les premières conclusions du panel OGM de l'EFSA (EFSA, 2013a) semblent dans leur ensemble justifiées : en cas de culture du maïs Bt 59122, les effets sur les organismes non-cibles seraient sans doute limités. Cette analyse rejoint celle faite par Devos *et al.* (2012) (Devos et al., 2012) pour l'événement MON 88017 qui arrivait à la même conclusion.

Toutefois, l'impossibilité de conclure à un effet des toxines exprimées par le maïs 59122 sur certaines espèces de coccinelles et l'incertitude associée au manque de données concernant un impact éventuel du maïs 59122 sur les insectes pollinisateurs ont conduit l'EFSA (EFSA, 2013b) à réviser ces conclusions. Dans les deux cas, le panel OGM a recommandé qu'une étude de laboratoire supplémentaire soit effectuée avant l'autorisation.

Enfin, il est à noter qu'il n'existe aucune publication à comité de lecture sur les effets du maïs Bt 59122 sur les organismes non-cibles. Toutes les données proviennent d'essais réalisés ou commandités par les pétitionnaires, données qui n'ont pas fait l'objet de publications scientifiques référées.

Le CS du HCB s'accorde avec l'EFSA sur le fait qu'il ne peut conclure sur l'impact du maïs 59122 sur les organismes non-cibles dans l'attente des compléments d'information demandés aux pétitionnaires.

4.6. Impacts écologiques indirects de l'adoption de maïs 59122

Comme pour l'ensemble des pratiques agronomiques, l'évaluation de l'impact global associé à la production et aux différentes utilisations du maïs 59122 pourrait bénéficier d'une analyse de cycle de vie pour en connaître les bénéfices ou les impacts écologiques indirects.

5. Coexistence des filières

Traçabilité et étiquetage

L'identifiant unique communautaire DAS-59122-7 a été attribué au maïs 59122 conformément au Règlement (CE) 65/2004.

La méthode de détection / identification / quantification proposée par les pétitionnaires est basée sur les fragments de bordure et a été validée en 2007 par le CRL-GMFF (EURL-GMFF)[12] et le réseau ENGL.

Du matériel de référence certifié est disponible auprès de l'IRMM[13].

Coexistence

Dans le dossier, les pétitionnaires considèrent que la possibilité de survie de graines et de croissance jusqu'à floraison et donc de transfert de gènes à d'autres maïs est négligeable. Ils considèrent également que les éventuelles pertes de graines resteraient localisées et que le maïs, en raison de sa biologie, ne s'établirait pas de manière invasive, persistante et significative. Les

[12] Community Reference Laboratory for GM Food and Feed of the Joint Research Centre, Laboratoire de référence communautaire du Centre de recherche commun de la Commission Européenne, instauré par le règlement (CE) 1829/2003, appelé maintenant l'EURL-GMFF (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed : http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-gmff.

[13] Institute for Reference Materials and Measurements : l'un des sept instituts du laboratoire de référence communautaire, http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/homepage.htm.

pétitionnaires annoncent ne s'intéresser qu'à des pertes significatives de graines, par exemple lors d'opérations de chargement / déchargement.

Pourtant, l'utilisation de glufosinate – même si son usage n'est pas revendiqué dans le dossier – en désherbage autour des points d'entrée dans l'UE, le long des routes ou dans les champs, pourrait favoriser le maintien temporaire de repousses de maïs 59122 et interférer ultérieurement avec les cultures environnantes de maïs, impactant ainsi négativement les capacités de coexistence des cultures, en particulier des cultures dont la récolte est dédiée à la filière « sans OGM » aux seuils réglementaires définis par le décret N°2012-128 du 30 janvier 2012[14].

Le CS du HCB note toutefois qu'aucune formulation commerciale à base de glufosinate n'est autorisée en France pour un usage en zones non agricoles[15].

Les pétitionnaires considèrent en outre comme négligeable la possibilité de transferts de gènes à d'autres populations de maïs à partir de graines perdues germées et parvenues à floraison.

Pourtant, comme signalé dans le paragraphe 4.1., l'existence de repousses de maïs en Espagne (Palaudelmàs et al., 2009), en Allemagne (Gruber, 2008), mais aussi en Italie et en Autriche, et occasionnellement en France, Belgique, Grèce et Pologne (Czarnak-Kłos et al., 2010) amène à considérer la possibilité du développement de quelques plantes qui pourraient poser problème en coexistence si elles parvenaient à floraison, même si aucune population férale n'a pu être mise en évidence dans l'Europe continentale. Il conviendra donc de surveiller et éliminer, pour des raisons de coexistence des cultures, les éventuelles graines ayant germé et pouvant arriver à floraison, la situation pouvant évoluer avec le changement climatique comme rappelé par le COGEM (Van de Wiel et al., 2011).

De même, des plants de maïs sont généralement retrouvés autour des ports d'importation et plus généralement des voies de communication (Kim et al., 2006; Lee et al., 2009; Waminal et al., 2013). Il conviendrait donc que les Autorités compétentes diligentent des analyses de repousses de maïs 59122 autour des points d'entrée dans l'UE, et le long des routes menant à des lieux de stockage et transformation afin d'apprécier la présence de maïs 59122 pouvant impacter les conditions de coexistence avec les cultures conventionnelles et les cultures de la filière « sans OGM ».

Si elle était autorisée, la culture de maïs 59122 devrait être accompagnée de mesures propres à permettre la coexistence avec les filières de maïs non GM, incluant le cas particulier des filères dites « sans OGM », en prenant en compte les caractéristiques locales des paysages agricoles. Le HCB a rendu un avis sur la définition des conditions techniques relatives à la mise en culture, la récolte, le stockage et le transport des végétaux génétiquement modifiés visant à éviter la présence accidentelle d'OGM dans d'autres productions (HCB, 2012). Ces mesures pourront s'appuyer sur des distances d'isolement avec si possible des décalages de floraison (Beckmann et al., 2006; Devos et al., 2009) ou la constitution d'îlots homogènes de production (Bertheau, 2013; Quedas and de Carvalho, 2012). En outre les agriculteurs devront prendre des précautions pour l'utilisation du matériel agricole s'il est en contact avec des parcelles d'agriculture conventionnelle ou d'agriculture biologique afin de minimiser les risques de mélanges (Jank et al., 2006).

Enfin, le pollen de maïs pouvant être récolté par les abeilles (Vaissière and Vinson, 1994), puis stocké sous forme de pelotes dans des ruches sédentaires du voisinage, des mesures

[14] Décret N°2012-128 du 30 janvier 2012 relatif à l'étiquetage des denrées alimentaires issues de filières qualifiées « sans organismes génétiquement modifiés ».
[15] http://e-phy.agriculture.gouv.fr (consulté le 12 octobre 2015)

d'éloignement relatif devront être prises pour minimiser la probabilité de présence de pollen GM dans les produits issus de l'apiculture certifiée «biologique ».

6. Plan de surveillance post-commercialisation

En matière de surveillance post-commercialisation, la Directive 2001/18/CE[16] (EC, 2001b), complétée par les Règlements (CE) 1829/2003 (EC, 2003a) et 1830/2003[17] (EC, 2003b), prévoit que soient mis en place :

- un plan de surveillance spécifique, pour tester/confirmer d'éventuelles hypothèses émises lors de l'évaluation des risques pour l'environnement en ce qui concerne l'apparition et l'impact d'effets néfastes potentiels de l'OGM ou de son utilisation. Le plan de surveillance spécifique est destiné à mettre en évidence les changements prévisibles.
- un plan de surveillance générale, pour identifier l'apparition d'éventuels effets néfastes de l'OGM ou de son utilisation sur la santé humaine ou animale ou sur l'environnement qui n'auraient pas été anticipés lors de l'évaluation des risques pour l'environnement. Le plan de surveillance générale vise à mettre en évidence les changements non prévus par les plans de surveillance spécifique.

6.1. Plan de surveillance générale

Le but de la surveillance générale est de protéger l'environnement et la santé humaine et animale d'éventuels effets inattendus liés à la culture et aux applications du maïs 59122.

Les pétitionnaires prévoient un plan de surveillance générale, incluant l'implication des agriculteurs au travers de questionnaires, l'implication de réseaux de surveillance mais non clairement définis, et une veille de la littérature scientifique. Cependant, le plan de surveillance présenté est très peu détaillé et s'étend seulement sur la durée de l'autorisation. Le CS du HCB note également que les réponses aux questionnaires peuvent présenter des biais stratégiques dans le sens où les personnes interrogées n'ont pas nécessairement intérêt à fournir des réponses conformes à la réalité.

De plus concernant la santé, une surveillance générale n'est prévue par les pétitionnaires pour les santés humaine et animale, que sur les exploitations agricoles (par le biais de questionnaires). Compte tenu des spécificités existantes dans chaque état-membre, il est demandé aux pétitionnaires de se rapprocher des autorités de santé françaises pour établir un plan de surveillance générale des santés humaine et animale.

Le CS du HCB demande donc que le plan de surveillance générale (sanitaire et environnementale) s'étende au-delà de la durée d'autorisation et que les coordonnées GPS / cadastrales de points étudiées soient fournies dans les rapports annuels. Ces données géolocalisées pourraient être

[16] La Directive 2001/18/CE est une directive du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 qui fixe les règles communautaires relatives à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement. Elle abroge la directive 90/220/CEE du Conseil. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0018:FR:HTML

[17] Le Règlement (CE) 1830/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant la traçabilité et l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'organismes génétiquement modifiés, et modifiant la directive 2001/18/CE. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1830:FR:HTML

centralisées et interconnectées avec les autres données de pratiques agricoles. Le plan de surveillance générale des pétitionnaires mérite d'être actualisé en tenant compte des lignes directrices de l'EFSA les plus récentes (EFSA, 2011c) en matière de plans de surveillance générale et devrait fournir des précisions sur la façon dont les lignes de base propres aux diverses régions pédoclimatiques seront établies. Ce plan devrait être fourni pour évaluation avant toute autorisation.

6.2. Plan de surveillance spécifique

Concernant les aspects sanitaires, le CS du HCB s'accorde avec les pétitionnaires sur le fait qu'aucun problème particulier associé au maïs 59122 n'a été identifié et que par conséquent, il n'est pas prévu de surveillance spécifique dans ces domaines.

Concernant les aspects environnementaux, les pétitionnaires n'identifiaient que la possibilité d'apparition de chrysomèles résistantes en raison, par exemple, de l'hétérogénéité des concentrations de toxines selon les racines. Au cours de l'instruction du dossier et en raison de l'interaction des pétitionnaires avec le GMO Panel de l'EFSA et des remarques d'Etats membres, il est demandé aux pétitionnaires de suivre l'apparition des résistances au travers de deux mécanismes de surveillance :

- l'établissement d'une ligne de base de la résistance chez les insectes cibles et le suivi de son évolution par des dosages dose-réponse de doses discriminantes.
- le rapport rapide de dommages inattendus au champ par les agriculteurs : ces rapports pourraient reposer sur les questionnaires de surveillance générale renseignés par les agriculteurs, ce qui aurait pour avantage d'inciter les agriculteurs à changer de stratégie de gestion des insectes.

Concernant les insectes pollinisateurs et les coccinellidées, le CS du HCB constate que 2 ans après la demande de l'EFSA de fournir les données manquantes afin de mener à terme l'évaluation des risques environnementaux, le dossier 59122 ne contient pas ces résultats d'expérimentations. Le CS du HCB examinera ces données une fois qu'elles seront disponibles. Si un risque était identifié, notamment pour les coccinellidées de la tribu des *Stethorini* (consommatrices de tétranyques dans lesquelles les protéines Cry sont connues pour s'accumuler), et que ce risque était considéré comme non rédhibitoire à l'autorisation de la culture, une stratégie de gestion devra être proposée par les pétitionnaires. Le CS du HCB demandera que soit alors mise en place une surveillance spécifique appropriée.

7. Conclusions

Au terme de l'analyse de l'ensemble des données fournies par les pétitionnaires et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique et dans les avis pertinents d'autres agences d'évaluation, le CS du HCB retient les points suivants :

- les produits dérivés des variétés de maïs 59122 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que le maïs conventionnel et ses produits dérivés. Le CS du HCB note toutefois que les lignes directrices de l'EFSA, postérieures au dépôt du dossier, qui exigent une analyse de puissance pour l'évaluation de la toxicité et des tests statistiques d'équivalence pour l'analyse comparative de composition ne sont pas suivies ;

- les risques de transfert de gènes du maïs 59122 aux bactéries du sol sont extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, seraient négligeables pour la santé et l'environnement ;
- l'apparition de populations d'insectes cibles résistantes aux toxines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 au laboratoire et en serre souligne l'importance de la mise en place de plans appropriés de gestion de la résistance des organismes cibles et la nécessité de surveiller l'évolution de cette résistance dans le cas où le maïs 59122 serait autorisé à la culture. Le CS du HCB note que le recours à la culture d'empilages (maïs contenant une combinaison de toxines ciblant le même ravageur) sans avoir mis en culture préalablement un événement simple permettrait de retarder l'apparition de résistance aux toxines Bt chez les organismes cibles ;
- considérant l'impossibilité de conclure à un effet des toxines exprimées par le maïs 59122 sur certaines espèces de coccinelles et l'incertitude associée au manque de données concernant un impact éventuel du maïs 59122 sur les insectes pollinisateurs, le CS du HCB s'accorde avec l'EFSA sur le fait qu'il ne peut conclure sur l'impact du maïs 59122 sur les organismes non-cibles et attend les compléments d'information demandés aux pétitionnaires ;
- en termes de coexistence avec des cultures de maïs non GM, la dissémination de gènes par pollinisation est possible dans certaines conditions et le risque de repousses actuellement faible en Europe continentale pourrait cependant évoluer avec les changements climatiques. Le CS du HCB rappelle, que si la culture était autorisée, des dispositifs et des mesures doivent être mis en place, afin de permettre la coexistence entre les filières GM et non GM, incluant la filière « sans OGM » aux seuils réglementaires définis par le décret N°2012-128 du 30 janvier 2012 ;
- le plan de surveillance proposé mérite d'être actualisé au regard des lignes directrices de l'EFSA les plus récentes. Le CS du HCB demande que la surveillance soit étendue au-delà de la durée d'autorisation.

8. Bibliographie

Alstad, D.N., and Andow, D.A. (1995). Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. Science *268*, 1894–1896.

Andow, D. (2008). The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. Collect. Biosaf. Rev. *4*, 142–19.

Appenzeller, L.M., Malley, L., Mackenzie, S.A., Hoban, D., and Delaney, B. (2009). Subchronic feeding study with genetically modified stacked trait lepidopteran and coleopteran resistant (DAS-Ø15Ø7-1xDAS-59122-7) maize grain in Sprague-Dawley rats. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. *47*, 1512–1520.

Bannert, M., and Stamp, P. (2007). Cross-pollination of maize at long distance. Eur. J. Agron. *27*, 44–51.

Bateman, A. (1947a). Contamination of seed crops. II. Wind pollination. Heredity 1, 235-246.

Bateman, A. (1947b). Contamination of seed crops. I. Insect pollination. Journal of Genetics 48, 257-275.

Beckmann, V., Soregaroli, C., and Wesseler, J. (2006). Coexistence rules and regulations in the European Union. Am J Agric Econ 88, 1193-1199.

Bertheau, Y. (2013). GM and Non-GM supply chain co-existence and traceability : context and

perspectives. In Genetically Modified and Non-Genetically Modified Food Supply Chains: Co-Existence and Traceability. 619–641.

Bitocchi, E., Nanni, L., Rossi, M., Rau, D., Bellucci, E., Giardini, A., Buonamici, A., Vendramin, G.G., and Papa, R. (2009). Introgression from modern hybrid varieties into landrace populations of maize (Zea mays ssp. mays L.) in central Italy. Mol. Ecol. *18*, 603–621.

Brunet, Y., Dupont, S., Delage, S., Garrigou, D., Guyon, D., Dayau, S., Tulet, P., Pinty, J.-P., Lac, C., Escobar, J., et al. (2012). Long-Distance Pollen Flow in Large Fragmented Landscapes. In Genetically Modified and Non-Genetically Modified Food Supply Chains: Co-Existence and Traceability, Y. Bertheau, ed. (Oxford, UK: Wiley-Blackwell), pp. 79–87.

Byrne, P., and Fromherz, S. (2003). Can GM and non-GM crops coexist? Setting a precedent in Boulder County, Colorado, USA. Food, Agriculture & Environment 1, 258-261.

Ciosi, M., Miller, N.J., Kim, K.S., Giordano, R., Estoup, A., and Guillemaud, T. (2008). Invasion of Europe by the western corn rootworm, Diabrotica virgifera virgifera: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. Mol. Ecol. *17*, 3614–3627.

Cullen, E.M., Gray, M.E., Gassmann, A.J., and Hibbard, B.E. (2013). Resistance to Bt Corn by Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) in the U.S. Corn Belt. J. Integr. Pest Manag. *4*, 1–6.

Czarnak-Kłos, M., Cerezo-Rodríguez, E., Institute for Prospective Technological Studies, and European Coexistence Bureau (ECoB) (2010). Best practice documents for coexistence of genetically modified crops with conventional and organic farming. 1. , 1. , (Luxembourg: Publications Office).

Deitloff, J., Dunbar, M.W., Ingber, D.A., Hibbard, B.E., and Gassmann, A.J. (2015). Effects of refuges on the evolution of resistance to transgenic corn by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte: Effects of refuges on pest resistance to *Bt* crops. Pest Manag. Sci. n/a – n/a.

Demanèche, S., Sanguin, H., Poté, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2008). Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 3957–3962.

Devos, Y., Demont, M., Dillen, K., Reheul, D., Kaiser, M., and Sanvido, O. (2009). Coexistence of genetically modified (GM) and non-GM crops in the European Union. A review. Agron. Sustain. Dev. *29*, 11–30.

Devos, Y., De Schrijver, A., De Clercq, P., Kiss, J., and Romeis, J. (2012). Bt-maize event MON 88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organisms. Transgenic Res. *21*, 1191–1214.

Devos, Y., Meihls, L.N., Kiss, J., and Hibbard, B.E. (2013). Resistance evolution to the first generation of genetically modified Diabrotica-active Bt-maize events by western corn rootworm: management and monitoring considerations. Transgenic Res. *22*, 269–299.

Doebley, J., Stec, A., Wendel, J., and Edwards, M. (1990). Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: implications for the origin of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 9888–9892.

Dunbar, M.W., and Gassmann, A.J. (2013). Abundance and distribution of western and northern corn rootworm (Diabrotica spp.) and prevalence of rotation resistance in eastern Iowa. J. Econ. Entomol. *106*, 168–180.

EFSA (2010). Scientific opinion on statistical considerations for the safety evaluation of GMOs, on request of EFSA, question n° EFSA-Q-2006-080. The EFSA Journal 8(1):1250, 59 pp.

EFSA (2011a). EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. EFSA Journal 2011; 9(12).

EFSA (2011b). Scientific opinion on guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. The EFSA Journal 9 (5): 2150, 37 pp.

EFSA (2011c). Scientific Opinion on guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modi fied plants. EFSA Journal 2011;9(8):2316. [4 0 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2316. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.

EFSA (2013a). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) ; Scientific Opinion on an application from Pioneer Hi - Bred International and Dow AgroSciences LLC (EFSA - GMO - NL - 2005 - 23) for placing on the market of genetically modified m aize 59122 for food and feed uses, import, processing and cultivation under Regulation (EC) No 1829/2003. EFSA Journal 20 13 ;11 (3): 3135 . [104 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2013.3135. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajourna.

EFSA (2013b). Statement supplementing the environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on genetically modified insect-resistant maize 59122 for cultivation in the light of new scientific information on non-target organisms and regionally sensitive areas. EFSA Journal 2013;11(11):3443. [13 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2013.3443.

Ellis, R.T., Stockhoff, B.A., Stamp, L., Schnepf, H.E., Schwab, G.E., Knuth, M., Russell, J., Cardineau, G.A., and Narva, K.E. (2002). Novel Bacillus thuringiensis binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, Diabrotica virgifera virgifera LeConte. Appl. Environ. Microbiol. *68*, 1137–1145.

Frank, D.L., Zukoff, A., Barry, J., Higdon, M.L., and Hibbard, B.E. (2013). Development of Resistance to eCry3.1Ab-Expressing Transgenic Maize in a Laboratory-Selected Population of Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. *106*, 2506–2513.

Gabotti, D., Caporali, E., Manzotti, P., Persico, M., Vigani, G., and Consonni, G. (2014). The maize pentatricopeptide repeat gene empty pericarp4 (emp4) is required for proper cellular development in vegetative tissues. Plant Sci. *223*, 25–35.

Gassmann, A.J. (2012). Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm: predictions from the laboratory and effects in the field. J. Invertebr. Pathol. *110*, 287–293.

Gassmann, A.J., and Hutchison, W.D. (2012). Bt crops and insect pests: past successes, future challenges and opportunities. GM Crops Food *3*, 139.

Gassmann, A.J., Petzold-Maxwell, J.L., Keweshan, R.S., and Dunbar, M.W. (2011). Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. PloS One *6*, e22629.

Gassmann, A.J., Petzold-Maxwell, J.L., Keweshan, R.S., and Dunbar, M.W. (2012). Western corn rootworm and Bt maize: challenges of pest resistance in the field. GM Crops Food *3*, 235–244.

Gassmann, A.J., Petzold-Maxwell, J.L., Clifton, E.H., Dunbar, M.W., Hoffmann, A.M., Ingber, D.A., and Keweshan, R.S. (2014). Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple Bacillus thuringiensis toxins in transgenic maize. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 5141–5146.

Gebhard, F., and Smalla, K. (1998). Transformation of Acinetobacter sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 1550–1554.

Génissel, A., Augustin, S., Courtin, C., Pilate, G., Lorme, P., and Bourguet, D. (2003). Initial frequency of alleles conferring resistance to Bacillus thuringiensis poplar in a field population of Chrysomela tremulae. Proc. Biol. Sci. *270*, 791–797.

Goodman, M. (1976). Maize: Zea mays L. In Evolution of crop plants, N.W. Simmonds, ed. (London, Longman), pp. 128-136.

Gray, M. (2011a). Additional reports of severe rootworm damage to Bt corn received: questions and answers. The Bulletin, 22. Available from http://bulletin.ipm.illinois.edu/article.php?id=1569.

Gray, M. (2011b). Corn rootworm damage to Bt corn: should we expect more reports next year? The Bulletin, 24. Available from http://bulletin.ipm.illinois.edu/article.php?id=1584.

Gray, M. Severe root damage to Bt corn observed in northwestern Illinois. The Bulletin, 20. Available from http://bulletin.ipm.illinois.edu/article.php?id=1555. 2011.

Gray, M.E., Sappington, T.W., Miller, N.J., Moeser, J., and Bohn, M.O. (2009). Adaptation and invasiveness of western corn rootworm: intensifying research on a worsening pest. Annu. Rev. Entomol. *54*, 303–321.

Gruber, S. (2008). Post-harvest gene escape and approaches for minimizing it. CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour. *3*.

Gutiérrez-Marcos, J.F., Dal Prà, M., Giulini, A., Costa, L.M., Gavazzi, G., Cordelier, S., Sellam, O., Tatout, C., Paul, W., Perez, P., et al. (2007). Empty pericarp4 encodes a mitochondrion-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for seed development and plant growth in maize. Plant Cell *19*, 196–210.

He, X.Y., Huang, K.L., Li, X., Qin, W., Delaney, B., and Luo, Y.B. (2008). Comparison of grain from corn rootworm resistant transgenic DAS-59122-7 maize with non-transgenic maize grain in a 90-day feeding study in Sprague-Dawley rats. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. *46*, 1994–2002.

Head, G., Carroll, M., Clark, T., Galvan, T., Huckaba, R.M., Price, P., Samuel, L., and Storer, N.P. (2014). Efficacy of SmartStax® insect-protected corn hybrids against corn rootworm: The value of pyramiding the Cry3Bb1 and Cry34/35Ab1 proteins. Crop Prot. *57*, 38–47.

van Heerwaarden, J., Ortega Del Vecchyo, D., Alvarez-Buylla, E.R., and Bellon, M.R. (2012). New Genes in Traditional Seed Systems: Diffusion, Detectability and Persistence of Transgenes in a Maize Metapopulation. PLoS ONE *7*, e46123.

Herman, R.A., Scherer, P.N., Young, D.L., Mihaliak, C.A., Meade, T., Woodsworth, A.T., Stockhoff, B.A., and Narva, K.E. (2002). Binary insecticidal crystal protein from Bacillus thuringiensis, strain PS149B1: effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. J. Econ. Entomol. *95*, 635–639.

Herman, R.A., Storer, N.P., Phillips, A.M., Prochaska, L.M., and Windels, P. (2007). Compositional assessment of event DAS-59122-7 maize using substantial equivalence. Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP *47*, 37–47.

Hibbard, B.E., Meihls, L.N., Ellersieck, M.R., and Onstad, D.W. (2010a). Density-dependent and density-independent mortality of the western corn rootworm: impact on dose calculations of rootworm-resistant Bt corn. J. Econ. Entomol. *103*, 77–84.

Hibbard, B.E., Clark, T.L., Ellersieck, M.R., Meihls, L.N., El Khishen, A.A., Kaster, V., Steiner, H.-Y., and Kurtz, R. (2010b). Mortality of western corn rootworm larvae on MIR604 transgenic maize roots: field survivorship has no significant impact on survivorship of F1 progeny on MIR604. J. Econ. Entomol. *103*, 2187–2196.

Hibbard, B.E., Frank, D.L., Kurtz, R., Boudreau, E., Ellersieck, M.R., and Odhiambo, J.F. (2011). Mortality impact of Bt transgenic maize roots expressing eCry3.1Ab, mCry3A, and eCry3.1Ab plus mCry3A on western corn rootworm larvae in the field. J. Econ. Entomol. *104*, 1584–1591.

Hitchon, A.J., Smith, J.L., French, B.W., and Schaafsma, A.W. (2015). Impact of the Bt Corn Proteins Cry34/35Ab1 and Cry3Bb1, Alone or Pyramided, on Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Beetle Emergence in the Field. J. Econ. Entomol. *108*, 1986–1993.

Hoffmann, A.M., French, B.W., Jaronski, S.T., and Gassmann, A.J. (2014). Effects of entomopathogens on mortality of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) and fitness costs of resistance to Cry3Bb1 maize. J. Econ. Entomol. *107*, 352–360.

Hoffmann, A.M., French, B.W., Hellmich, R.L., Lauter, N., and Gassmann, A.J. (2015). Fitness costs of resistance to Cry3Bb1 maize by western corn rootworm. J. Appl. Entomol. *139*, 403–415.

Hofmann, F., Otto, M., and Wosniok, W. (2014). Maize pollen deposition in relation to distance from the nearest pollen source under common cultivation - results of 10 years of monitoring (2001 to 2010). Environ. Sci. Eur. *26*, 24.

Ingber, D.A., and Gassmann, A.J. (2015). Inheritance and Fitness Costs of Resistance to Cry3Bb1 Corn by Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. tov199.

Jank, B., Rath, J., and Gaugitsch, H. (2006). Co-existence of agricultural production systems. Trends Biotechnol. *24*, 198–200.

Jones, M., and Brooks, J.. (1950). Effectiveness of distance and border rows in preventing outcrossing in corn. Oklahoma Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 38, 18.

Kang, J.K., Krupke, C.H., Murphy, A.F., Spencer, J.L., Gray, M.E., and Onstad, D.W. (2014). Modeling a western corn rootworm, Diabrotica virgifera virgifera (Coleoptera: Chrysomelidae), maturation delay and resistance evolution in Bt corn. Pest Manag. Sci. *70*, 996–1007.

Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002). In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. Appl. Environ. Microbiol. *68*, 3345–3351.

Kelker, M.S., Berry, C., Evans, S.L., Pai, R., McCaskill, D.G., Wang, N.X., Russell, J.C., Baker, M.D., Yang, C., Pflugrath, J.W., et al. (2014). Structural and biophysical characterization of Bacillus thuringiensis insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. PloS One *9*, e112555.

Keweshan, R.S., Head, G.P., and Gassmann, A.J. (2015). Effects of Pyramided Bt Corn and Blended Refuges on Western Corn Rootworm and Northern Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. *108*, 720–729.

Kim, C.-G., Yi, H., Park, S., Yeon, J.E., Kim, D.Y., Kim, D.I., Lee, K.-H., Lee, T.C., Paek, I.S., Yoon, W.K., et al. (2006). Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize around cultivated fields and at a grain receiving port in Korea. J. Plant Biol. *49*, 218–223.

Krauss, A. (2012). Characterization of the Genomic Border Regions and Reading Frame Analysis at the Insertion Site of DAS-59122-7 Maize.

Langhof, M., Hommel, B., Hüsken, A., Njontie, C., Schiemann, J., Wehling, P., Wilhelm, R., and Rühl, G. (2010). Coexistence in Maize: Isolation Distance in Dependence on Conventional Maize Field Depth and Separate Edge Harvest. Crop Sci. *50*, 1496.

Lee, B., Kim, C.-G., Park, J.-Y., Park, K.W., Kim, H.-J., Yi, H., Jeong, S.-C., Yoon, W.K., and Kim, H.M. (2009). Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize in cultivated fields and along the transportation routes of the Incheon Port in South Korea. Food Control *20*, 250–254.

Lefko, S.A., Nowatzki, T.M., Thompson, S.D., Binning, R.R., Pascual, M.A., Peters, M.L., Simbro, E.J., and Stanley, B.H. (2008). Characterizing laboratory colonies of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) selected for survival on maize containing event DAS-59122-7. J. Appl. Entomol. *132*, 189–204.

Levine, E., and Oloumi-Sadeghi, H. (1996). Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Larval Injury to Corn Grown for Seed Production Following Soybeans Grown for Seed Production. J. Econ. Entomol. *89*, 1010–1016.

Levine, E., Spencer, J.L., Isard, S.A., Onstad, D.W., and Gray, M.E. (2002). Adaptation of the Western Corn Rootworm to Crop Rotation: Evolution of a New Strain in Response to a Management Practice. Am. Entomol. *48*, 94–107.

Li, H., Olson, M., Lin, G., Hey, T., Tan, S.Y., and Narva, K.E. (2013). Bacillus thuringiensis Cry34Ab1/Cry35Ab1 interactions with western corn rootworm midgut membrane binding sites. PloS One *8*, e53079.

Masson, L., Schwab, G., Mazza, A., Brousseau, R., Potvin, L., and Schwartz, J.-L. (2004). A novel Bacillus thuringiensis (PS149B1) containing a Cry34Ab1/Cry35Ab1 binary toxin specific for the western corn rootworm Diabrotica virgifera virgifera LeConte forms ion channels in lipid membranes. Biochemistry (Mosc.) *43*, 12349–12357.

Meihls, L.N., Higdon, M.L., Siegfried, B.D., Miller, N.J., Sappington, T.W., Ellersieck, M.R., Spencer, T.A., and Hibbard, B.E. (2008). Increased survival of western corn rootworm on transgenic corn within three generations of on-plant greenhouse selection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 19177–19182.

Meihls, L.N., Higdon, M.L., Ellersieck, M., and Hibbard, B.E. (2011). Selection for resistance to mCry3A-expressing transgenic corn in western corn rootworm. J. Econ. Entomol. *104*, 1045–1054.

Meinke, L., Siegfried, B., Wright, R., and Chandler, L. (1998). Adult susceptibility of Nebraska western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) populations to selected insecticides. Journal of Economic Entomology, 91, 594–600.

Meissle, M., Álvarez-Alfageme, F., Malone, L.., and Romeis, J. (2012). Establishing a database of bioecological information on non-target arthropod species to support the environmental risk assessment of genetically modified crops in the EU. Supporting Publications 2012:EN-334, European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy [170 pp.]. Available from http://www.efsa.europa.eu/en/publications.htm.

Miller, N., Estoup, A., Toepfer, S., Bourguet, D., Lapchin, L., Derridj, S., Kim, K.S., Reynaud, P., Furlan, L., and Guillemaud, T. (2005). Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. Science *310*, 992.

Miller, N.J., Guillemaud, T., Giordano, R., Siegfried, B.D., Gray, M.E., Meinke, L.J., and Sappington, T.W. (2009). Genes, gene flow and adaptation of *Diabrotica virgifera virgifera*. Agric. For. Entomol. *11*, 47–60.

Moellenbeck, D.J., Peters, M.L., Bing, J.W., Rouse, J.R., Higgins, L.S., Sims, L., Nevshemal, T., Marshall, L., Ellis, R.T., Bystrak, P.G., et al. (2001). Insecticidal proteins from Bacillus thuringiensis protect corn from corn rootworms. Nat. Biotechnol. *19*, 668–672.

Nicolas, L., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., and Delécluse, A. (1993). Respective role of the 42- and 51-kDa components of the Bacillus sphaericus toxin overexpressed in Bacillus thuringiensis. FEMS Microbiol. Lett. *106*, 275–280.

Onstad, D.W., and Meinke, L.J. (2010). Modeling evolution of Diabrotica virgifera virgifera (Coleoptera: Chrysomelidae) to transgenic corn with two insecticidal traits. J. Econ. Entomol. *103*, 849–860.

Onstad, D.W., Guse, C.A., Spencer, J.L., Levine, E., and Gray, M.E. (2001). Modeling the dynamics of adaptation to transgenic corn by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. *94*, 529–540.

Oswald, K.J., French, B.W., Nielson, C., and Bagley, M. (2011). Selection for Cry3Bb1 resistance in a genetically diverse population of nondiapausing western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. *104*, 1038–1044.

Oswald, K.J., French, B.W., Nielson, C., and Bagley, M. (2012). Assessment of fitness costs in Cry3Bb1-resistant and susceptible western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) laboratory colonies: Fitness costs and Bt resistance in western corn rootworm. J. Appl. Entomol. *136*, 730–740.

Palaudelmàs, M., Peñas, G., Melé, E., Serra, J., Salvia, J., Pla, M., Nadal, A., and Messeguer, J. (2009). Effect of volunteers on maize gene flow. Transgenic Res. *18*, 583–594.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., and Caballero, P. (2014). Bacillus thuringiensis toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins *6*, 3296–3325.

Pauchet, Y., Luton, F., Castella, C., Charles, J.-F., Romey, G., and Pauron, D. (2005). Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. Cell. Microbiol. *7*, 1335–1344.

Petzold-Maxwell, J.L., Cibils-Stewart, X., French, B.W., and Gassmann, A.J. (2012). Adaptation by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) to Bt maize: inheritance, fitness costs, and feeding preference. J. Econ. Entomol. *105*, 1407–1418.

Petzold-Maxwell, J.L., Meinke, L.J., Gray, M.E., Estes, R.E., and Gassmann, A.J. (2013). Effect of Bt maize and soil insecticides on yield, injury, and rootworm survival: implications for resistance management. J. Econ. Entomol. *106*, 1941–1951.

Pontiroli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T.M., and Monier, J.-M. (2009). Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 3314–3322.

Prasifka, P.L., Rule, D.M., Storer, N.P., Nolting, S.P., and Hendrix, W.H. (2013). Evaluation of Corn Hybrids Expressing Cry34Ab1/Cry35Ab1 and Cry3Bb1 Against the Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. *106*, 823–829.

Quedas, M. de F., and de Carvalho, P.C. (2012). A quinquennium of coexistence in portugal. AgBioForum, 15(1), 1-9.

Raynor, G.S., Ogden, E.C., and Hayes, J.V. (1972). Dispersion and Deposition of Corn Pollen from Experimental Sources1. Agron. J. *64*, 420.

Rizzi, A., Pontiroli, A., Brusetti, L., Borin, S., Sorlini, C., Abruzzese, A., Sacchi, G.A., Vogel, T.M., Simonet, P., Bazzicalupo, M., et al. (2008). Strategy for in situ detection of natural transformation-based horizontal gene transfer events. Appl. Environ. Microbiol. *74*, 1250–1254.

Romeis, J., Bartsch, D., Bigler, F., Candolfi, M.P., Gielkens, M.M.C., Hartley, S.E., Hellmich, R.L., Huesing, J.E., Jepson, P.C., Layton, R., et al. (2008). Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. Nat. Biotechnol. *26*, 203–208.

Rudeen, M.L., and Gassmann, A.J. (2013). Effects of Cry34/35Ab1 corn on the survival and development of western corn rootworm, Diabrotica virgifera virgifera. Pest Manag. Sci. *69*, 709–716.

Sanvido, O., Widmer, F., Winzeler, M., Streit, B., Szerencsits, E., and Bigler, F. (2008). Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. Transgenic Res. *17*, 317–335.

Schnepf, H.E., Lee, S., Dojillo, J., Burmeister, P., Fencil, K., Morera, L., Nygaard, L., Narva, K.E., and Wolt, J.D. (2005). Characterization of Cry34/Cry35 binary insecticidal proteins from diverse Bacillus thuringiensis strain collections. Appl. Environ. Microbiol. *71*, 1765–1774.

Schwartz, J.L., Potvin, L., Coux, F., Charles, J.F., Berry, C., Humphreys, M.J., Jones, A.F., Bernhart, I., Dalla Serra, M., and Menestrina, G. (2001). Permeabilization of model lipid membranes by Bacillus sphaericus mosquitocidal binary toxin and its individual components. J. Membr. Biol. *184*,

171–183.

Siegfried, B.D., and Hellmich, R.L. (2012). Understanding successful resistance management: the European corn borer and Bt corn in the United States. GM Crops Food *3*, 184–193.

Siegfried, B., Meinke, L., and Scharf, M. (1998). Resistance management concerns for areawide management programs. Journal of Agricultural Entomology, 15, 359–369.

Siegfried, B.D., Meinke, L.J., Parimi, S., Scharf, M.E., Nowatzki, T.J., Zhou, X., and Chandler, L.D. (2004). Monitoring western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) susceptibility to carbaryl and cucurbitacin baits in the areawide management pilot program. J. Econ. Entomol. *97*, 1726–1733.

Storer, N.P. (2003). A spatially explicit model simulating western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) adaptation to insect-resistant maize. J. Econ. Entomol. *96*, 1530–1547.

Storer, N.P., Babcock, J.M., and Edwards, J.M. (2006). Field measures of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) mortality caused by Cry34/35Ab1 proteins expressed in maize event 59122 and implications for trait durability. J. Econ. Entomol. *99*, 1381–1387.

Tabashnik, B.E., and Gould, F. (2012). Delaying corn rootworm resistance to Bt corn. J. Econ. Entomol. *105*, 767–776.

Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J., and Carrière, Y. (2009). Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. J. Econ. Entomol. *102*, 2011–2025.

Tabashnik, B.E., Brévault, T., and Carrière, Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. Nat. Biotechnol. *31*, 510–521.

Thompson, S.. (2014). Characterization of inheritance of resistance to maize containing event DAS-59122-7 in laboratory selected colonies of western corn rootworm using the sub-lethal seedling assay . Graduate Theses and Dissertations. Paper 14043. http://lib.dr.iastate.edu/etd/14043.

Tinsley, N.A., Estes, R.E., Schrader, P.M., and Gray, M.E. (2015). Evaluating multiple approaches for managing western corn rootworm larvae with seed blends. J. Appl. Entomol. *139*, 76–86.

Treu, R., and Emberlin, J. (2000). Pollen dispersal in the crops maize (Zea mays), oilseed rape (Brassica napus ssp. oleifera), potatoes (Solanum tuberosum), sugar beet (Beta vulgaris ssp. vulgaris) and wheat (Triticum aestivum). Evidence from publications. In A report for the Soil Association from the National Pollen Research Unit (Worcester, University College Worcester), pp. 54.

US EPA (2011a). Updated BPPD IRM review of reports of unexpected Cry3Bb1 damage, Monsanto‘s 2009 corn rootworm monitoring report, and revised corn rootworm resistance monitoring plan for MON 88017, MON 88017 x MON 810, MON 863, MON 863 x MON 810, MON 89034 x TC1507 x MON 88017 x DAS-59122–7, and MON 89034 x MON 88017 (EPA Reg. Nos. 524–551, 524–552, 524–528, 524–545, and 68467–7); MRIDs 478846–01 and 478875–03.

US EPA (2011b). Biopesticides registration action document: MON 89034 x TC1507 x MON 88017 x DAS-59122–7 (SmartStax®) B.t. corn seed blend. Available from http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/smartstax-seedblend.pdf.

Vaissière, B.E., and Vinson, S.B. (1994). Pollen morphology and its effect on pollenl collection by honey bees, *Apis Mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), with special Reference to Upland Cotton, *Gossypium Hirsutum* L. (Malvaceae). Grana *33*, 128–138.

Van de Wiel, C.C.M., van den Brink, L., Bus, C.B., Riemens, M.M., Lotz, L.A.., and Smulders, M.J.. (2011). Crop volunteers and climate change. Effects of future climate change on the occurrence of maize, sugar beet and potato volunteers in the Netherlands (COGEM), pp. 52.

Waminal, N.E., Ryu, K.H., Choi, S.-H., and Kim, H.H. (2013). Randomly Detected Genetically Modified (GM) Maize (Zea mays L.) near a Transport Route Revealed a Fragile 45S rDNA Phenotype. PLoS ONE *8*, e74060.

Wangila, D.S., Gassmann, A.J., Petzold-Maxwell, J.L., French, B.W., and Meinke, L.J. (2015). Susceptibility of Nebraska Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Populations to Bt Corn Events. J. Econ. Entomol. *108*, 742–751.

Wright, R.J., Scharf, M.E., Meinke, L.J., Zhou, X., Siegfried, B.D., and Chandler, L.D. (2000). Larval susceptibility of an insecticide-resistant western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) population to soil insecticides: laboratory bioassays, assays of detoxification enzymes, and field performance. J. Econ. Entomol. *93*, 7–13.

Annexe 1 : Saisine

Courrier reçu le
17 JUIL. 2015

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

Direction générale de l'alimentation

Service des actions sanitaires en production primaire

Sous direction de la qualité et de la protection des végétaux

Bureau de la biovigilance, des biotechnologies et de la qualité des végétaux

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Madame Christine NOIVILLE
Présidente du Haut conseil des biotechnologies
à l'attention de Madame Joëlle BUSUTTIL
244, boulevard Saint-Germain
75007 PARIS

Paris, le 15 JUIL. 2015

Objet : saisine du Haut conseil des biotechnologies sur un dossier de demande de mise sur le marché d'OGM

Références : saisine HCB - dossier NL-2005-23

Affaire suivie par : Anne Grevet
tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49
courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

PJ : 1 dossier

Madame la Présidente,

Dans le cadre du règlement (CE) n°1829/2003 relatif aux denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est confiée à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA). Pendant cette période d'évaluation, l'AESA consulte les États membres sur les dossiers. Lorsque l'AESA a rendu un avis, la Commission européenne propose au vote des États membres un projet de décision.

Le dossier suivant est susceptible de faire prochainement l'objet d'un nouvel avis de l'AESA en complément de l'avis adopté le 6 mars 2013, qui sera suivi d'un vote des États membres sur un projet de décision :

- dossier **EFSA-GMO-NL-2005-23**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **59122** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Dans la perspective d'un vote des États membres sur ce dossier, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ce dossier afin de rendre un avis au plus tard **le 30 novembre 2015.**

Je vous prie de croire, Madame la Présidente, à l'assurance de ma considération distinguée.

Le sous-directeur de la qualité
et de la protection des végétaux

Alain TRIDON

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

Cet avis a été élaboré par le CS du HCB à partir de la discussion de rapports d'expertise en séance du 24 septembre 2015[18] sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès et la vice-présidence du Dr Pascal Boireau et du Dr Claudine Franche.

Le CS du HCB est un comité pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques nommées par décret au titre de leur spécialité en relation avec les missions du HCB. Par ordre alphabétique des noms de famille, le CS du HCB est composé de :

Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Florence Bellivier, Philippe Berny, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, François-Christophe Coléno, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Nathalie Eychenne, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Cédric Moreau de Bellaing, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte[19].

Le dossier a été examiné par neuf experts rapporteurs sélectionnés pour leurs compétences dans les disciplines requises pour l'analyse du dossier : huit membres du CS du HCB et un expert externe, Denis Bourguet, Directeur de recherche à l'INRA.

Les membres du CS du HCB remplissent annuellement une déclaration publique d'intérêts. Ils sont également interrogés sur l'existence d'éventuels conflits d'intérêts avant l'examen de chaque dossier. Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec l'élaboration de cet avis.

L'expert externe a rempli une déclaration publique d'intérêts et a certifié n'avoir aucun conflit d'intérêts avec le dossier concerné. Il a fourni une analyse du dossier dans son domaine d'expertise. Il n'a toutefois pas contribué directement à la rédaction de cet avis, qui reste de la responsabilité du CS du HCB.

[18] Membres du CS présents et représentés lors de la discussion du projet d'avis en séance du 24 septembre 2015 : Claude Bagnis, Avner Bar-Hen (pour une partie de l'examen), Marie-Anne Barny, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Denis Couvet, Elie Dassa, Hubert De Verneuil, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer, Jean-Christophe Pagès, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

[19] Composition du CS en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014.