

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 21 octobre 2011

COMMENTAIRES

sur le rapport de surveillance de culture du MON 810 en 2010

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été sollicité en septembre 2011 par les Autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire) pour examiner le rapport de surveillance de la société Monsanto relatif à la culture du MON 810 en 2010.

Ce rapport a été réalisé par Monsanto pour la Commission européenne suite à l'autorisation de culture du maïs MON 810 en 1998, obtenue dans le cadre de la Directive 90/220/CEE, abrogée aujourd'hui par la Directive 2001/18/CE. La Commission européenne a demandé aux Etats membres de leur faire parvenir leurs commentaires sur ce document pour examen ultérieur par l'Autorité européenne de sécurité des aliments.

Le Comité scientifique (CS)¹ du HCB a procédé à l'examen du rapport le 4 octobre 2011 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès.

¹ La composition du CS est indiquée en annexe.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCTION | 4 |
| 2. COMMENTAIRES | 5 |
| 2.1 SURVEILLANCE GENERALE | 6 |
| 2.2 SURVEILLANCE ET GESTION DE LA RESISTANCE AUX INSECTES..... | 7 |
| 3. CONCLUSIONS | 9 |
| 4. BIBLIOGRAPHIE | 9 |
| ANNEXE 1 – ELABORATION DES COMMENTAIRES | 10 |
| ANNEXE 2 – TRADUCTION EN ANGLAIS..... | 11 |

1. Introduction

Le maïs génétiquement modifié MON 810 exprime la toxine Cry1Ab de la bactérie *Bacillus thuringiensis*, qui lui confère une résistance à des insectes lépidoptères ravageurs, notamment la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) et la sésamie (*Sesamia nonagrioides*).

La mise sur le marché du maïs MON 810², à des fins d'importation et de toute utilisation incluant la culture, est autorisée dans les Etats membres de l'Union européenne depuis le 3 août 1998, date à laquelle la France – en sa qualité de rapporteur du dossier pour la Commission – a ratifié la Décision 98/294/CE du 22 avril 1998³ prise dans le cadre de la Directive 90/220/CEE⁴. En 2004, conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003⁵, la société Monsanto a notifié les différents produits du maïs MON 810 mis sur le marché pour l'alimentation humaine et animale et pour la culture comme « produits existants »⁶.

En conformité avec les exigences réglementaires, la société Monsanto a déposé plusieurs dossiers de renouvellement d'autorisation de mise sur le marché couvrant tous les usages existants du maïs MON 810, incluant la culture, dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003 en avril 2007, avant qu'une période de neuf ans ne se soit écoulée après l'autorisation initiale de la Décision 98/294/CE. Ces dossiers de renouvellement sont toujours en cours de traitement par la Commission européenne, ce qui résulte en une prolongation automatique de l'autorisation de culture du maïs MON 810 selon les termes de l'autorisation initiale du 22 avril 1998, assortie des exigences en termes de détection, étiquetage et traçabilité requises pour tout produit existant dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003.

La Directive 90/220/CEE n'exigeant pas de plan de surveillance post-commercialisation, et la Décision 98/294/CE d'autorisation initiale de mise sur le marché du MON 810 n'exigeant pas de rapport de surveillance de culture à la société Monsanto, il ressort qu'aucun rapport de cette nature n'est formellement exigé concernant la culture du MON 810 en Europe. La société Monsanto s'était toutefois engagée, dans son dossier initial de demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs MON 810, à informer la Commission et/ou les Autorités compétentes des Etats membres des résultats de la surveillance du développement de résistance contre la toxine Cry1Ab, exprimée par le MON 810, chez les insectes ciblés par cette protéine.

En pratique, la société Monsanto produit annuellement, depuis 2005, des rapports de surveillance de culture du MON 810, incluant non seulement les résultats de surveillance du développement de résistance chez les insectes, mais aussi, sur une base volontaire, les résultats d'une surveillance générale. Par anticipation à l'obtention d'une nouvelle autorisation de culture dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003, cette surveillance générale est

² L'autorisation de mise sur le marché décrite dans la Décision 98/294/CE couvre toute lignée pure et tout hybride dérivé de la lignée de maïs MON 810 originale ainsi que toute la descendance issue de croisements avec une variété quelconque de maïs obtenue de façon traditionnelle. Par extrapolation, l'expression « maïs MON810 » désigne ici l'ensemble de ces produits.

³ Décision 98/294/CE de la Commission du 22 avril 1998 sur la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié (*Zea mays* L. line MON 810) dans le cadre de la Directive 90/220/CEE du Conseil. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:131:0032:0033:FR:PDF>

⁴ Directive 90/220/CEE du Conseil, du 23 avril 1990, relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement. Cette directive a été abrogée par la Directive 2001/18/CE. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990L0220:FR:HTML>

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 pour animaux, ces denrées alimentaires ou aliments pouvant consister en des OGM, contenir des OGM, ou être issus d'OGM.) : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML>

⁶ Tout produit relevant du champ d'application du Règlement (CE) n° 1829/2003 et mis sur le marché en vertu de la Directive 90/220/CEE ou de la Directive 2001/18/CE avant la date d'application de ce règlement peut continuer à être mis sur le marché si l'exploitant responsable de la mise sur le marché du produit concerné notifie à la Commission la date de la première mise sur le marché de ce produit dans la Communauté, dans les 6 mois qui suivent la date d'application du Règlement (CE) n° 1829/2003 (Articles 8 et 20 du Règlement (CE) n° 1829/2003 sur le statut des produits existants).

réalisée conformément à ce règlement, selon les règles définies dans la Directive 2001/18/CE⁷ et les formulaires établis dans la Décision 2009/770/CE⁸.

La Commission européenne a saisi l'AESA⁹ d'une demande d'évaluation du dernier rapport de surveillance du MON 810 concernant la culture de l'année 2010 en Europe. Elle a également invité les Etats membres à envoyer leurs commentaires sur le rapport pour examen complémentaire par l'AESA. Dans ce contexte, les Autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire) ont sollicité le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) en septembre 2011 pour une analyse de ce rapport.

Le Comité scientifique (CS) du HCB, qui avait déjà analysé le rapport de surveillance de la culture du maïs MON 810 en Europe en 2009, a examiné le rapport concernant la culture du MON 810 en 2010 avec un souci particulier de continuité dans son analyse des résultats rapportés par la société Monsanto. Par souci de concision et d'efficacité, les commentaires du CS du HCB se concentrent sur les points du rapport de surveillance identifiés comme critiquables.

2. Commentaires

En 2010, la culture du maïs MON 810 en Europe a couvert environ 91 190 ha (contre ~94 850 ha en 2009) répartis dans six pays – principalement en Espagne (84 %), mais également au Portugal (5,3 %), en République Tchèque (5,1 %), en Pologne (3,3 %), en Slovaquie(1,4 %), et en Roumanie (0,9 %).

La société Monsanto a réalisé une surveillance de deux types :

- une surveillance générale, dont l'objectif est de détecter d'éventuels effets négatifs inattendus du maïs MON 810 sur l'environnement ou la santé. Cette surveillance a été réalisée par le biais d'enquêtes menées auprès de producteurs de maïs MON 810, par une analyse de la littérature scientifique publiée pendant la même période, et lors de mesures d'accompagnement réalisées par la société Monsanto elle-même.
- une surveillance spécifique, dédiée au suivi de l'évolution de la sensibilité des populations de pyrales et de sésamies à la toxine Cry1Ab produite par le maïs MON 810, dans un contexte de gestion stratégique visant à prévenir/retarder le développement de résistance à la toxine chez ces insectes cibles.

Les données et les analyses contenues dans ce rapport de surveillance ne font apparaître aucun problème majeur associé à la culture du maïs MON 810 en 2010. Le CS du HCB relève toutefois certaines faiblesses dans les méthodologies expérimentales, l'échantillonnage et les analyses statistiques. En conséquence, il souligne que les conclusions que l'on peut tirer des études présentées sont plus limitées que ne l'indique le rapport, notamment sur le possible développement de résistance chez les insectes cibles.

⁷ Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0018:FR:HTML>

⁸ Décision 2009/770/CE de la Commission du 13 octobre 2009 établissant des formulaires types pour la présentation des résultats de la surveillance relative à la dissémination volontaire dans l'environnement d'organismes génétiquement modifiés, en tant que produits ou éléments de produits, aux fins de leur mise sur le marché, conformément à la directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:275:0009:0027:FR:PDF>

⁹ AESA : Autorité européenne de sécurité des aliments, ou EFSA : *European Food Safety Authority*.

2.1 Surveillance générale

- Analyse des réponses des agriculteurs au questionnaire de surveillance

Un questionnaire de surveillance a été conçu pour faciliter le rapport et l'évaluation d'observations inattendues par les agriculteurs dans les régions où le MON 810 est cultivé. L'analyse des réponses des agriculteurs à ce questionnaire pose un certain nombre de problèmes relevés par le CS.

Comme l'année précédente, le CS regrette une absence d'information sur la représentativité de l'échantillonnage des agriculteurs questionnés (pratiques agricoles, topographies, cultures ou non précédemment de MON 810 ou Bt176, etc.)¹⁰.

De plus, le CS remarque à nouveau que, nonobstant les problèmes éventuels d'échantillonnage, les conclusions tirées de l'analyse statistique des résultats des questionnaires vont au-delà de ce que l'analyse permet strictement de conclure. En effet, la société Monsanto conclut (Rapport principal, p. 13) :

"The analysis of 271 questionnaires from the survey of farmers cultivating MON 810 in six European countries during the 2010 growing season did not reveal any unexpected adverse effects that could be associated with the genetic modification in MON 810."

Or, dans l'Annexe 1, qui détaille l'analyse statistique des questionnaires, il est expliqué que pour chaque aspect examiné, les effets observés en lien avec la culture du maïs MON 810 ne sont considérés par la société Monsanto que s'ils sont rapportés par plus de 10 % des agriculteurs questionnés. Autrement dit, si moins de 10 % des agriculteurs rapportent un effet négatif (adverse effect) particulier, cet effet ne sera pas pris en compte dans les résultats du questionnaire, et ce quelle que soit la taille de l'effet observé.

Le CS du HCB fait plusieurs remarques à ce sujet :

1. Si l'enquête permet de conclure que moins de 10 % des agriculteurs ont noté des effets négatifs (autres que ceux visés par la modification génétique) liés à la culture MON 810, il est abusif d'en déduire qu'aucun effet négatif n'a été observé.
2. Si la société Monsanto s'en tenait à la conclusion autorisée par l'analyse statistique des résultats du questionnaire, c'est-à-dire que pour chaque point abordé, moins de 10 % des agriculteurs auraient noté des effets négatifs liés à la culture MON 810, quel en serait le sens ? Quel sens accorder à un seuil de 10 % ? Quelle est la pertinence du calcul des degrés de signification (*p-values*) ? Il aurait été plus pertinent de calculer des intervalles de confiance pour ces proportions d'agriculteurs qui ont observé des effets inhabituels, au lieu de les situer par rapport à un seuil.
3. Enfin, comment justifier un traitement uniforme de questions aussi variées que la vigueur de germination ou la sensibilité des plantes aux maladies, que l'occurrence d'oiseaux ou d'insectes dans les champs, ou que les pratiques agricoles d'irrigation ou d'utilisation d'insecticides ? Certains paramètres, comme un usage accru d'insecticides, devraient être considérés comme problématiques à des seuils de réponses beaucoup plus faibles que d'autres paramètres du fait du caractère de résistance aux insectes du maïs MON 810.

- Analyse bibliographique

Le CS du HCB est en accord avec la société Monsanto sur son analyse des données de plus de 40 publications relatives au MON 810 parues depuis le dernier rapport de surveillance (de juin 2010 à début juin 2011). La société Monsanto conclut (Rapport principal, p. 17) :

"The peer-reviewed literature demonstrates that MON 810 is as safe to human and animal health as its conventional counterpart and confirms that there is negligible impact from the cultivation of MON 810 on biodiversity, abundance, or survival of non-target species, and

¹⁰ Le CS du HCB rappelle dans chacun de ses avis sur les plantes génétiquement modifiées l'importance des plans de surveillance spécifique et générale, avec la demande récurrente de leur centralisation au travers d'une plate-forme commune avec SIG (système d'information géographique), répertoriant en particulier les cultures successives d'OGM.

the environmental risk of MON 810 is considered to be negligible compared to conventional maize."

Cette conclusion reflète correctement la teneur des articles répertoriés. Toutefois, si le CS du HCB reconnaît qu'aucune preuve formelle d'effets négatifs associés au MON 810 n'a pu être établie à ce jour, il rappelle que l'absence de preuve d'effets négatifs ne permet pas de conclure à une absence d'effets négatifs.

- Mesures mises en œuvre par la société Monsanto

Parmi les mesures d'accompagnement diligentées par la société Monsanto, le CS du HCB note qu'elle met en place un système d'alerte environnementale via des réseaux de surveillance existants. Dans cet objectif, une liste de réseaux existants a été établie en Allemagne. Ce dispositif n'a toutefois pas été utilisé en 2010 car le MON 810 n'a pas été cultivé en Allemagne durant cette période. Basé sur cet exemple allemand, un groupe de travail de l'association Europabio coordonne un effort plus général pour identifier ces réseaux de surveillance de l'environnement existants en Europe, et mettre en place un système de collecte centralisé des données de surveillance pour le futur.

Si le CS du HCB salue cette initiative, conforme aux dernières recommandations de l'AESA (EFSA, 2011) et à ses propres demandes récurrentes en termes de centralisation des données de surveillance, il regrette que cela soit fait si tardivement, après plus de 10 ans de culture de maïs MON 810 en Europe.

2.2 Surveillance et gestion de la résistance aux insectes

Le CS du HCB précise que le risque de développement de résistance chez les insectes cibles n'est pas un risque pour l'environnement, car cette résistance n'engendrerait *a priori* aucun impact sur l'agroécosystème. La perte d'efficacité de la toxine Cry1Ab pose toutefois le problème de la perte d'une stratégie utile à l'ensemble de la communauté agricole pour lutter contre la pyrale du maïs et la sésamie. Il est donc important de prendre des mesures pour minimiser ce risque, d'en contrôler la mise en œuvre, et d'en suivre l'efficacité par un suivi de sensibilité des insectes.

- Zones refuges

La société Monsanto présente les résultats d'une enquête réalisée auprès de 100 agriculteurs ayant cultivé du MON 810 en Espagne, dans la Vallée de l'Ebre : 100 % se déclarent bien informés des recommandations de la société Monsanto relatives à l'implémentation de zones refuges (plantées avec du maïs n'exprimant pas de Cry1Ab), et 88 % déclarent implémenter ces mesures. Ce taux déclaré d'adoption, qui témoigne d'une sensibilisation positive des agriculteurs, devrait permettre une lutte efficace contre l'apparition de résistance dans les populations d'insectes cibles. Toutefois, comme pour le rapport de 2009, le CS regrette que la société Monsanto transpose les résultats de cette enquête en réalité sur le terrain.

p. 19 : "*The survey also revealed a high level of compliance with refuge requirements indicating that 88 of the 100 farmers that were included in the final survey planted a conventional maize refuge on their farm.*"

La société Monsanto n'envisage pas un possible décalage entre les réponses des sondés et la réalité et/ou l'efficacité de leurs pratiques. Sur ce dernier point, l'équipe de David A. Andow a en effet mis en évidence que l'architecture ou la configuration des zones refuges avait une influence sur leur efficacité, et que certains cultivateurs, de bonne foi, mettaient en place des bandes refuges trop étroites pour être fonctionnelles (Andow et al., 2010).

Par ailleurs, il est intéressant de considérer que parmi les raisons invoquées pour ne pas avoir planté de zones refuges, un peu plus de la moitié des agriculteurs (*i.e.* 7 % du total) indiquent que la taille de leur exploitation était inférieure à 5 ha ; d'autres raisons invoquées concernent des pertes économiques ou des inconvénients d'ordre pratique.

Le CS du HCB fait deux remarques à ce sujet :

- 1) Les agriculteurs cultivant du MON 810 en Europe ne sont pas tenus d'implémenter des mesures de zones refuges. L'implémentation de ces zones est une simple

recommandation de la société Monsanto pour les exploitants agricoles. Le CS du HCB propose que la Commission impose le respect des zones refuges par les agriculteurs cultivant du MON 810 ou toute autre culture exprimant une toxine Bt¹¹, par l'intermédiaire d'une mention explicite dans la décision d'autorisation de cette culture.

- 2) Le plan de gestion de résistance chez les insectes cibles devrait être adapté aux conditions européennes, où les exploitations agricoles sont plus morcelées que sur le continent américain. Ainsi, les recommandations de mise en place de 20 % de zones refuges par surfaces cultivées de maïs Bt de plus de 5 ha devraient soit être étendues à des surfaces inférieures à 5 ha, soit être considérées au niveau du territoire et non au niveau d'exploitations individuelles et faire l'objet d'une concertation entre agriculteurs de la zone considérée.

- Suivi de sensibilité des insectes

L'étude de l'évolution de la sensibilité des populations d'*O. nubilalis* et de *S. nonagrioides* à la toxine Cry1Ab constitue un point faible de l'étude et du rapport de Monsanto. En effet, comme en 2009, la société Monsanto a fait le choix de suivre cette sensibilité en comparant des courbes de sensibilité des populations de ces deux ravageurs. Les conclusions de cette étude sont (Rapport principal p. 21) :

- *“the analyses of historical series of susceptibility data of S. nonagrioides to Cry1Ab did not reveal signs of development of resistance to this toxin by field populations from the sampling areas considered (see Appendix 7).”*
- *“the observed population variation in susceptibility reflects natural variation in Bt susceptibility among O. nubilalis populations. Any evidence for a decrease of Cry1Ab susceptibility of populations during the monitoring duration from 2005–2010 could not be detected.”*

Si ces conclusions sont formellement justes, la méthodologie du suivi de sensibilité et le choix des populations analysées en 2010 posent problème au CS du HCB, pour les raisons suivantes :

- 1) Plusieurs publications [ex : (Andow and Ives, 2002)] ont souligné que la comparaison de courbes de sensibilité n'est pas la méthode la plus sensible pour suivre l'évolution de résistance, notamment lorsque celle-ci est récessive (ce qui est le cas de la plupart des résistances aux toxines Bt). Il est pratiquement impossible de détecter, *via* des courbes de sensibilité, une évolution de la résistance avant que les gènes conférant cette résistance n'atteignent des fréquences alléliques de plusieurs pourcents.
- 2) Le nombre et la taille des échantillons de sésamies prélevés en populations naturelles sont faibles. Par exemple, dans la région du sud-ouest de la Péninsule Ibérique, la sensibilité à la toxine Cry1Ab a été mesurée sur la descendance d'adultes issus d'un mélange de 41 larves d'un champ espagnol et de 123 larves d'un champ portugais. Ni le nombre d'adultes issus du développement de ces larves, ni le nombre d'adultes ayant effectivement participé à la fécondation à l'origine de cette descendance ne sont indiqués dans le rapport. Il est toutefois indiqué que le nombre de larves issus de la descendance de cet échantillon était insuffisant pour réaliser les tests de sensibilité à la toxine Cry1Ab, et qu'il a donc fallu attendre la génération suivante (F2) pour disposer de suffisamment de larves pour pouvoir réaliser la mesure de cette sensibilité, avec à nouveau toutes les incertitudes liées sur le nombre d'adultes ayant effectivement participé à la fécondation à l'origine de la génération F2. Ainsi, à l'issue de cette procédure de multiplication des larves sur deux générations, même si le nombre de larves final était suffisant pour réaliser les tests de sensibilité, il est clair que le nombre d'adultes (nombre de génomes) de l'échantillon initial duquel ces larves sont effectivement issues est relativement limité. L'estimation de la sensibilité pour l'ensemble de la région du sud-ouest de la Péninsule Ibérique a donc été réalisée à partir d'un échantillon de gènes relativement réduit, provenant peut-être d'une à quelques dizaines d'individus, collectés dans deux champs de la région.

¹¹ Toxine insecticide dérivée d'une bactérie *Bacillus thuringiensis*

- 3) Dans le rapport de surveillance de la culture du MON 810 en 2009, l'échantillon de *S. nonagrioides* issu du site situé au nord-est de la Péninsule Ibérique (vallée de l'Ebre), présentait des augmentations significatives (pour les LC¹²) ou marginalement significatives (pour les MIC¹³) par rapport à la souche témoin sensible depuis 2006. Ce résultat était difficile à interpréter, mais pouvait être la conséquence d'un début de résistance dans cette région. Le CS du HCB avait conclu, dans ses commentaires sur ce rapport de 2009, qu'il était possible que ces résultats traduisent « la montée en fréquence, dans cette population, d'un gène de résistance. A défaut de pouvoir trancher avec certitude entre une perte de sensibilité liée à un début de résistance et une variation naturelle sans lien avec la résistance, [le CS du HCB avait recommandé que] cette population [fasse] l'objet d'une surveillance rapprochée. ». Or, en 2010, aucun échantillon de cette région n'a été testé. Aucune indication quant aux raisons de l'absence d'échantillon de cette région n'est donnée dans le rapport. Il est donc impossible de vérifier les hypothèses de développement de résistance des sésamies à Cry1Ab dans cette région.
- 4) Enfin, le CS du HCB relève que les mesures des LC sur les échantillons de *S. nonagrioides* ont été abandonnées (mais conservées pour la pyrale) car jugées moins pertinentes que les MIC pour suivre l'évolution de la résistance. En conséquence, il n'est plus possible de suivre les variations de sensibilité des populations de sésamies qui avaient été analysées les années passées avec la méthodologie des LC.

Par conséquent, le CS du HCB considère que l'absence de variations significatives des courbes de sensibilité à la toxine Cry1Ab depuis 2005 soulignée par la société Monsanto ne permet pas de conclure sur l'évolution de la résistance dans les populations des deux ravageurs ciblés par cette toxine.

3. Conclusions

En conclusion générale, les données recueillies par Monsanto dans ce rapport ne font apparaître aucun problème majeur lié à la culture du maïs MON 810 en 2010 en Europe. Toutefois, le CS du HCB souligne que les méthodologies expérimentales et statistiques pourraient être améliorées pour faciliter la détection de problèmes éventuels liés à la culture du maïs MON 810, notamment le développement de résistance chez les insectes ciblés par la toxine Cry1Ab. Par ailleurs, le CS du HCB incite à une meilleure maîtrise du risque de développement de résistance chez les insectes cibles par une implémentation plus efficace des zones refuges, même s'il considère que ce risque ne constitue pas un risque pour l'environnement mais un risque de perte d'une stratégie de lutte contre des insectes ravageurs.

4. Bibliographie

- Andow, D.A., Farrell, S.L., and Hu, Y. (2010). Planting patterns of in-field refuges observed for Bt maize in Minnesota. *J Econ Entomol* 103, 1394-1399.
- Andow, D.A., and Ives, A.R. (2002). Monitoring and adaptive resistance management. *Ecol Appl* 12, 1378-1390.
- EFSA (2011). Scientific Opinion on guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. *The EFSA Journal* 9 (8): 2316, 40 pp.

¹² LC : *lethal concentrations*, concentrations conduisant à la mort. Ex : LC₅₀ et LC₉₀, concentrations conduisant à la mort de 50 % et 90 % de larves.

¹³ MIC : *molting inhibition concentrations*, concentrations conduisant à l'inhibition de la mue. Ex : MIC₅₀ et MIC₉₀, concentrations conduisant à l'inhibition de la mue de 50 % et 90 % de larves.

Annexe 1 – Elaboration des commentaires

Ces commentaires ont été élaborés par le CS du HCB, composé de :

Jean-Christophe Pagès, Président, Jean-Jacques Leguay, Vice-Président,

et par ordre alphabétique des noms de famille : Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, Florence Coignard, François-Christophe Coléno, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperchmitt, Nicolas Ferry, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Yvon Le Maho, Stéphane Lemarié, Didier Lereclus, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Bertrand Ney, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Virginie Tournay, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

Etant impliqué dans l'analyse du même document au niveau de l'AESA, Antoine Messéan n'a contribué ni à l'élaboration ni à la rédaction de ces commentaires.

Aucun des autres membres du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec son examen du rapport.

Annexe 2 – Traduction en anglais

1. Introduction

Genetically modified MON 810 maize produces the bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin Cry1Ab, which confers resistance to the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) and the pink stem borer (*Sesamia nonagrioides*).

MON 810 maize¹⁴ was authorised for import and use (including cultivation) in the European Union on 3 August 1998, when France, as *rapporteur*, ratified the Commission Decision 98/294/EC of 22 April 1998¹⁵ pursuant to Council Directive 90/220/EEC¹⁶. In 2004, the Monsanto Company, referred to afterwards as Monsanto, notified the different MON 810 maize products placed on the market for food, feed and cultivation, as existing products under Regulation (EC) n° 1829/2003¹⁷.

In compliance with Regulation (EC) n° 1829/2003, Monsanto submitted applications to the European Commission for renewal of authorisation of all MON 810 maize existing products in April 2007, within a nine-year period since the initial marketing authorisation. These renewal applications are still under treatment by the European Commission. Meanwhile, the authorised products remain lawfully on the market on the basis of the initial Decision of 22 April 1998, with the additional requirements in terms of detection, labelling and traceability for all existing products in the legal framework of Regulation (EC) n° 1829/2003.

Given that Directive 90/220/EEC requires no post-market monitoring plan, and that Decision 98/294/EC for placing on the market of MON 810 maize products requires no cultivation monitoring report by Monsanto, no monitoring and no report of this kind are formally required for MON 810 cultivation in Europe. Monsanto had nevertheless offered, in its initial application for marketing MON 810 maize, to inform the Commission and/or the Competent Authorities of Member States of monitoring results regarding the development of insect resistance to the Cry1Ab toxin expressed by MON 810 maize.

In practical terms, Monsanto has submitted annual monitoring reports on MON 810 cultivation to the Commission since 2005. These reports comprised the results of insect resistance monitoring along with, on a voluntary basis, the results of general surveillance. In anticipation of an authorisation renewal under Regulation (EC) n° 1829/2003, this general surveillance followed the mandatory requirements for post-market environmental monitoring of this regulation, in accordance with Directive 2001/18/EC¹⁸ and the forms established in Decision 2009/770/EC¹⁹.

¹⁴ The consent described in Commission Decision 98/294/EC covers inbred lines and hybrids derived from maize line MON 810, as well as any progeny derived from crosses of the product with any traditionally bred maize. The expression "MON 810 maize" in this document stands for all of these products.

¹⁵ Commission Decision 98/294/EC of 22 April 1998 concerning the placing on the market of genetically modified maize (*Zea mays* L. line MON 810), pursuant to Council Directive 90/220/EEC. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:131:0032:0033:EN:PDF>

¹⁶ Directive 90/220/CEE du Conseil, du 23 avril 1990, relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement. Cette directive a été abrogée par la Directive 2001/18/CE. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990L0220:FR:HTML>

¹⁷ Regulation (EC) N° 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/labelling/Reg_1829_2003_en.pdf

¹⁸ Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0018:EN:HTML>

¹⁹ Commission decision of 13 October 2009 establishing standard reporting formats for presenting the monitoring results of the deliberate release into the environment of genetically modified organisms, as or in products, for the purpose of placing on the market, pursuant to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:275:0009:0027:EN:PDF>

The Commission requested EFSA²⁰ to assess the latest monitoring report of MON 810, concerning cultivation in Europe in 2010. Member States were invited to send their comments on the report for complementary analysis by EFSA. In this context, the French Competent Authorities (the Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire) solicited the High Council for biotechnologies (HCB) to assess the MON 810 2010 monitoring report.

The Scientific committee (SC) of HCB, which assessed the monitoring report of MON 810 maize cultivation in Europe in 2009, has analysed the report concerning MON 810 2010 cultivation, keeping in mind the results from the previous year. For the sake of conciseness and efficiency, the SC's comments focus on the aspects of the monitoring report identified as questionable.

2. Comments

In 2010, MON 810 maize was planted on approximately 91 190 ha (against ~94 850 ha in 2009) over six countries – mainly Spain (84%), but also in Portugal (5.3%), Czech Republic (5.1%), Poland (3.3%), Slovakia (1.4%), and Romania (0.9%).

Monsanto conducted surveillance actions of two types:

- general surveillance, aimed at identifying the occurrence of unexpected adverse effects of MON 810 maize on public health or the environment. This surveillance was conducted through surveys of MON 810 growers, scientific literature analysis, and company stewardship activities;
- case-specific surveillance, dedicated to monitor the development of insect resistance to the Cry1Ab toxin expressed by MON 810 maize among populations of target insects (European corn borer and pink stem borer), and provide the results of the company Insect Resistance Management strategy aiming at preventing/delaying the development of insect resistance.

The data and analyses presented in this report do not reveal any major problem related to MON 810 cultivation in 2010. The SC of HCB, however, points out weaknesses in the experimental methodologies, the sampling and the statistical analyses. As a result, it stresses that the conclusions that can be drawn out of these data are more limited than those stated in the report, particularly in regards to the possible development of insect resistance.

2.1 General surveillance

- Analysis of farmers' responses to the surveillance questionnaire

A questionnaire was designed to help collect and assess unexpected observations from the farmers cultivating MON 810. The way Monsanto analysed the farmers' responses to the questionnaire raised a number of issues for the SC of HCB.

As for the previous year, the SC regrets a lack of information on whether the sample of interviewed farmers was representative of the farmers growing MON 810 (agricultural practices, topography, cultivation in previous years of MON 810 or Bt176, etc.)²¹

Furthermore, the SC notes again that, notwithstanding possible sampling issues, the conclusions drawn from the statistical analysis of the farmers' responses to the questionnaire go beyond what the statistical analysis strictly permits to conclude. In fact, Monsanto concludes the analysis as follows (Main Report, p. 13):

²⁰ EFSA : European Food Safety Authority.

²¹ The SC of HCB stresses the importance of the post-marketing environmental monitoring plans in all its opinions, with the recurrent demand for a unique reporting platform with GIS (geographical information system), which would notably record the successive GM crops.

"The analysis of 271 questionnaires from the survey of farmers cultivating MON 810 in six European countries during the 2010 growing season did not reveal any unexpected adverse effects that could be associated with the genetic modification in MON 810."

Yet in Annex 1, which presents the detailed statistical analysis of the farmers' responses to the questionnaire, one finds that for each question, effects associated with MON 810 are not considered unless they are reported by more than 10% of the interviewed farmers. In other words, if less than 10% of the farmers report a specific adverse effect, this effect will be overlooked in the results of the analysis, whatever the size of the observed effect.

The SC of HCB has several comments on this issue:

- The survey only permits to conclude that less than 10% of the farmers have reported adverse effects (other than those aimed by the genetic modification) related to MON 810 cultivation. It is inappropriate to infer from this conclusion that no adverse effect has been observed;
- If Monsanto stated only the conclusion permitted by its statistical analysis of the farmers' responses to the questionnaire, that is, for each question, less than 10% of the farmers have noted an adverse effect related to MON 810 cultivation, what would be the meaning of this conclusion? What is the relevance of a 10% threshold? Why calculate p-values? It would have been more relevant to calculate confidence intervals for the proportions of farmers that have observed unusual adverse effects, rather than checking whether they are below or above a particular threshold;
- Finally, how to justify that issues as varied as germination vigour or plant disease resistance, occurrence of birds or insects in the fields, irrigation or insect control practices, are treated in the same way, using the same threshold to determine whether a reported adverse effect should be considered or not? Some parameters, such as an increased use of insecticides, should be considered problematic at a reporting threshold much lower than other parameters, because of the insect resistance characteristic of MON 810 maize.
- Review of scientific literature

The SC of HCB is in line with Monsanto regarding its analysis of over 40 publications related to MON 810 published since the previous MON 810 monitoring report (from June 2010 to the beginning of June 2011). Monsanto concludes (Main Report, p. 17) :

"The peer-reviewed literature demonstrates that MON 810 is as safe to human and animal health as its conventional counterpart and confirms that there is negligible impact from the cultivation of MON 810 on biodiversity, abundance, or survival of non-target species, and the environmental risk of MON 810 is considered to be negligible compared to conventional maize."

This conclusion is in accordance with the results of the publications reviewed. Nevertheless, even if the SC of HCB acknowledges that no formal evidence about adverse effects related to MON 810 has been established to date, it stresses that an absence of proof of adverse effects does not permit to conclude on the absence of adverse effects.

- Monsanto stewardship activities and environmental alerts system

Among stewardship activities conducted by Monsanto, the SC of HCB notes that the company is setting up a system for environmental alert *via* existing monitoring networks. In this objective, a list of selected existing networks was established in Germany. The use of the German system was not mentioned in the 2010 monitoring report because no maize MON 810 was cultivated at this time in Germany. Based on this example in Germany, the EuropaBio Working Group on monitoring is currently coordinating a more general effort to map existing environmental monitoring networks in Europe to set up a unique reporting system.

The SC of HCB welcomes this effort, which is in line with the latest recommendations of EFSA (EFSA, 2011) and its own requirements in terms of centralisation of monitoring data. It only wishes it had been done earlier, considering MON 810 maize has been cultivated for over ten years in Europe.

2.2 Monitoring and management of insect resistance

The SC of HCB notes that the risk of resistance developing in target insects is not a risk to the environment, because insect resistance to a *Bt* toxin would *a priori* have no impact on the agroecosystem. The loss of Cry1Ab toxin's insecticidal efficiency would raise the problem of a loss of a useful strategy for the farming community to control the European corn borer and the pink stem borer. Therefore, it is important to take measures to mitigate the risk of insect resistance development, to control their implementation and to monitor their efficiency by monitoring insect susceptibility.

- Refuges

Monsanto conducted a survey on refuge implementation involving 100 farmers who cultivated MON 810 maize in the Ebro Valley in Spain: 100% of the farmers knew about the recommendations from Monsanto for planting conventional maize refuge, and 88% declared having planted a refuge on their farm in 2010. These high level-of-compliance responses indicated high public awareness among farmers, which is a good sign for the implementation of measures to mitigate the risk of insect resistance development. However, as in last year's report, the SC considers that to correctly assess refuge implementation, Monsanto should check the situation in the field rather than relying on answers to a survey:

p. 19 : "*The survey also revealed a high level of compliance with refuge requirements indicating that 88 of the 100 farmers that were included in the final survey planted a conventional maize refuge on their farm.*"

The responses of the farmers may not reflect properly the reality and/or the efficacy of their refuge strategy. On this last point, David A. Andow and colleagues have shown that some farmers in the US did plant a refuge, but they did not comply with the planting patterns of in-field refuges required by the US Environmental Protection Agency (Andow et al., 2010).

In addition, it is interesting to note that, among the reasons given by the farmers for not planting a refuge was the fact that, over half of them (*i.e.* 7% of the total) indicated that their farm was smaller than 5 ha; other reasons related to economic losses or practical aspects.

The SC of HCB has two comments on this issue:

- 1) Farmers growing MON 810 maize are not required to set up refuges in Europe. Refuge implementation is a recommendation of Monsanto for farmers cultivating MON 810. The SC of HCB proposes that the Commission imposes the implementation of refuges by farmers growing MON 810 or any other *Bt* crop, through an explicit mention in the decision for authorisation of cultivation.
- 2) The insect resistance management plan should be adapted to European conditions, where the agricultural landscape is more fragmented than in the US. Recommendations for a proportion of no less than 20% of non-*Bt* maize refuge zones for farmers growing more than 5 ha of MON 810 should either be extended to farmers growing less than 5 ha, or be considered at the landscape level, and based upon cooperation between local farmers.

- Monitoring of susceptibility in target pests

The evolution of susceptibility to Cry1AB in populations of *O. nubilalis* and *S. nonagrioides* is a weak point of the study and the report of Monsanto. As in 2009, Monsanto chose to monitor this susceptibility by comparing fitted curves of susceptibility from field populations and lab colonies. The conclusions of the study are (Main Report p. 21):

- "*the analyses of historical series of susceptibility data of S. nonagrioides to Cry1Ab did not reveal signs of development of resistance to this toxin by field populations from the sampling areas considered (see Appendix 7).*"
- "*the observed population variation in susceptibility reflects natural variation in Bt susceptibility among O. nubilalis populations. Any evidence for a decrease of Cry1Ab susceptibility of populations during the monitoring duration from 2005–2010 could not be detected.*"

These conclusions are clearly correct, but the methodology followed for susceptibility monitoring and the populations selected for analysis in 2010 are problematic for the SC of HCB, for the following reasons:

- 1) Several papers [e.g. : (Andow and Ives, 2002)] have stressed that the comparison of susceptibility curves is not the most sensitive method to monitor the evolution of resistance, especially when it is recessive (which is the case for most resistance genes to *Bt* toxins). It is practically impossible to detect, *via* susceptibility curves, an evolution of resistance before the underlying genes reach allelic frequencies of several percents;
- 2) Few samples of larvae were collected from natural populations of *S. nonagrioides*, and those samples were relatively small. In Southwest Iberia, *S. nonagrioides* susceptibility to Cry1Ab was measured on the progeny of adults from a pool of two samples: a sample of 41 larvae from one location in Spain, and a sample of 123 larvae from another location in Portugal. It is not indicated how many adults developed from these larvae, neither how many adults mated to give rise to this progeny. It is only mentioned that the larvae did not reach the minimum number required for the bioassay, which was then performed on the subsequent generation, the F2 progeny of the collected larvae. Following their multiplication over two generations, the larvae were in sufficient numbers to perform the susceptibility bioassay, but the number of adults (number of genomes) from the initial sample who effectively contributed to this progeny kept relatively small, necessarily smaller than the number of larvae initially collected. Therefore, *S. nonagrioides* susceptibility to Cry1Ab in Southwest Iberia was estimated out of a relatively limited number of genes, probably coming from no more than a few dozens of individuals collected from two locations;
- 3) In the monitoring report of MON 810 2009 cultivation, the *S. nonagrioides* sample collected from the site located in Northwest Iberia (Ebro Valley) showed a significant increase in LC²² values and a less significant increase in MIC²³ values compared to the susceptible strain since 2006. This result was difficult to interpret, but could be the consequence of the early stage of resistance development in this region. The SC of HCB concluded, in its comments on the 2009 monitoring report, that these results could come from a rise of the allelic frequency of a resistance gene in the population. Given that the hypothesis of natural variation could not be rejected either, the SC of HCB recommended that this population be subject to close monitoring to collect more data to test both hypotheses. Yet in 2010, no sample was tested from this region and the monitoring report provides no explanation for this. It is therefore impossible to test the hypothesis of the development of *S. nonagrioides* resistance to Cry1Ab in this region;
- 4) Finally, the SC of HCB notes that LC measures on *S. nonagrioides* samples have been discontinued because they were thought less relevant than MIC values for monitoring resistance. As a result, it is no longer possible to follow the variations of susceptibility in populations that were previously analysed using this method.

For these reasons, the SC of HCB considers that the absence of significant variations in the susceptibility curves since 2005, stressed by Monsanto, does not permit to conclude on the evolution of resistance in the populations of *O. nubilalis* and *S. nonagrioides*.

5. Conclusions

To conclude, the data presented by Monsanto in this report show no major problem related to MON 810 maize cultivation in 2010 in Europe. Nevertheless, the SC of HCB stresses that experimental and statistical methodologies could be improved to facilitate the detection of potential adverse effects related to MON 810 cultivation, especially the development of resistance in target insects. In addition, the SC of HCB pushes for a better mitigation of the risk of insect resistance development by a better implementation of refuges, even if it

²² LC : lethal concentrations. Eg : LC₅₀ and LC₉₀, concentrations leading to the death of 50 % and 90 % of larvae.

²³ MIC : molting inhibition concentrations. Eg : MIC₅₀ and MIC₉₀, concentrations leading to molting inhibition of 50 % and 90 % of larvae.

considers this risk is not a risk to the environment but a risk for the loss of a pest control strategy.

6. References

Andow, D.A., Farrell, S.L., and Hu, Y. (2010). Planting patterns of in-field refuges observed for Bt maize in Minnesota. *J Econ Entomol* 103, 1394-1399.

Andow, D.A., and Ives, A.R. (2002). Monitoring and adaptive resistance management. *Ecol Appl* 12, 1378-1390.

EFSA (2011). Scientific Opinion on guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. *The EFSA Journal* 9 (8): 2316, 40 pp.