

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 3 juillet 2012

AVIS

en réponse à la saisine **120411-saisine HCB- dossier 2011-101**¹
concernant le dossier **EFSA-GMO-BE-2011-101**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 18 avril 2012 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) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-BE-2011-101 portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du colza génétiquement modifié MON 88302 à des fins d'importation, transformation, et utilisation en alimentation humaine et animale.

Ce dossier a été déposé par Monsanto Europe S.A. de la part de la société Monsanto dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003 auprès de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA), sous la référence **EFSA-GMO-BE-2011-101**. La saisine du HCB correspondante est référencée **120411-saisine HCB- dossier 2011-101**.

Dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est centralisée par l'AESA. Les Etats membres disposent de trois mois pour envoyer leurs commentaires en contribution à l'évaluation du dossier. Dans ce cadre, le HCB est invité à envoyer un avis sous forme de commentaires à destination de l'AESA d'ici le 12 juillet 2012.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 5 juin 2012 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Les commentaires du HCB à destination de l'AESA sont transmis par ce rapport aux Autorités compétentes françaises.

¹ La saisine « **120411-saisine HCB- dossier 2011-101** » est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS est indiquée dans l'Annexe 2.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	3
1.1. CONTEXTE ET ENJEU DE LA SAISINE	3
1.2. PRÉSENTATION DU DOSSIER	4
2. COMMENTAIRES À DESTINATION DE L'AESA.....	4
2.1. REMARQUES GÉNÉRALES	4
2.2. COMMENTAIRES PAR SECTIONS DÉFINIES PAR L'AESA	5
3. BIBLIOGRAPHIE	20
ANNEXE 1 : SAISINE	25
ANNEXE 2 : ELABORATION DES COMMENTAIRES	26
ANNEXE 3 : COMMENTAIRES TRADUITS EN ANGLAIS À DESTINATION DE L'EFSA ...	27
A3.1. GENERAL COMMENTS.....	27
A3.2. COMMENTS PER SECTION.....	28

1. Introduction

1.1. Contexte et enjeu de la saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 18 avril 2012 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) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-BE-2011-101, portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du colza génétiquement modifié MON 88302 à des fins d'importation, transformation, et utilisation en alimentation humaine et animale. Le dossier EFSA-GMO-BE-2011-101 a été déposé par Monsanto Europe S.A. de la part de la société Monsanto dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003³ (EC, 2003) auprès de l'AESA⁴.

Dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché de plantes génétiquement modifiées est centralisée par l'AESA, qui doit transmettre son opinion à la Commission européenne dans un délai de six mois à compter de la date de validation du dossier – en pratique, cette période de six mois peut être allongée au cas où une demande d'information supplémentaire est adressée au pétitionnaire. Les Etats membres disposent d'un délai ferme de trois mois pour envoyer leurs commentaires à l'AESA en contribution à l'évaluation du dossier. C'est dans ce cadre que le HCB a été saisi ; l'avis du HCB prend donc la forme de commentaires à destination de l'AESA.

L'enjeu de cet avis du HCB est donc de contribuer à l'évaluation du dossier par l'AESA. Les commentaires des Etats membres, dès réception par l'AESA, sont transmis d'une part aux experts de trois groupes de travail du panel OGM⁵ de l'AESA (Analyse moléculaire, Alimentation humaine et animale, Environnement), et d'autre part à l'Etat membre auquel l'AESA a délégué l'évaluation du risque environnemental. En l'occurrence, la culture étant exclue du champ de demande d'autorisation de ce dossier, l'AESA a choisi de ne pas déléguer cette évaluation.

Les groupes de travail de l'AESA examinent les commentaires des Etats membres, les intègrent dans leur analyse des dossiers, et, quand ils le jugent pertinent, les transmettent au pétitionnaire sous forme de questions pour clarification ou demande d'information supplémentaire. Si tous les commentaires ne sont pas nécessairement transmis au pétitionnaire, ils font tous l'objet d'une réponse spécifique par l'AESA. Les commentaires de chaque Etat membre, ainsi que les réponses correspondantes de l'AESA, sont rendus publics, en annexe de l'opinion scientifique de l'AESA à destination de la Commission européenne.

La procédure de transmission des commentaires à l'AESA est strictement cadrée. Les Autorités compétentes des Etats membres sont invitées à poster des commentaires en ligne, en anglais, dans des formulaires distincts pour chaque section des dossiers. Les sections sont basées sur la structure des dossiers recommandée dans le document d'orientation de l'AESA relatif à la soumission de dossiers de demande d'autorisation de plantes génétiquement modifiées à des fins alimentaires (EFSA, 2011a). Ces commentaires doivent être ciblés sur des demandes spécifiques adressées à l'AESA, soit pour une demande de clarification ou d'information supplémentaire de la part du pétitionnaire, soit pour la prise en compte de remarques spécifiques dans son évaluation des dossiers et l'élaboration de son opinion scientifique.

Par cet avis, le Comité scientifique (CS) du HCB transmet aux Autorités compétentes françaises des commentaires destinés à l'AESA en français, avec une traduction en anglais présentée en annexe.

³ 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>.

⁴ AESA : Autorité européenne de sécurité des aliments, ou EFSA : *European Food Safety Authority*

⁵ OGM : organismes génétiquement modifiés.

1.2. Présentation du dossier

Le colza génétiquement modifié MON 88302 exprime l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase de la souche CP4 d'*Agrobacterium* (CP4 EPSPS) qui lui confère la tolérance au glyphosate, ingrédient actif d'herbicides non sélectifs. Ce colza est présenté comme un colza de seconde génération par la société Monsanto qui précise que l'utilisation du promoteur chimérique *FMV/Tsf1* permettrait l'expression de la protéine CP4 EPSPS dans le pollen (caractère non testé dans ce dossier), ce qui améliorerait le contrôle des adventices par l'application de plus fortes teneurs de glyphosate et à des stades plus tardifs de développement sans affecter la fertilité mâle.

L'ADN de transfert (ADN-T) portant la cassette d'expression de ce gène est présent en un locus d'insertion et en une copie unique. Le caractère est stable au cours des générations d'auto-fécondations et de croisements. Aucun autre transgène que celui porté par l'ADN-T n'est présent dans le colza MON 88302. L'insertion n'interrompt pas de séquences codantes ou régulatrices connues ou reconnaissables du colza.

Le pétitionnaire présente dans ce dossier l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires de l'importation, la transformation, et l'alimentation humaine et animale du colza MON 88302 dans l'Union européenne. Le CS du HCB propose d'envoyer les remarques suivantes à l'AESA concernant les points du dossier identifiés comme critiquables.

2. Commentaires à destination de l'AESA

2.1. Remarques générales

Remarques majeures :

1. Le CS du HCB demande qu'une étude de toxicité orale à doses répétées sur rongeurs sur 90 jours soit réalisée pour évaluer la toxicité des tourteaux de colza MON 88302. Cette étude devra prendre en compte les comparateurs appropriés pour une plante GM tolérante à un herbicide. Les traitements herbicides devront être réalisés dans les conditions de traitement escomptées pour la culture du colza MON 88302.
2. Le CS du HCB demande qu'une étude d'alimentarité soit effectuée pour évaluer l'impact nutritionnel des tourteaux de colza MON 88302 dans les conditions spécifiées ci-dessus.
3. Le CS du HCB demande au pétitionnaire de parfaire l'évaluation du risque de formation de populations férales de colza MON 88302 dans les milieux semi-naturels, de leur persistance dans des conditions prenant en compte de façon réaliste l'application potentielle d'herbicides à base de glyphosate, et de la probabilité et des conséquences agro-écosystémiques d'un transfert du transgène conférant une tolérance au glyphosate vers des variétés de colza cultivées ou des espèces adventices apparentées.
4. Le CS du HCB demande au pétitionnaire de proposer (1) des mesures précises pour minimiser le risque avéré de dissémination fortuite de graines de colza entre les ports d'arrivée et les usines de trituration, (2) des mesures de surveillance pour détecter les repousses de colza MON 88302, et (3) des mesures pour les détruire si elles sont détectées. Le CS du HCB recommande une étroite collaboration du pétitionnaire avec les autorités compétentes nationales et les acteurs locaux pour que ces mesures soient définies de manière circonstancielle, en prenant en compte les spécificités du pays d'importation.

Autres remarques significatives :

1. Le CS du HCB juge non satisfaisantes les conditions dans lesquelles les analyses comparatives ont été réalisées :
 - le colza MON 88302 traité au glyphosate semble avoir été comparé à des comparateurs non traités ; le dossier n'apporte en fait aucune précision sur le traitement des comparateurs. Les recommandations de l'AESA sont précises quant

aux composantes à intégrer dans les comparaisons impliquant une plante GM tolérante à un herbicide, à savoir : les plantes GM exposées à l'herbicide auquel elles sont tolérantes, leur comparateur soumis à un régime conventionnel d'herbicide, et les plantes GM soumises à ce même régime conventionnel (EFSA, 2010a, b, 2011b, c). Si ces recommandations ne sont pas suivies, ce qui est le cas de ce dossier, le CS du HCB demande a minima que le pétitionnaire prenne en compte la spécificité des conditions expérimentales des essais dans l'analyse des résultats de comparaison ;

- le traitement du colza MON 88302 au glyphosate a été réalisé à un stade relativement précoce, qui ne permet pas de tester les conséquences d'un traitement tardif rendu possible par les caractéristiques de la modification génétique revendiquées par le pétitionnaire.
- 2. Concernant la qualité de l'analyse statistique, les tests de comparaison et d'équivalence suivent globalement les recommandations de l'AESA (EFSA, 2010b) à part pour certaines caractéristiques (notamment la viabilité et la morphologie des grains de pollen, la dormance et la germination des graines) pour lesquelles les analyses devraient être reprises. En revanche, le CS du HCB déplore l'absence systématique d'analyse de puissance et de transformation des données. Le CS du HCB demande qu'une analyse de puissance ou qu'une réflexion approfondie telle que celle proposée en alternative par l'AESA (EFSA, 2010b) soit réalisée par le pétitionnaire pour toutes les analyses de comparaison. Conformément aux recommandations de l'AESA (EFSA, 2010b), la transformation des données peut également être nécessaire pour ne pas risquer d'exclure de l'analyse des données considérées à tort comme aberrantes.
- 3. Conformément aux recommandations de l'AESA concernant les caractères dont la non-équivalence entre la PGM et les variétés de référence non GM est démontrée (EFSA, 2010b), le CS du HCB souhaiterait que le pétitionnaire procède à un examen plus approfondi de la caractéristique marquée de retard à la floraison du colza MON 88302.
- 4. Le CS du HCB relève l'inadéquation des méthodologies expérimentales utilisées pour évaluer la viabilité et la morphologie des grains de pollen, ainsi que la dormance et la germination des graines. Des méthodes appropriées devraient être mises en œuvre pour évaluer correctement ces caractéristiques.
- 5. Le CS du HCB recommande les évaluations supplémentaires suivantes : la production de pollen, la durée de floraison, l'expression de *cp4 epsps* et la fonctionnalité de la protéine dans le pollen, l'impact de la modification sur la faune pollinisatrice, et la dormance secondaire des graines, qui permettraient de mieux caractériser la persistance des graines et l'adventicité du colza MON 88302.
- 6. Le CS du HCB regrette que les nécessaires références à des rapports expérimentaux ou à des articles pertinents ne soient pas toujours présentes là où elles le devraient dans le document principal, ce qui rend l'examen du dossier d'autant plus fastidieux pour les experts.
- 7. Enfin, certains membres du CS du HCB soulignent qu'une étude plus large serait souhaitable concernant les conséquences en Europe de la culture du colza MON 88302 dans des pays tiers exportateurs, non seulement en termes socio-économiques, mais également en termes de biodiversité. De même, une autre étude pourrait considérer l'influence de l'importation de certains produits sur le choix des cultures en Europe, et donc sur la biodiversité résultant de ces choix agrosystémiques.

2.2. Commentaires par sections définies par l'AESA

N.B. : Les titres soulignés correspondent aux sections de dossier définies par l'AESA, et aux différents formulaires mis à disposition par l'AESA pour la collecte de commentaires en ligne. Seules les sections pour lesquelles le HCB transmet des commentaires sont indiquées ici. Chaque commentaire est écrit de manière indépendante. La somme des commentaires n'est pas destinée à constituer un texte en soi.

A. Hazard identification and characterisation

2. Molecular Characterisation

2.2. Information relating to the GM plant

2.2.1 General description of the trait(s) and characteristics which have been introduced or modified

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 29:

“Monsanto Company has developed a second-generation glyphosate-tolerant oilseed rape product, MON 88302, designed to provide growers with improved weed control through tolerance to higher rates of glyphosate and greater flexibility for glyphosate herbicide application.

[...]

“MON 88302 utilizes a FMV/Tsf1 chimeric promoter sequence to drive CP4 EPSPS expression in different plant tissues including pollen. By virtue of CP4 EPSPS expression in pollen, MON 88302 provides tolerance to glyphosate during the sensitive reproductive stages of growth, and enables the application of glyphosate at higher rates up to first flower with no detectable impact to male fertility.”

Le dossier ne contient pas d'information sur l'expression de la protéine CP4 EPSPS dans d'autres tissus que dans la graine (section A 2.2.3, p. 54), qui permettrait de vérifier la description fournie ci-dessus par le pétitionnaire. Si la protéine CP4 EPSPS s'exprime dans le pollen et permet une application tardive d'herbicide à base de glyphosate, l'information devrait être considérée dans le dossier pour permettre de compléter (1) l'évaluation des risques pour la santé humaine et animale associés à la consommation de produits dérivés de colza MON 88302 traités tardivement au glyphosate, et (2) l'évaluation des risques pour l'environnement et les agrosystèmes, associés aux conséquences d'une dissémination accidentelle de graines de colza MON 88302 à partir des voies d'importation.

2.2.3 Information on the expression of the inserted/modified sequence

L'analyse de l'expression de la protéine CP4 EPSPS n'est effectuée que dans les graines. Le pétitionnaire justifie ce choix par le champ d'application de la demande d'autorisation de mise sur le marché :

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 54 :

“The scope of this application covers the import, processing and all uses of MON 88302 (excluding cultivation). Therefore, protein expression data related to the seed produced by MON 88302 is considered the most relevant [...].”

Or, d'après la description qu'en fait le pétitionnaire, le colza MON 88302 aurait la particularité d'exprimer la protéine dans de nombreux tissus de la plante ainsi que dans le pollen, ce qui permettrait une application tardive d'herbicide à base de glyphosate. Cette information semble importante à examiner au regard de (1) l'évaluation des risques pour la santé humaine et animale associés à la consommation de produits dérivés de colza MON 88302 traités tardivement au glyphosate, et (2) l'évaluation des risques pour l'environnement et les agrosystèmes associés aux conséquences d'une dissémination accidentelle de graines de colza MON 88302.

3. Comparative assessment

3.2. Field trials: experimental design and statistical analysis

3.2.1 Experimental design

Si le choix des comparateurs non GM pour l'analyse comparative du colza MON 88302 est acceptable, l'expérimentation proposée dans le texte principal, et décrite dans l'annexe correspondante (McPherson and Ahmad, 2012), n'indique pas si ces comparateurs reçoivent

un traitement herbicide quand il s'agit de les comparer avec le colza MON 88302 traité au glyphosate. Seul le traitement au glyphosate sur le colza MON 88302 est mentionné.

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 65 :

"Glyphosate was applied to predetermined plots of glyphosate-treated MON 88302 at each site."

Les résultats de comparaison impliquant le colza MON 88302 traité au glyphosate ne sont pas plus précis sur l'existence d'un traitement herbicide quelconque sur ces plantes (voir section A.3.3). Sans cette information, le dossier laisse à penser que l'ensemble des comparaisons effectuées sur le colza MON 88302 traité au glyphosate est réalisé avec des comparateurs non traités. Toute différence observée pourrait alors être imputée autant au traitement herbicide qu'à la modification génétique du colza en conditions de traitement.

Les quatre documents d'orientation de l'AESA sur l'évaluation des risques relatifs aux aliments consistant ou provenant de plantes GM (EFSA, 2011c), sur l'évaluation environnementale des plantes GM (EFSA, 2010a), sur les considérations statistiques relatives à l'évaluation des OGM (EFSA, 2010b), et sur le choix des comparateurs pour l'évaluation des risques des plantes GM et aliments dérivés (EFSA, 2011b), recommandent systématiquement que l'analyse comparative des plantes GM tolérantes aux herbicides mette en jeu trois composantes : les plantes GM exposées à l'herbicide auquel elles sont tolérantes, leur comparateur, soumis à un régime conventionnel d'herbicide, et les plantes GM soumises à ce même régime conventionnel.

Si le traitement herbicide au glyphosate est effectivement considéré dans les analyses comparatives du colza MON 88302, il l'est d'une manière qui ne permet pas de dissocier les effets de la modification génétique en conditions de traitement des effets du seul traitement herbicide. Toute différence observée dans ce dispositif expérimental devra être analysée en connaissance de cause.

De plus, considérant les caractéristiques du colza MON 88302 revendiquées par le pétitionnaire, à savoir que ce colza peut être traité de manière tardive – jusqu'à l'apparition des premières fleurs –, le matériel de comparaison aurait dû permettre de tester l'impact d'un traitement tardif du colza. Or, le glyphosate est appliqué au stade 4-5 feuilles dans les expérimentations en champ qui ont servi à toutes les études de comparaison réalisées sur le colza MON 88302 dans le dossier (Information confidentielle, (McPherson and Ahmad, 2012)).

3.2.3 Statistical analysis

Les recommandations de l'AESA en termes de tests de comparaison et d'équivalence ont été scrupuleusement suivies pour l'analyse statistique des données de composition et des données agronomiques et phénotypiques, à l'exception des études supplémentaires concernant l'évaluation de la dormance et de la germination des graines (voir A 3.4.4), et l'évaluation de la morphologie et de la viabilité du pollen (voir A 3.4.5).

La méthodologie est clairement détaillée, les données sont disponibles ainsi que les codes du logiciel de statistique SAS utilisés pour leur analyse. Le CS du HCB déplore toutefois l'absence de transformation des données, l'absence d'analyse de puissance, ainsi qu'une incohérence dans l'utilisation de l'analyse statistique pour interpréter certains résultats (voir A 3.3.2).

Concernant la transformation des données, l'AESA recommande ((EFSA, 2011c), p. 16) :

"Data transformation may be necessary to ensure normality and to provide an appropriate scale on which statistical effects are additive".

En effet, les modèles utilisés sont additifs et font l'hypothèse que les données ont une distribution gaussienne. Une distribution asymétrique peut conduire à des biais et surtout, à considérer à tort certaines observations comme des données aberrantes, et donc à les éliminer à tort.

Concernant l'analyse de puissance, le pétitionnaire justifie son absence en invoquant les recommandations de l'AESA (*Appendix G Statistics for comparative studies*, p. 4) :

"The experimental designs followed in compositional and agronomic analyses comply with the requirements set in the EFSA guidance document"

Or, le document d'orientation de l'AESA invoqué par le pétitionnaire (EFSA, 2011c) mentionne, p. 2 :

"[T]his document also provides up-to-date guidance on [...] the design of the field trials for compositional, agronomic and phenotypic characteristics ensuring sufficient statistical power (see EFSA, 2010b)"

Avec la référence citée (EFSA, 2010b) précisant (p. 8) :

"Ignoring Type II errors might lead to an erroneous indication of safety, while in reality the experiment simply was not sensitive enough to detect adverse effects. The complement of the probability of Type II error is termed 'statistical power'. [...]The risk assessor must ensure that an evaluation has sufficient power to provide reasonable evidence of equivalence. [...]"

"A power analysis, executed when the study is being planned and prior to its start may be used to estimate power, to choose appropriate replication and to give confidence that the experiment will detect any significant effect that is present."

Ce même document de l'AESA mentionne p. 11 qu'au pire et par simplification, l'analyse de puissance peut être remplacée par une réflexion approfondie sur le nombre de répétitions minimum de mesures à effectuer. Cette approche alternative est cadrée par des recommandations spécifiques de l'AESA (EFSA, 2010b). Aucune réflexion de ce type n'est menée par le pétitionnaire.

Le CS du HCB demande qu'une analyse de puissance ou qu'une réflexion approfondie telle que celle décrite par l'AESA soit réalisée par le pétitionnaire pour tout test de comparaison.

3.3. Compositional analysis

3.3.2 Results

Le CS du HCB souligne à nouveau le fait que les comparateurs non GM utilisés en comparaison du MON 88302 traité au glyphosate ne semblent pas traités. Le pétitionnaire devrait clarifier ce point et le prendre en compte dans l'interprétation de ces analyses comparatives.

Toutes les composantes sont analysées selon les tests de comparaison et d'équivalence recommandés par l'AESA, à part pour l'humidité : le CS du HCB s'étonne que le pétitionnaire indique ne pas pouvoir se prononcer sur le sujet de l'équivalence pour l'humidité sous prétexte d'un manque de variabilité des variétés non GM de référence pour cette composante.

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 75 :

"Equivalence limits for moisture could not be established due to a lack of observable variation in values for the conventional reference varieties."

Le CS du HCB estime que le test d'équivalence devrait être utilisé dans les mêmes conditions pour tous les constituants et quel que soit le niveau de variabilité observé dans les variétés non GM de référence. Le CS du HCB demande que le pétitionnaire clarifie ce problème.

3.3.3 Conclusion

Mis à part le cas souligné en 3.3.2 de l'humidité, pour lequel des explications sont demandées, et malgré le problème de rigueur méthodologique concernant l'absence de traitement des comparateurs quand ils sont comparés au colza MON 88302 traité au glyphosate, le CS du HCB s'accorde avec le pétitionnaire sur le fait que l'on peut conclure que les variations de composition observées pour le colza MON 88302 dans les conditions testées s'inscrivent dans la variabilité naturelle des variétés non GM de référence. Le CS du HCB souligne cependant que les conditions expérimentales testées n'incluent pas de traitement tardif du colza MON 88302 au glyphosate.

3.4. Agronomic and phenotypic characteristics

3.4.2 Agronomic and phenotypic results

Comme précédemment, le CS du HCB demande au pétitionnaire de prendre en compte l'absence de traitement herbicide des comparateurs dans son interprétation des analyses comparatives impliquant le MON 88302 traité au glyphosate. Le CS du HCB rappelle les recommandations de l'AESA concernant les 3 composantes à mettre en jeu dans l'analyse comparative des plantes GM tolérantes aux herbicides : les plantes GM exposées à l'herbicide auquel elles sont tolérantes, leur comparateur, soumis à un régime conventionnel d'herbicide, et les plantes GM soumises à ce même régime conventionnel (EFSA, 2010a, b, 2011b, c).

Si aucune différence statistiquement significative entre le MON 88302 (traité ou non au glyphosate) et son comparateur quasi isogénique non GM n'a été notée pour 7 des 10 des caractères étudiés (densité de plantes à la levée et à la récolte ; hauteur de la plante ; taux d'égrenage des gousses ; taux d'humidité des graines récoltées ; qualité des semences (pourcentage de graines vertes à la récolte) ; rendement), des différences statistiquement significatives ont été détectées pour 3 caractères (maturation des graines, verse, et nombre de jours avant floraison).

Le retard de maturation des graines et la réduction de la verse du MON 88302 par rapport à son comparateur non GM quasi isogénique s'inscrivent dans les limites d'équivalence définies pour les variétés commerciales de référence. Ce n'est pas le cas pour le retard de floraison : il faut 63 jours en moyenne pour que 50 % des plantes de colza MON 88302 aient au moins une fleur, (63,4 jours pour le colza MON 88302 traité au glyphosate) à comparer avec 58,7 jours pour le comparateur quasi isogénique non GM, et des limites d'équivalence définies pour les variétés conventionnelles de référence de 50,4 à 59,7 jours.

Le pétitionnaire change alors de référence d'analyse et se base sur une publication du Canola Council of Canada indiquant pour ce caractère une gamme de variation plus large (54 – 69 jours) que celle observée chez les variétés de référence utilisées comme comparateurs dans l'expérimentation incluse dans le dossier, ce qui lui permet de conclure que les valeurs mesurées pour le colza MON 88302 se situent bien dans la gamme des valeurs attendues pour cette culture.

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 25 :

"Although the mean value for days-to-first flowering of glyphosate-treated MON 88302 was outside the equivalence limits calculated for the commercial reference varieties (50.4 – 59.7 days), the Canola Council of Canada reports a typical range of 54 – 69 days to first flowering for field-grown oilseed rape. Thus, days-to-first flowering for glyphosate-treated MON 88302 were well within the range of values expected for the crop".

Ce raisonnement remet en question la valeur des expériences établies pour optimiser l'analyse comparative entre PGM et comparateurs non GM cultivés dans les mêmes conditions. L'AESA recommande que l'utilisation de publications externes pour établir ces limites d'équivalence soit tout à fait exceptionnelle et justifiée de manière robuste ((EFSA, 2010b), p. 25) :

"There may be rare cases where it is impossible to assess the natural variation from data on commercial varieties in the same experiment, either because such an experiment would be impossible or unreasonable to perform, or because such varieties have for unforeseen reasons not yielded satisfactory data from the experiment. If very strong and explicit justification can be given for not performing an experiment with commercial varieties then the use of external data on natural variation might be considered."

Aucune justification n'est donnée ici, d'autant que l'expérience est effectivement réalisée et qu'elle conduit à des résultats de catégorie IV démontrant la non-équivalence entre la plante GM et les variétés non GM de référence. Conformément aux recommandations de l'AESA dans cette situation, le CS du HCB demande qu'une évaluation plus poussée de ce caractère soit réalisée (EFSA, 2010b).

En termes d'interprétation biologique et d'analyse de risques, le CS du HCB souhaiterait que le pétitionnaire commente le retard statistiquement significatif de maturation des graines et la

réduction statistiquement significative de la verse du MON 88302 par rapport à son comparateur non GM quasi isogénique même s'ils s'inscrivent dans les limites d'équivalence définies par les variétés commerciales de référence.

Concernant l'impact de la modification sur les caractères d'adventicité et de persistance du MON 88302, le CS du HCB regrette que la durée de floraison n'ait pas été évaluée en plus du nombre de jours avant la floraison.

3.4.3 Environmental interaction

Le CS du HCB déplore que cette section considère uniquement les facteurs de stress biotiques et abiotiques et ne prennent pas en compte l'impact sur la faune pollinisatrice puisque celle-ci joue un rôle dans la production du colza (Bommarco et al., 2012) et la dispersion efficace du pollen de colza (Chifflet et al., 2011).

3.4.4 Evaluation of seed dormancy and germination

La dormance secondaire des graines oléagineuses peut contribuer à la persistance des graines dans le sol (Gulden et al., 2004). Or, le pétitionnaire teste ici la dormance primaire, dont on sait pourtant qu'elle est négligeable pour le colza. Comme attendu, bien trop peu de graines sont dans un état de dormance primaire pour pouvoir évaluer une différence statistiquement significative entre le MON 88302 et son comparateur quasi isogénique dans les expériences réalisées dans le dossier (McPherson, 2010a, 2011) (Document principal p. 99-103). Malgré l'absence flagrante de données conclusives, le pétitionnaire affirme néanmoins (p. 100) :

“Based on the assessed characteristics, the results of this study demonstrate that there were no changes in the dormancy or germination characteristics that are indicative of increased plant weediness or pest potential of MON 88302 compared to the conventional counterpart”.

Le CS du HCB rappelle que de telles conclusions ne peuvent être faites en l'absence d'analyse de variance pour pouvoir conclure à l'absence de différences statistiquement significatives, et d'analyse de puissance pour pouvoir conclure à l'absence de différences biologiquement significatives. Enfin, aucun test d'équivalence n'est effectué pour pouvoir conclure à l'équivalence entre le colza MON 88302 et les variétés non GM de référence concernant la dormance des graines et la germination.

Mais le CS du HCB souligne surtout que le vrai problème ici est que le pétitionnaire n'évalue pas la dormance secondaire, qui contribue à la persistance des graines dans le sol. Plusieurs méthodes ont été publiées pour tester la dormance secondaire et la viabilité des graines (Gruber et al., 2004; Weber et al., 2010). Le CS du HCB indique qu'il est important de considérer ce niveau de dormance secondaire pour mieux caractériser les capacités de persistance du colza MON 88302 dans le sol, qu'il y ait des différences avec le colza non GM ou non.

3.4.5 Evaluation of pollen morphology and viability

Cette étude est surprenante à plus d'un titre du fait des méthodes employées qui sont obsolètes voire franchement inadéquates de sorte que les conclusions d'absence de différences entre le pollen de colza MON 88302 et celui provenant d'un témoin qui consistait en la variété quasi isogénique non GM ou des variétés commerciales non GM de référence n'apportent en fait que très peu d'information.

Ainsi, le test d'Alexander (Alexander, 1980) utilisé pour mesurer la viabilité du pollen est en fait un test d'aptitude à la coloration des grains de pollen et non un test de viabilité comme cela a été montré chez de nombreuses espèces et depuis fort longtemps puisque même du pollen mort se colore à la fuchsine acide avec le test d'Alexander (voir les publications de (Barrow, 1983) sur *Gossypium hirsutum* et (Parfitt and Ganeshan, 1989) sur *Prunus*). Il est d'ailleurs remarquable que les auteurs de l'étude n'aient pas été surpris des résultats puisque les taux de 'viabilité' mesurés ont varié entre 99 % et 100 % (Tableau 20, p. 105 du document

principal). La méthode couramment employée actuellement et qui est reconnue pour mesurer la viabilité du pollen est la méthode fluorochromatique ou FCR (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970; Heslop-Harrison et al., 1984). Aucune publication sur la viabilité du pollen avec cette méthode validée ne donne des valeurs aussi élevées que celles rapportées ici et ce quel que soit le modèle végétal étudié (voir par exemple le cas du pollen de melon (Vaissière et al., 1996)). Il est vrai que ces valeurs ont été obtenues en examinant entre 70 et 100 grains avec 5 répétitions [Information confidentielle (McPherson, 2010b)], mais l'équipe de Mesquida par exemple, a obtenu au maximum 91 % de taux de germination avec du pollen de colza prélevé aussi directement dans les fleurs (Mesquida et al., 1987).

Pour ce qui concerne la morphologie du pollen, celle-ci a été observée sur 10 grains avec 5 répétitions (un échantillon par plante) à un grossissement de 400X [Information confidentielle Figure 1, (McPherson, 2010b)]. Dans ces conditions et compte tenu d'un diamètre moyen de 25 µm, il n'est pas vraiment surprenant qu'aucune différence n'ait pu être mise en évidence entre le pollen du colza MON 88302 et celui du comparateur quasi isogénique non GM ou des variétés commerciales de référence non GM.

Pour avoir une mesure représentative de la taille du pollen, l'étude aurait dû être réalisée par exemple avec un compteur de particules de façon à analyser une grande quantité de grains (par exemple (Lau and Stephenson, 1993)). Enfin pour ce qui concerne la morphologie pollinique, une observation plus précise aurait demandé que les grains soient acétolysés (Erdtman, 1952) pour être examinés ensuite au microscope optique ou bien examinés directement en microscopie électronique à balayage (par exemple (Cooper et al., 2000)).

La production de pollen par fleur aurait aussi été un élément important à prendre en compte dans les caractéristiques du colza MON 88302 car cette valeur a un impact direct sur la dispersion du pollen de la plante considérée (Devaux et al., 2008).

Enfin, considérant les revendications du pétitionnaire concernant l'expression du transgène dans le pollen – qui devrait permettre un traitement plus tardif des plantes de colza MON 88302 –, il aurait été intéressant d'avoir une caractérisation des grains de pollen après traitement au glyphosate, la résistance des grains de pollen au glyphosate pouvant être un caractère de persistance supplémentaire dans une population férale de colza GM en zone semi-naturelle traitée au glyphosate, ou dans l'hypothèse où le transgène se serait intégré dans une adventice apparentée au colza (ex. ravenelle).

4. Toxicological assessment

4.2. Assessment of newly expressed proteins

4.2.2 Up-to-date bioinformatic search for homology

L'analyse présentée ne contient pas de renvoi à des références. Le CS du HCB demande que le dossier fasse systématiquement référence aux rapports expérimentaux dont les conclusions sont décrites dans le texte pour permettre aux experts de les évaluer de manière efficace, sans perdre de temps à chercher les rapports en question dans les dédales du dossier.

4.2.3 Information on the stability of the protein under the relevant processing and storage conditions for the food and feed derived from the GM plant

L'analyse présentée concernant l'influence du pH sur la protéine CP4 EPSPS ne contient pas de renvoi explicite à des références expérimentales. Le CS du HCB demande que le dossier fasse systématiquement référence aux rapports expérimentaux dont les conclusions sont décrites dans le texte pour permettre aux experts de les évaluer de manière efficace, sans perdre de temps à chercher les rapports en question dans les dédales du dossier.

4.2.4 Data concerning the resistance of the newly expressed protein to proteolytic enzymes

Le CS du HCB signale à nouveau un problème avec les références du texte, qui ne permet pas de vérifier les affirmations présentées par le pétitionnaire, comme le montrent les exemples ci-dessous :

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 123 :

"When crops are processed for food or feed purposes, they typically encounter conditions such as heating that can denature proteins. However, the nutritional value of the protein is not lost, and evidence suggests that proteins are more rapidly cleaved by digestive proteases in their denatured form than in their native form (Hammond and Fuchs, 1998)."

Ce texte fait référence à un article de synthèse sans données expérimentales (Hammond B., Fuchs R.L., Safety evaluation of new varieties of food crops developed through biotechnology, Biotechnology and safety assessment, 1998, 61-79).

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 123 (suite) :

"Thus it is reasonable to expect that the digestibility of an individual protein will not be substantially reduced due to processing conditions. This hypothesis has been examined using heat treatment (100 °C, 5 minutes) as a surrogate for processing conditions (Alcalde and Camara, 2007). The authors demonstrated that CP4 EPSPS, whether heated as a purified solution or in soybean extract, was readily digested in an SGF assay."

Ce texte supposé traiter de la digestibilité de la protéine CP4 EPSPS fait référence à un article traitant de la culture du maïs Bt en Espagne (Alcalde E., Camara M., 10 years of Bt Maize. The case of Spain, J. Biotechnol., 131, S21-S22, 2007).

4.2.5 Repeated toxicity studies using laboratory animals

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 125:

"Based on the weight of evidence described in this application, consisting of: 1) the history of safe use for the CP4 EPSPS protein and its source organism; 2) the lack of structural or functional relationship of CP4 EPSPS to proteins that adversely affect human or animal health; 3) the low expression level of CP4 EPSPS in seed; 4) the digestibility of CP4 EPSPS in SGF and SIF; 5) the lack of acute toxicity of CP4 EPSPS at doses several orders of magnitude higher than anticipated human exposure; a repeated dose toxicity study for MON 88302 is not necessary to confirm safety."

Le CS du HCB estime qu'il n'est pas justifié d'extrapoler les résultats de toxicité aiguë de la protéine CP4 EPSPS à la plante entière.

4.5. Assessment of the whole food and/or feed derived from GM plants

4.5.1 Design and performance of 90-day feeding study in rodents

Le pétitionnaire argumente qu'une étude de toxicité orale sur 90 jours chez les rongeurs n'est pas nécessaire pour évaluer la toxicité du colza MON 88302 considérant (1) que la composition des graines de colza MON 88302 n'est pas différente de celle de son comparateur quasi isogénique non GM (ce qui n'est pas correct en soi, voir commentaires A.4.6) et que les différences observées (il y en a en effet) s'inscrivent dans la gamme de variabilité naturelle du colza, et (2) que l'innocuité de la protéine CP4 EPSPS a été démontrée.

Le CS du HCB demande qu'une étude de toxicité orale sur 90 jours chez les rongeurs soit réalisée pour évaluer la toxicité des tourteaux de colza MON 88302. L'étude devra être réalisée à partir de colza traité et non traité, le traitement devant être opéré dans les conditions de traitement attendues pour ce colza. Pour le CS du HCB, cette étude est censée mettre en évidence les effets toxiques inattendus du colza MON 88302. Il exige donc cette étude quels que soient les résultats des tests d'équivalence du colza MON 88302 avec les

variétés commerciales non GM de référence et malgré les résultats d'innocuité de la protéine CP4 EPSPS.

4.6. Conclusions

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 125:

“Additionally, a thorough evaluation of the natural constituents of MON 88302 (Section A.3.3) establish that seed composition of MON 88302 is not different to the seed composition of the conventional counterpart.”

Cette affirmation est incorrecte. Des différences statistiquement significatives ont bien été observées entre le colza MON 88302 et son comparateur quasi isogénique non GM. Le pétitionnaire semble faire une confusion entre les résultats d'équivalence entre le MON 88302 et les variétés commerciales non GM de référence (les valeurs observées pour le MON 88302 étant bien incluses dans la gamme de variation de ces variétés de référence), et les résultats de comparaison entre le MON 88302 et son comparateur quasi isogénique non GM.

6. Nutritional assessment

6.3. Conclusions

Ces commentaires s'appliquent également aux sections A.6.1 et A.6.2.

Toutes les affirmations du pétitionnaire indiquant que la composition des graines de MON 88302 n'est pas différente de (ou est équivalente à) celle des graines de son « *conventional counterpart* » sont abusives. Des différences de composition statistiquement significatives ont bien été observées entre les graines de colza MON 88302 et celles de son comparateur quasi isogénique non GM. Le pétitionnaire semble faire une confusion entre les résultats d'équivalence entre le MON 88302 et les variétés commerciales non GM de référence (les valeurs observées pour le MON 88302 étant bien incluses dans la gamme de variation de ces variétés de référence), et les résultats de comparaison entre le MON 88302 et son comparateur quasi isogénique non GM.

Par ailleurs, le CS du HCB demande qu'une étude d'alimentarité soit effectuée pour évaluer l'impact nutritionnel des tourteaux de colza MON 88302 obtenus à partir de plantes traitées au glyphosate dans les conditions correspondant aux revendications du pétitionnaire pour la culture de ce colza, c'est-à-dire à un stade tardif.

E. Environmental risk assessment

2. General approach of the ERA

2.1. Characteristics of oilseed rape (*Brassica napus*) pertinent to this risk assessment

Crop biology and ecology

Il y a des imprécisions sur l'origine et la date de formation de l'espèce de colza (*Brassica napus*) : elle a une origine polyphylétique (Allender and King, 2010; Palmer et al., 1983; Song and Osborn, 1992) et se serait formée soit dans les zones de coexistence de ses progéniteurs comme mentionné, soit dans les jardins (Prakash and Hinata, 1980). Aucune population sauvage n'a été décrite et cette espèce, comme le blé tendre, serait issue de la domestication par l'homme après une hybridation naturelle entre le chou et la navette (Prakash and Hinata, 1980). Ceci explique certainement en partie sa faible compétitivité en milieux naturels, mentionnée dans le document, et le fait que les repousses se développent dans des milieux peu colonisés comme la plupart des Brassicaceae (Colbach et al., 2001a, b).

Plusieurs composantes de la biologie et de l'écologie du colza mériteraient d'être plus approfondies, mieux documentées, et parfois même corrigées dans cette section du dossier, du fait de leur contribution aux caractéristiques de dissémination, persistance et adventicité du colza :

1. Dissémination du pollen

Concernant le pollen, le pétitionnaire ne rapporte que certains articles (il manque par exemple (Lavigne et al., 1998)) mais il omet surtout qu'il existe encore un débat sur les sous-évaluations des disséminations sur de grandes distances (Klein et al., 2006) (voir aussi section suivante) ;

2. Taux d'égrenage des graines

Concernant les graines, les forts taux d'égrenage (100 fois plus que la quantité semée) (www.brassica.fr) ne sont pas signalés et le débat sur la persistance des graines et des repousses qui en résultent n'est pas clos, la survie des graines et de leurs descendances pouvant s'étaler sur plusieurs années (Pessel et al., 2001). Les travaux de modélisation ne sont pas rapportés (Colbach et al., 2001a, b; Fargue et al., 2004; Garnier et al., 2008).

3. Dispersion secondaire des graines, pertes liées au transport de graines

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 142 :

"The seeds have no special or specific adaptations to facilitate widespread dispersal (they are not wind transported and have no structures to allow them to stick to animal fur) and so any shattered seed will remain in close proximity to the site of production. Further dissemination may occur by means of fauna or machinery. Seed dissemination is increased by excessive pod shattering during harvesting, but seed remains in the area where it is shed."

Ce texte manque de précisions et de références bibliographiques. Les graines de colza qui tombent sur les voies de transport, notamment après l'éclatement des siliques des pieds de colza situés en bordure de voies de transport ou suite aux pertes liées à la récolte, peuvent être entraînées le long des voies de transport par le souffle de vent induit par les véhicules. Cet entraînement dit secondaire, c'est-à-dire une fois que les graines sont tombées sur le sol, peut conduire à une dispersion efficace, c'est-à-dire donnant lieu à des descendants viables, jusqu'à plus de 20 m (Garnier et al., 2008).

Pour ce qui est des pertes liées au transport, il faut mentionner les pertes de graines (1) du champ au silo par les bennes de récolte (Bailleul et al., 2012), (2) par les camions de transport (von der Lippe and Kowarik, 2007), mais aussi (3) par les camions et les trains lors de l'arrivée des graines dans les ports et leur transport dans les usines de trituration (Aono et al., 2006; Kawata et al., 2009; Nishizawa et al., 2009; Saji et al., 2005). Tous ces éléments témoignent de la difficulté à maîtriser les flux de graines de colza. Dans les cas (2) et (3), ces événements de perte ont été estimés par la mise en évidence de descendants viables et dans le cas (3), il s'agit de la mise en évidence de plants de colza transgéniques autour de ports de stockage. Il est entendu que seul le cas (3) est concerné par cette application.

4. Considérer les milieux semi-naturels

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 142 :

"In undisturbed habitats, oilseed rape plants show poor survival characteristics; regular disturbance is needed for the establishment of oilseed rape plants from seeds in natural habitats."

"Brassica napus is not generally regarded as an environmentally hazardous, colonizing (EC,2000), or invasive species in undisturbed natural ecosystems (Crawley et al., 2001). [...]"

"Brassica napus has been documented to be present in disturbed areas such as roadsides and railways used for transportation of seed and the margins of fields where it has been previously grown (Aono et al., 2006; Knispel et al., 2008; Nishizawa et al., 2009; Pivard et al., 2008; Saji et al., 2005; Schafer et al., 2011; Tamis and de Jong, 2010)."

La première assertion mériterait d'être accompagnée de références bibliographiques. Par ailleurs, la biodiversité dite sauvage des milieux naturels étant largement interconnectée aux milieux anthropisés dans les paysages européens (Hails, 2002), il paraît plus adapté de considérer la persistance des populations férales de colza dans les milieux avoisinant

les espaces cultivés que dans les milieux dits naturels. Le terme « milieux semi-naturels » où se mêlent biodiversité sauvage et cultivée paraît donc plus adapté sans qu'il soit besoin de séparer ici milieux naturels et milieux perturbés. Dans ces milieux semi-naturels, les perturbations, comme des épisodes de fauche ou de traitement chimique, notamment de glyphosate en France, interviennent assez régulièrement et des populations férales peuvent s'y installer.

5. Populations férales, dormance secondaire et persistance des graines

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 142 :

"However, populations of oilseed rape outside agricultural fields do not effectively compete with perennial vegetation, and usually persist only for a few years in the absence of ongoing seed introductions into areas from spillage during handling and transport or processing (Baker and Preston, 2008; Crawley and Brown, 1995; Crawley and Brown, 2004) (Crawley et al., 1993; Knispel et al., 2008). Most researchers have concluded that ruderal oilseed rape populations are not self-sustaining."

Des études mettent en évidence que des graines de colza peuvent conduire à des descendants dans les milieux semi-naturels. Des populations férales de colza peuvent persister et se maintenir plusieurs années (Pessel et al., 2001; Schafer et al., 2011). Si leur maintien se fait majoritairement via la banque de graines du sol (Pivard et al., 2008a; Pivard et al., 2008b), ces populations peuvent de fait constituer des réservoirs de transgènes. Knispel & Lachlan (2010) concluent que les populations férales tolérantes à un herbicide sont maintenant devenues des composantes permanentes des paysages agricoles de l'Ouest du Canada (Knispel and McLachlan, 2010). Sous pression de sélection (glyphosate), ces populations peuvent augmenter en effectif et contribuer à des flux de gènes dans les champs avoisinants (Squire et al., 2011). La présence de deux transgènes dans des populations présentes dans des ports japonais suggère déjà des flux entre champs de colza et populations férales (Aono et al., 2006).

6. Difficultés à contrôler des repousses de colza

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 142-3 :

"Problems controlling volunteer oilseed rape are not common (Boyles et al., 2009). Volunteers, including volunteers with herbicide-tolerant traits, can be managed with pre-plant or selective post-emergent herbicide applications or by mechanical means (Boyles et al., 2009), (EC, 2000)".

Le contrôle des repousses de colza n'est pas aussi aisé qu'il est indiqué dans le dossier. Dans le document de Boyles et al. (2009) cité dans le dossier, il est indiqué "*Dormant canola is much more difficult to control*" (Boyles et al., 2009). Il s'agit d'un problème important non évoqué sachant que les graines de colza sont susceptibles de survivre une dizaine d'années dans le sol (Gruber et al., 2010). Par ailleurs, la très grande variabilité du cycle de vie des repousses liée à celle des conditions locales (température, eau, agents pathogènes, structure physique du sol, etc.) rend difficile la mise en place de méthodes de contrôle *a priori* (Gruber et al., 2010). Pour finir, les flux de pollen entre différentes variétés tolérantes à un herbicide peuvent conduire à la présence de multi-tolérance chez les repousses (Hall et al., 2000).

Sexual compatibility with other cultivated or wild plant species

Potential for cross-pollination with cultivated oilseed rape varieties

Document principal (*Part II, Scientific information*), p.143 :

"Pollen of B. napus is heavy and sticky (OECD, 1997) and pollen movement is primarily by insects, such as honey bees (Thompson et al., 1999) although wind is also responsible for some pollen movement."

Le pollen de colza n'est pas particulièrement lourd, mais il est vrai qu'il est recouvert de pollenkitt qui le rend collant (Cresswell et al., 2004). Cependant on retrouve du pollen de colza dans l'atmosphère et celui-ci peut participer à la fécondation (Pierre et al., 2010).

Il est dommage que la plupart des références récentes sur la dispersion efficace du pollen de colza manquent au dossier. De ce fait, ce dossier n'est plus à jour pour tout ce qui concerne les distances de dispersion du pollen de colza, les modes de vection du pollen à longue distance responsables de cette dispersion, et l'évaluation des risques qui en découlent (exemple de publications à prendre en compte (Chifflet et al., 2011; Cresswell, 2005; Devaux et al., 2007; Devaux et al., 2005; Hayter and Cresswell, 2006; Hoyle et al., 2007)).

Les résultats issus du projet SIGMEA (2004-2007) sur la dispersion de pollen de colza et d'autres résultats publiés dans la continuité du projet PROSAMO mentionné p. 145 mériteraient d'être inclus dans la bibliographie. Il en ressort notamment qu'une distance maximale de dispersion de pollen (Table 31) apporte moins d'informations que la recherche d'une fonction de dispersion qui permette de prédire les événements de pollinisation croisée à l'échelle d'un territoire. De plus, les travaux cités ici considèrent le taux de pollinisation croisée à partir de protocoles envisageant un seul champ « donneur » alors que la composition du paysage, c'est-à-dire le nombre de champs donneurs dans un paysage, le type de variétés et d'autres variables environnementales peuvent influencer ce taux. Par exemple, Devaux et al. (2008) montrent que les taux de pollinisation croisée varient de 0 % à 0,092 % pour des champs récepteurs situés entre 220 et 2000 m (Devaux et al., 2008) et qu'une fonction de dispersion dite à queue lourde semble la plus appropriée pour prédire ces taux de pollinisation croisée même si cette fonction sous-estime ce taux en dessous de 400 m (Devaux et al., 2008).

Potential for cross-pollination and introgression with other Brassica species

Concernant l'évaluation des flux de gènes du colza vers ses espèces voisines adventices de culture, les conditions de flux devraient être précisées, à savoir : (1) que les espèces poussent dans ou à proximité des champs et qu'elles fleurissent en même temps que le colza donneur de gènes, (2) que des hybrides puissent se former, (3) qu'ils soient fertiles et qu'ils produisent une descendance, (4) que le transgène puisse s'introduire dans le génome et se maintenir dans les populations naturelles. La liste des espèces concernées est alors moins longue et plus spécifique que celle présentée par le pétitionnaire. Le CS du HCB apporte les corrections ou compléments suivants sur la présentation, dans le dossier, des espèces adventices à considérer dans le cadre de flux de gènes de colza.

La principale espèce pour laquelle le flux de gènes a été démontré est clairement la navette (*B. rapa*) mais le pétitionnaire ne signale pas que les introgressions dans le génome de cette adventice sont faciles et fréquentes ; même si les hybrides peuvent être moins fertiles que du colza, la recombinaison permet aisément l'introgression de gènes du colza (ex. (Leflon et al., 2007; Leflon et al., 2010)). On peut noter qu'Ammitzbøll et al. (2005) montrent que les hybrides F1 entre *B. rapa* et *B. napus* dans certains environnements peuvent avoir une fitness reproductrice similaire à ceux de leurs parents (Ammitzbøll et al., 2005). L'estimation de la fréquence des hybrides et leur persistance, qui dépend des génotypes des parents, de l'environnement, et des caractéristiques du transgène, ne peut donc être généralisée à partir des résultats d'une seule étude, comme le présente le dossier du pétitionnaire.

La moutarde brune (*B. juncea*) fait partie des espèces peu pertinentes en tant qu'adventices des cultures mais les sélectionneurs savent bien qu'il est possible que des gènes soient échangés entre les génomes (ex. (Barret et al., 1998)).

Les formes sauvages de choux (*B. oleracea*) ne sont pas des adventices des cultures (Prakash and Hinata, 1980).

La moutarde noire (*B. nigra*), qu'il est possible de trouver dans les champs dans le sud de la France, s'hybride très difficilement avec le colza (ex. (Jahier et al., 1989)).

Potential for cross-pollination and introgression with related species in the family Brassicaceae

La moutarde d'Abyssinie est une espèce qui n'existe pas spontanément en Europe (Prakash and Hinata, 1980). La roquette bâtarde (*Hirschfeldia incana*) peut être trouvée dans les champs de colza ; cette espèce peut effectivement s'hybrider avec le colza mais le génome

de colza semble éliminé dans sa descendance (Chèvre et al., 1996; Darmency and Fleury, 2000).

Les deux principales adventices du colza sont la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*) et la moutarde des champs (*Sinapis arvensis*) (Chèvre et al., 2004). Pour la ravenelle, le pétitionnaire relève à juste titre que l'hybridation est extrêmement rare bien que démontrée au Canada (Warwick et al., 2003), en Australie (Rieger et al., 2001) et en France (Chèvre et al., 2000) à des fréquences similaires de 10^{-5} à 10^{-7} et que les hybrides de première génération sont peu fertiles. En revanche, il omet de signaler qu'au fil des générations de pollinisation par la ravenelle, les plantes retrouvent une fertilité (Chèvre et al., 1997), même si aucune publication ne fait état pour l'instant d'introggression dans le génome de la ravenelle. Pour la moutarde des champs, l'hybridation est effectivement rare et leurs descendances n'ont pu être étudiées (Chèvre et al., 1996; Warwick et al., 2003).

Les autres espèces mentionnées présentent effectivement une probabilité quasi nulle de flux de gènes (Chèvre et al., 2004).

2.2. Identification of potential hazards from molecular characterization and comparative assessment

2.2.3 Phenotypic/Agronomic characterisation:

Les affirmations d'absence de différences du colza MON 88302 avec son comparateur conventionnel en termes d'adventicité et de capacité à proliférer sont à reconsidérer dans des conditions de traitement au glyphosate.

De plus, les caractéristiques du pollen et de la dormance des graines sont à réexaminer avec des méthodologies expérimentales et statistiques adéquates (voir commentaires A.3.4.4 et A.3.4.5). La dormance secondaire n'a pas été évaluée.

Les conclusions concernant les autres caractéristiques agronomiques et phénotypiques évaluées sont à tempérer, notamment concernant le nombre de jours avant floraison (voir commentaires A.3.4.2)

2.4. Exposure characterization

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 151:

“Since quantifying exposure due to these routes of exposure is not feasible, a qualitative approach has been followed.”

Pourquoi l'exposition de l'environnement au colza MON 88302 serait-elle impossible à quantifier? Le pétitionnaire pourrait estimer cette exposition de manière plus fine en obtenant des Etats membres des informations précises sur la localisation des centres de stockage de graines et des usines de trituration par rapport aux ports d'importation, sur les voies d'importation empruntées et les moyens de transport utilisés pour acheminer les graines de colza.

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 151 :

“Indeed, the containment systems used to transport and handle oilseed rape for direct use or processing are characterized by highly reduced interactions with the environment. Oilseed rape is normally held, transported and handled in a confined manner that restricts the potential for release into the local environment. In practice, the oilseed rape will mostly be confined to fixed locations (seaports, grain elevators and processing facilities) and enclosed to minimize or prevent spillage (transport vehicles including trucks and railroad cars). Under such conditions, oilseed rape is significantly limited in its entry into the environment, and therefore environmental exposure is low.”

Cette description générale sans référence pourrait-elle être caractérisée par des données concrètes?

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 151 :

“Some incidental spillage of oilseed rape may occur during import, handling, storage and processing of oilseed rape. However, modern methods of grain handling minimize such losses. Furthermore, the locations of spillage will be predictable, since they will be near the storage facilities and along transportation routes. Environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of oilseed rape destined for food and feed use.

“Thus, the exposure of organisms in the environment to the import of MON 88302 in the EU would be negligible.”

Il est difficile d'estimer l'ampleur du potentiel de dissémination et de persistance de ce colza et les conséquences associées sans avoir précisément localiser ces zones potentielles de dissémination le long des voies d'importation, c'est-à-dire sans avoir localiser les centres de stockage et usines de trituration des graines par rapport aux ports d'arrivée de ces graines, et sans connaître les moyens de transport précis et les routes précises qu'emprunteront les graines de colza GM. On peut d'ailleurs noter que l'affirmation *“Environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of oilseed rape destined for food and feed use”* est modérée en page 154 : *“In many cases, environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of oilseed rape destined for food and feed use.”*

Le pétitionnaire devrait donc se procurer ces données précises pour évaluer de manière quantitative les risques de dissémination en connaissance de cause au lieu de proposer des prédictions globales pour toute l'Union européenne sans justification basée sur des données concrètes.

On peut noter que la présence de populations férales de colza à proximité de ports japonais (Aono et al., 2006; Kawata et al., 2009; Nishizawa et al., 2009; Saji et al., 2005) traduit les pertes de graines par les camions et les trains lors de l'arrivée des graines dans les ports et leur transport dans les usines de trituration. La présence de deux transgènes dans des populations présentes dans des ports japonais pourrait résulter de flux entre champs de colza et populations férales (Aono et al., 2006).

3. Specific areas of risk

3.1. Persistence and invasiveness including plant-to-plant gene flow

3.1.1 Step 1: Problem formulation

L'approche par étape préconisée par les lignes directrices de l'AESA (p. 40-48 (EFSA, 2010a)) est réalisée dans ce dossier sans prendre en compte la pression de sélection exercée par l'application d'herbicide à base de glyphosate (Appendix 5). Du coup, l'évaluation est stoppée au stade 3. Comme préconisé dans les recommandations de l'AESA pour une PGM montrant une fitness améliorée comparée à ses comparateurs non GM (EFSA, 2010a), l'évaluation devrait procéder jusqu'au stade 4, pour prendre en compte les zones traitées au glyphosate.

En France, le glyphosate est l'herbicide foliaire le plus utilisé en zones non agricoles, où il représente 30 à 40 % des applications d'herbicides (informations obtenues auprès d'experts du Ministère de l'Agriculture). Environ le tiers des tonnages d'herbicides à base de glyphosate vendus en France est utilisé en zones non agricoles (Source BNVD, Banque nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques par les distributeurs).

3.1.2 Step 2: Hazard characterisation

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 155 :

“In many cases, environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of oilseed rape destined for food and feed use. For example, processing facilities may have no or poor soil conditions, or routine roadside

maintenance (mowing or other vegetation control measures), and MON 88302, like any other oilseed rape, is unlikely to effectively compete with perennial vegetation outside agricultural fields (Section E.2.1). As described above in Section E.2.1, the likelihood for spilt seed to survive and establish is negligible.”

Les populations férales de colza au Japon (Aono et al., 2006; Kawata et al., 2009; Nishizawa et al., 2009; Saji et al., 2005) ou dernièrement les populations de colza GT73 détectées en Suisse en mai 2012 se situent dans des zones dégagées où la végétation a déjà été éliminée par l'adjonction d'herbicides. Ces populations produisent des plants fleuris susceptibles de produire du pollen et des graines.

3.2. Plant to micro-organisms gene transfer

3.2.6 Step 6: Conclusions

Citation du document *Part VII, summary of application*, p. 15 :

“None of the genetic elements inserted in MON 88302 has a genetic transfer function. Therefore, no changes are expected in the ability of this oilseed rape to transfer genetic material to bacteria.”

Ce dossier est une demande d'autorisation pour l'importation, la transformation et l'utilisation du colza MON 88302 comme tout autre colza dans l'Union européenne, à l'exception de la culture. En théorie, les risques environnementaux, notamment un impact sur la microflore tellurique, sont négligeables car limités aux seules repousses suite à un échappement accidentel de matériel végétal lors du transport.

Il est cependant inexact d'affirmer comme le fait le pétitionnaire que cette plante transgénique n'a aucune possibilité de transférer du matériel génétique à des bactéries. 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 bactéries naturellement transformables utilisées comme réceptrices, principalement *Acinetobacter baylii* (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008).

Cette possibilité de transfert de l'ADN du transgène est liée à la présence de séquences procaryotiques dans ces transgènes. Ces séquences 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. Signalons qu'en théorie les autres séquences typiquement végétales des génomes des plantes GM pourraient également être intégrées dans les génomes bactériens par recombinaison illégitime mais à des fréquences extrêmement faibles. De plus, de telles séquences constituant un fardeau génétique pour la bactérie puisque ne pouvant s'y exprimer ne sont pas fixées dans ces génomes comme le montre l'analyse des séquences des génomes bactériens dans lesquelles très peu de séquences d'origine végétale sont détectées.

Le colza MON 88302 contient une copie de la cassette EPSPS, composée du gène *cp4 epsps*, provenant de la souche CP4 d'*Agrobacterium tumefaciens* codant une protéine CP4 EPSPS insensible à l'inhibition par le glyphosate de façon à conférer aux plantes une tolérance au glyphosate. Le gène *cp4 epsps* peut donc constituer une zone d'amorçage de la recombinaison sur les génomes d'*Agrobacterium tumefaciens* qui sont des bactéries ubiquistes des sols mais également avec d'autres bactéries car ce gène est commun chez les bactéries. Du fait d'une baisse de la similarité de séquence au fur et à mesure que seront concernées des bactéries de plus en plus éloignées phylétiquement d'*Agrobacterium tumefaciens* la fréquence d'intégration diminuera. Toutefois, les conséquences d'un tel transfert seraient totalement négligeables, revenant à échanger une copie sauvage du gène de la bactérie par celle de la plante, modifiée de plus pour une expression en systèmes eucaryotes.

Rappelons enfin que de tels événements de transfert de gènes, qu'ils concernent les séquences des transgènes ou les régions flanquantes, n'ont jamais été observés au champ (Demanèche et al., 2008).

Les risques de transfert du transgène de ce colza génétiquement modifié MON 88302 aux bactéries de l'environnement tellurique, si une telle plante venait accidentellement à se développer sur le territoire national, sont donc extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, totalement négligeables pour la santé humaine ou animale et pour l'environnement.

4. Post Market Environmental Monitoring plan

Le CS du HCB demande au pétitionnaire de proposer (1) des mesures précises pour minimiser le risque avéré de dissémination fortuite de graines de colza entre les ports d'arrivée et les usines de trituration, (2) des mesures de surveillance pour détecter les repousses de colza MON 88302, et (3) des mesures pour les détruire si elles sont détectées. Le CS du HCB recommande une étroite collaboration du pétitionnaire avec les autorités compétentes nationales et les acteurs locaux pour que ces mesures soient définies de manière circonstancielle, en prenant en compte les spécificités du pays d'importation.

Le CS du HCB demande que la surveillance des repousses de colza soit poursuivie au-delà de la période d'autorisation d'importation.

3. Bibliographie

Alexander, M.P. (1980). A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol* 55, 13-18.

Allender, C.J., and King, G.J. (2010). Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biol* 10, 9.

Ammitzbøll, H.A., Mikkelsen, T., and Jørgensen, R.B. (2005). Environmental effects of transgene expression on hybrid fitness - a case study on oilseed rape. *Environ Biosafety Res* 4, 3-12.

Aono, M., Seiji, W., Masato, N., Nobuyoshi, N., Masanori, T., Akihiro, K., and Hikaru, S. (2006). Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environ Biosafety Res* 5, 77-87.

Bailleul, D., Ollier, S., Huet, S., Gardarin, A., and Lecomte, J. (2012). Seed spillage from grain trailers on road verges during oilseed rape harvest: an experimental survey. *PLoS One* 7, 7.

Barret, P., Guerif, J., Reynoird, J.P., Delourme, R., Eber, F., Renard, M., and Chevre, A.M. (1998). Selection of stable *Brassica napus* *Brassica juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 2. A 'to and fro' strategy to localise and characterise interspecific introgressions on the *B-napus* genome. *Theor Appl Genet* 96, 1097-1103.

Barrow, J.R. (1983). Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton. *Crop Sci* 23, 734-736.

Bommarco, R., Marini, L., and Vaissière, B.E. (2012). Insect pollination enhances seed yield, quality, and market value in oilseed rape. *Oecologia*, 1-8.

Boyles, M., Peeper, T., and Stamm, M. (2009). Great Plains Canola Production Handbook. (Kansas State University).

Chèvre, A.M., Ammitzbøll, H.A., Breckling, B., Dietz-Pfeilstetter, A., Eber, F., Fargue, A., Gomez-Campo, C., Jenczewski, E., Jørgensen, R., Lavigne, C., *et al.* (2004). A review on interspecific gene flow from oilseed rape to wild relatives. In: *Introgression from Genetically Modified Plants into wild relatives*. Edts H.C.M. . In *Introgression from Genetically Modified Plants into wild relatives*, H.C.M. den Nijs, D. Bartsch, and J. Sweet, eds. (Cambridge, CABI Publishing), pp. 235-251.

- Chèvre, A.M., Eber, F., Baranger, A., Kerlan, M.C., Barret, P., Vallée, P., and Renard, M. (1996). Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic Brassicas. Ninth Crucifer genetic workshop. ISHS. *Acta Horticultrae* 407, 167-179.
- Chèvre, A.M., Eber, F., Baranger, A., and Renard, M. (1997). Gene flow from transgenic crops. *Nature* 389, 924-924.
- Chèvre, A.M., Eber, F., Darmency, H., Fleury, A., Picault, H., Letanneur, J.C., and Renard, M. (2000). Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor Appl Genet* 100, 1233-1239.
- Chifflet, R., Klein, E.K., Lavigne, C., Le Féon, V., Ricroch, A.E., J., L., and Vaissière, B.E. (2011). Spatial scale of insect-mediated pollen dispersal in oilseed rape in an open agricultural landscape. *J Appl Ecol* 48, 689-696.
- Colbach, N., Clermont-Dauphin, C., and Meynard, J.M. (2001a). GeneSys: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers - I. Temporal evolution of a population of rapeseed volunteers in a field. *Agric Ecosyst Environ* 83, 235-253.
- Colbach, N., Clermont-Dauphin, C., and Meynard, J.M. (2001b). GeneSys: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers - II. Genetic exchanges among volunteer and cropped populations in a small region. *Agric Ecosyst Environ* 83, 255-270.
- Cooper, R.L., Osborn, J.M., and Philbrick, C.T. (2000). Comparative pollen morphology and ultrastructure of the Callitrichaceae. *Am J Bot* 87, 161-175.
- Cresswell, J.E. (2005). Accurate theoretical prediction of pollinator-mediated gene dispersal. *Ecology* 86, 574-578.
- Cresswell, J.E., Davies, T.W., Patrick, M.A., Russell, F., Pennel, C., Vicot, M., and Lahoubi, M. (2004). Aerodynamics of wind pollination in a zoophilous flower, *Brassica napus*. *Funct Ecol* 18, 861-866.
- Darmency, H., and Fleury, A. (2000). Mating system in *Hirschfeldia incana* and hybridization to oilseed rape. *Weed Res* 40, 231-238.
- Demanèche, S., Sanguin, H., Pote, 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.
- Devaux, C., Klein, E.K., Lavigne, C., Sausse, C., and Messean, A. (2008). Environmental and landscape effects on cross-pollination rates observed at long distance among French oilseed rape *Brassica napus* commercial fields. *J Appl Ecol* 45, 803-812.
- Devaux, C., Lavigne, C., Austerlitz, F., and Klein, E.K. (2007). Modelling and estimating pollen movement in oilseed rape (*Brassica napus*) at the landscape scale using genetic markers. *Mol Ecol* 16, 487-499.
- Devaux, C., Lavigne, C., Falentin-Guyomarc'h, H., Vautrin, S., Lecomte, J., and Klein, E.K. (2005). High diversity of oilseed rape pollen clouds over an agro-ecosystem indicates long-distance dispersal. *Mol Ecol* 14, 2269-2280.
- EC (2003). Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union L268*, 1-23.
- EFSA (2010a). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *The EFSA Journal* 8(11):1879, 111 pp.
- EFSA (2010b). 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 the submission of applications for authorisation of genetically modified food and feed and genetically modified plants for food or feed uses under Regulation (EC) No 1829/2003. *The EFSA Journal* 9(7): 2311, 27 pp.
- EFSA (2011b). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance document on selection of comparators for the risk assessment of GM plants. *The EFSA Journal* 9(5):2149, 21 pp.
- EFSA (2011c). Scientific opinion on guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *The EFSA Journal* 9 (5): 2150, 37 pp.
- Erdtman, G. (1952). Pollen morphology and plant taxonomy. In *Angiosperms* (Stockholm, Almquist & Wiksell), p. 539.
- Fargue, A., Meynard, J.M., Colbach, N., Vallee, P., Grandeau, G., and Renard, M. (2004). Contamination of rapeseed harvest by volunteers of other varieties: a study of intergenotypic competition. *Eur J Agron* 21, 193-207.
- Garnier, A., Pivard, S., and Lecomte, J. (2008). Measuring and modelling anthropogenic secondary seed dispersal along roadverges for feral oilseed rape. *Basic Appl Ecol* 9, 533-541.
- Gebhard, F., and Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 1550-1554.
- Gruber, S., Buhler, A., Mohring, J., and Claupein, W. (2010). Sleepers in the soil — vertical distribution by tillage and long-term survival of oilseed rape seeds compared with plastic pellets. *Eur J Agron* 33, 81-88.
- Gruber, S., Pekrun, C., and Claupein, W. (2004). Seed persistence of oilseed rape (*Brassica napus*): variation in transgenic and conventionally bred cultivars. *J Agric Sci* 142, 29-40.
- Gulden, R.H., Thomas, A.G., and Shirtliffe, S.J. (2004). Secondary dormancy, temperature, and burial depth regulate seedbank dynamics in canola. *Weed Sci* 52, 382-388.
- Hails, R.S. (2002). Assessing the risks associated with new agricultural practices. *Nature* 418, 685-688.
- Hall, L., Topinka, K., Huffman, J., Davis, L., and Good, A. (2000). Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B-napus* volunteers. *Weed Sci* 48, 688-694.
- Hayter, K.E., and Cresswell, J.E. (2006). The influence of pollinator abundance on the dynamics and efficiency of pollination in agricultural *Brassica napus*: implications for landscape-scale gene dispersal. *J Appl Ecol* 43, 1196-1202.
- Heslop-Harrison, J., and Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence - intracellular hydrolysis of fluoresceine diacetate. *Stain Technol* 45, 115-120.
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., and Shivanna, K.R. (1984). The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor Appl Genet* 67, 367-375.
- Hoyle, M., Hayter, K., and Cresswell, J.E. (2007). Effect of pollinator abundance on self-fertilization and gene flow: Application to GM canola. *Ecol Appl* 17, 2123-2135.
- Jahier, J., Chevre, A.M., Tanguy, A.M., and Eber, F. (1989). Extraction of disomic addition lines *Brassica napus* - *B.nigra*. *Genome* 32, 408-413.
- Kawata, M., Murakami, K., and Ishikawa, T. (2009). Dispersal and persistence of genetically modified oilseed rape around Japanese harbors. *Environ Sci Pollut Res* 16, 120-126.
- 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.
- Klein, E.K., Lavigne, C., Picault, H., Renard, M., and Gouyon, P.H. (2006). Pollen dispersal of oilseed rape: estimation of the dispersal function and effects of field dimension. *J Appl Ecol* 43, 141-151.

- Knispel, A.L., and McLachlan, S.M. (2010). Landscape-scale distribution and persistence of genetically modified oilseed rape (*Brassica napus*) in Manitoba, Canada. *Environ Sci Pollut Res* 17, 13-25.
- Lau, T.C., and Stephenson, A.G. (1993). Effects of soil nitrogen on pollen production, pollen grain size, and pollen performance in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Am J Bot* 80, 763-768.
- Lavigne, C., Klein, E.K., Vallee, P., Pierre, J., Godelle, B., and Renard, M. (1998). A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theor Appl Genet* 96, 886-896.
- Leflon, M., Brun, H., Eber, F., Delourme, R., Lucas, M.O., Vallee, P., Ermel, M., Balesdent, M.H., and Chevre, A.M. (2007). Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theor Appl Genet* 115, 897-906.
- Leflon, M., Grandont, L., Eber, F., Huteau, V., Coriton, O., Chelysheva, L., Jenczewski, E., and Chevre, A.M. (2010). Crossovers get a boost in Brassica allotriploid and allotetraploid hybrids. *Plant Cell* 22, 2253-2264.
- McPherson, M. (2010a). Dormancy and germination evaluation of glyphosate tolerant canola MON 88302 using seed produced in the U.S. during 2009. In Monsanto Technical Report, MSL0022876, pp. 1-34.
- McPherson, M. (2010b). Pollen viability and morphology evaluation of glyphosate tolerant canola MON 88302 produced in a growth chamber. In Monsanto Technical Report, MSL0022878, pp. 1-34.
- McPherson, M. (2011). Dormancy and germination evaluation of canola MON 88302 using seed produced at a USA site. In Monsanto Technical Report, RAR-2011-0058, pp. 1-12.
- McPherson, M., and Ahmad, A. (2012). Phenotypic evaluation and environmental interactions of glyphosate-tolerant canola MON88302 when treated and untreated with glyphosate in North America (Canada and U.S.) in 2009 and Chile in 2009/2010 field trials. In Monsanto Technical Report, MSL0023777, pp. 1-81.
- Mesquida, J., Renard, M., and Mesquida, B. (1987). Etude préliminaire sur la germination *in vitro* du pollen de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) et sur l'évolution dans le temps de son aptitude à germer. *Agronomie* 7, 409-416.
- Nishizawa, T., Nobuyoshi, N., Mitsuko, A., Masanori, T., Akihiro, K., and Hikaru, S. (2009). Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. *Environ Biosafety Res* 8, 33-44.
- Palmer, J.D., Shields, C.R., Cohen, D.B., and Orton, T.J. (1983). Chloroplast DNA evolution and the origin of Amphidiploid Brassica species. *Theor Appl Genet* 65, 181-189.
- Parfitt, D.E., and Ganeshan, S. (1989). Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. *HortScience* 24, 354-356.
- Pessel, F.D., Lecomte, J., Emeriau, V., Krouti, M., Messean, A., and Gouyon, P.H. (2001). Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theor Appl Genet* 102, 841-846.
- Pierre, J., Vaissière, B., Vallee, P., and Renard, M. (2010). Efficiency of airborne pollen released by honeybee foraging on pollination in oilseed rape: a wind insect-assisted pollination. *Apidologie* 41, 109-115.
- Pivard, S., Adamczyk, K., Lecomte, J., Lavigne, C., Bouvier, A., Deville, A., Gouyon, P.H., and Huet, S. (2008a). Where do the feral oilseed rape populations come from? A large-scale study of their possible origin in a farmland area. *J Appl Ecol* 45, 476-485.
- Pivard, S., Demsar, D., Lecomte, J., Debeljak, M., and Dzeroski, S. (2008b). Characterizing the presence of oilseed rape feral populations on field margins using machine learning. *Ecol Model* 212, 147-154.

- 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.
- Prakash, S., and Hinata, K. (1980). Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review. *Opera Bot* 55, 1-57.
- Rieger, M.A., Potter, T.D., Preston, C., and Powles, S.B. (2001). Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor Appl Genet* 103, 555-560.
- 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.
- Saji, H., Nobuyoshi, N., Mitsuko, A., Masanori, T., Akihiro, K., Seiji, W., Yoriko, H., and Masato, N. (2005). Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ Biosafety Res* 4, 217-222.
- Schafer, M.G., Ross, A.A., Londo, J.P., Burdick, C.A., Lee, E.H., Travers, S.E., Van de Water, P.K., and Sagers, C.L. (2011). The establishment of genetically engineered canola populations in the US. *PLoS One* 6, 4.
- Song, K., and Osborn, T.C. (1992). Polyphyletic origins of *Brassica napus* - New evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome* 35, 992-1001.
- Squire, G.R., Breckling, B., Pfeilstetter, A.D., Jorgensen, R.B., Lecomte, J., Pivard, S., Reuter, H., and Young, M.W. (2011). Status of feral oilseed rape in Europe: its minor role as a GM impurity and its potential as a reservoir of transgene persistence. *Environ Sci Pollut Res* 18, 111-115.
- Vaissière, B.E., Malaboëuf, F., and Rodet, G. (1996). Viability of cantaloupe pollen carried by honeybees *Apis mellifera* varies with foraging behavior. *Naturwissenschaften* 83, 84-86.
- von der Lippe, M., and Kowarik, I. (2007). Crop seed spillage along roads: a factor of uncertainty in the containment of GMO. *Ecography* 30, 483-490.
- Warwick, S.I., Simard, M.J., Legere, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Seguin-Swartz, G., and Stewart, C.N. (2003). Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theor Appl Genet* 107, 528-539.
- Weber, E.A., Frick, K., Gruber, S., and Claupein, W. (2010). Research and development towards a laboratory method for testing the genotypic predisposition of oilseed rape (*Brassica napus* L.) to secondary dormancy. *Seed Science and Technology* 38, 298-310.

Annexe 1 : Saisine



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE,
DE LA RURALITÉ ET DE L'AMÉNAGEMENT DU TERRITOIRE

Direction générale de
l'alimentation

Service de la prévention
des risques sanitaires de
la 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

Courrier reçu le
20 AVR. 2012

Monsieur Jean-François DHAINAUT
Président du Haut conseil des
biotechnologies
à l'attention de Monsieur Hamid Ouahioune
3 place de Fontenoy
75007 PARIS

18 AVR. 2012

Paris, le

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

Références : 120411-saisine HCB- dossier 2011-101

Affaire suivie par : Anne Grevet

tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49
courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

Monsieur le Président,

Dans le cadre du règlement 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 (AESAs). Lorsqu'un dossier est considéré comme valide par l'AESA, le
dossier est mis à disposition des États membres qui disposent de 3 mois pour faire
des commentaires.

Le dossier suivant a été déclaré valide par l'AESA et est soumis à
consultation des États membres :

- dossier **EFSA-GMO-BE-2011-101**, concernant la mise sur le marché du
colza génétiquement modifié **MON83302** pour l'importation, la
transformation, l'alimentation humaine et animale.

Les États membres peuvent transmettre leurs commentaires à l'AESA
jusqu'au 12 juillet 2012.

Dans cette perspective, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente
saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ce dossier afin de proposer
des commentaires à transmettre à l'AESA au plus tard **le 9 juillet 2012**.

J'appelle votre attention sur le fait que le dossier contient des informations
que le pétitionnaire souhaite maintenir confidentielles.

Je vous prie de croire, Monsieur le Président, à l'assurance de ma
considération distinguée.

L'adjoint au sous-directeur de la qualité
et de la protection des végétaux

JOËL FRANCART

Annexe 2 : 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 : Claude Bagnis, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, François-Christophe Coléno, Denis Couvet, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Marion Desquilbet, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperschmitt, Nathalie Eychenne, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Didier Lereclus, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Nicolas Munier-Jolain, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Annie Sasco, Pascal Simonet, Virginie Tournay, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

Participant à l'élaboration de l'avis de l'AESA en tant que membre du panel OGM 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 l'élaboration de ces commentaires.

Un expert extérieur, Anne-Marie Chèvre, de l'INRA, a été consulté pour compléter l'expertise du CS. Mme Chèvre a signé un engagement de confidentialité, et a certifié ne pas avoir de conflits d'intérêts après avoir pris connaissance du dossier. Elle a révisé le dossier concernant son domaine d'expertise, et a été auditionnée par le CS. Elle n'a toutefois pas contribué directement à l'élaboration de l'avis du CS, qui reste de la responsabilité de ses membres.

La participation à l'élaboration des commentaires n'implique pas que l'avis adopté ait reçu l'assentiment plein et entier de tous les participants mais indique qu'une majorité s'est dégagée en sa faveur, dans la limite des compétences des experts et après exposé de l'ensemble des points de vue.

Annexe 3 : Commentaires traduits en anglais à destination de l'EFSA

Cette annexe est une compilation des commentaires du HCB sur le dossier EFSA-GMO-BE-2011-101 traduits en anglais à destination de l'AESA, prêts à être postés en ligne de manière indépendante par section dans les formulaires du site de l'AESA.

A3.1. General comments

Key comments

1. The HCB Scientific Committee requests that a repeated-dose 90-day rodent feeding study be conducted to assess the toxicity of oilseed rape MON 88302 meal. This study must take appropriate comparators for a herbicide-tolerant GM plant. Herbicide treatments must be carried out under anticipated treatment conditions for oilseed rape MON 88302 crops.
2. The HCB Scientific Committee requests that a nutritional study be conducted to assess the nutritional impact of oilseed rape MON 88302 meal under the conditions specified above.
3. The HCB Scientific Committee requests the applicant to complete the risk assessment with regard to formation of feral populations of oilseed rape MON 88302 in semi-natural environments, their persistence in conditions where realistic allowance is made for potential glyphosate-based herbicide application, and the likelihood and consequences for the agro-ecosystem of a transfer to cultivated varieties of oilseed rape or related weed species of a transgene conferring glyphosate tolerance.
4. The HCB Scientific Committee asks the applicant to propose (1) specific measures to mitigate the known risk of unintended dispersal of oilseed rape seed between ports of entry and crushing plants, (2) monitoring measures to detect oilseed rape MON 88302 volunteers, and (3) measures to destroy them if detected. The HCB Scientific Committee recommends that the applicant collaborate closely with national competent authorities and local stakeholders to ensure that these measures fit the circumstances, taking into account the specific features of the importing country.

Other significant comments

1. The HCB Scientific Committee considers unsatisfactory the conditions in which the comparative assessments were conducted:
 - Glyphosate-treated oilseed rape MON 88302 seems to have been compared with untreated comparators; in fact the dossier provides no information on treatment of comparators. EFSA guidance is specific regarding the materials to be included in comparisons involving a herbicide-tolerant GM plant: GM plants exposed to the intended herbicide, their comparator treated with a conventional herbicide regime, and GM plants subject to the same conventional regime (EFSA, 2010a, b, 2011b, c). If these recommendations are not followed, as is the case in this dossier, the HCB Scientific Committee requests that the applicant at least take into account the specific nature of the experimental conditions of the comparative assessment when analysing their results;
 - The glyphosate treatment of oilseed rape MON 88302 occurred at a relatively early stage, thus not permitting evaluation of the consequences of the late treatment allowed by the characteristics claimed for this genetic modification by the applicant.
2. As regards the quality of statistical analysis, the equivalence and difference tests generally follow EFSA guidance (EFSA, 2010b), except in the case of certain characteristics (such as pollen morphology and viability, and seed dormancy and germination) for which statistical analysis should be revised. However, the HCB Scientific Committee regrets the systematic absence of power analysis and data transformation.

The HCB Scientific Committee requests that a power analysis or else the in-depth consideration suggested by EFSA as an alternative (EFSA, 2010b) be provided by the applicant for all difference tests. As recommended by EFSA (EFSA, 2010b), data transformation may also be necessary in order not to risk discarding data wrongly considered to be outliers.

3. Pursuant to EFSA guidance on traits for which non-equivalence between the GMP and non-GM reference varieties has been demonstrated (EFSA, 2010b), the HCB Scientific Committee would like the applicant to undertake a more detailed examination of the marked characteristic of later flowering in oilseed rape MON 88302.
4. The HCB Scientific Committee draws attention to the unsuitability of the experimental methodologies employed to assess pollen morphology and viability and seed dormancy and germination. Appropriate methods should be used to assess these characteristics properly.
5. The HCB Scientific Committee recommends the following additional assessments: pollen production, duration of flowering, *cp4 epsps* expression and protein functionality in pollen, the modification's impact on pollinating insects, and secondary dormancy of seeds, allowing more accurate characterisation of the seed persistence and weediness of oilseed rape MON 88302.
6. The HCB Scientific Committee regrets that the necessary references to experimental reports and relevant papers are not always inserted at the appropriate points in the main text, making examination of the dossier much more time-consuming for experts.
7. Lastly, some members of the HCB Scientific Committee point out that a broader study would be desirable concerning the consequences for Europe of oilseed rape MON 88302 cultivation in exporting third-countries, not only in socio-economic terms but also with regard to biodiversity. Similarly, another study might consider how the import of certain products influences choice of crops in Europe and therefore the biodiversity resulting from these agrosystem choices.

EFSA (2010a). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. The EFSA Journal *8(11):1879*, 111 pp.

EFSA (2010b). 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 (2011b). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance document on selection of comparators for the risk assessment of GM plants. The EFSA Journal *9(5):2149*, 21 pp.

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

A3.2. Comments per section

A. Hazard identification and characterisation

2. Molecular characterisation

2.2. Information relating to the GM plant

2.2.1 General description of the trait(s) and characteristics which have been introduced or modified

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 29:

'Monsanto Company has developed a second-generation glyphosate-tolerant oilseed rape product, MON 88302, designed to provide growers with improved weed control through tolerance to higher rates of glyphosate and greater flexibility for glyphosate herbicide application.

[...]

'MON 88302 utilizes a FMV/Tsf1 chimeric promoter sequence to drive CP4 EPSPS expression in different plant tissues including pollen. By virtue of CP4 EPSPS expression in pollen, MON 88302 provides tolerance to glyphosate during the sensitive reproductive stages of growth, and enables the application of glyphosate at higher rates up to first flower with no detectable impact to male fertility.'

The dossier contains no information on CP4 EPSPS protein expression in tissues other than seed (A.2.2.3, p. 54). Such information would allow the above description by the applicant to be verified. If the CP4 EPSPS protein is expressed in pollen and allows late application of glyphosate-based herbicides, this information ought to be included in the dossier to complement the (1) assessment of risks to human and animal health associated with consumption of products derived from oilseed rape MON 88302 treated with glyphosate at a late stage, and (2) assessment of risks to agrosystems and the environment associated with accidental release of oilseed rape MON 88302 seed through import routes.

2.2.3 Information on the expression of the inserted/modified sequence

CP4 EPSPS protein expression has been analysed only in seed. The applicant justifies this choice by the scope of this application to place oilseed rape MON 88302 on the market:

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 54:

'The scope of this application covers the import, processing and all uses of MON 88302 (excluding cultivation). Therefore, protein expression data related to the seed produced by MON 88302 is considered the most relevant [...].'

Yet, according to the applicant's description, oilseed rape MON 88302 has the specific feature of expressing the protein in many plant tissues as well as in pollen, which allows late application of glyphosate-based herbicides. It seems important to examine this information with regard to (1) assessment of risks to human and animal health associated with consumption of products derived from oilseed rape MON 88302 treated with glyphosate at a late stage, and (2) assessment of risks to agrosystems and the environment associated with accidental release of oilseed rape MON 88302 seed.

3. Comparative assessment

3.2. Field trials: experimental design and statistical analysis

3.2.1 Experimental design

While the choice of non-GM comparators for the comparative assessment of oilseed rape MON 88302 is acceptable, the trial cited in the main text and described in the relevant appendix (McPherson and Ahmad, 2012) fails to indicate whether these comparators received herbicide treatment when being compared with glyphosate-treated oilseed rape MON 88302. The only mention of glyphosate treatment is for oilseed rape MON 88302.

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 65:

'Glyphosate was applied to predetermined plots of glyphosate-treated MON 88302 at each site.'

The comparative assessment results involving glyphosate-treated oilseed rape MON 88302 are no more specific about any herbicide treatment of these plants (see A.3.3). In the absence of this information, the dossier implies that all comparative assessments for glyphosate-treated oilseed rape MON 88302 were carried out with untreated comparators. Any differences observed could therefore be attributed as much to the herbicide treatment as to the genetic modification of MON 88302 treated with herbicide.

Four EFSA guidance documents – on risk assessment of food and feed from GM plants (EFSA, 2011c), environmental risk assessment of GM plants (EFSA, 2010a), statistical considerations for the safety evaluation of GMOs (EFSA, 2010b), and selection of comparators for the risk assessment of GM plants and derived food and feed (EFSA, 2011b) – systematically recommend that comparative assessment of herbicide-tolerant GM plants cover three test materials: GM plants exposed to the intended herbicide, the comparator treated with a conventional herbicide regime, and GM plants subjected to the same conventional herbicide regime.

Although glyphosate-based herbicide treatment is indeed taken into account in the comparative assessment for oilseed rape MON 88302, this is done in such a way that it is impossible to dissociate the effects of genetic modification in the treated plant from the effects of herbicide treatment alone. Any differences observed using this experimental design must be assessed with full knowledge of the facts.

Moreover, considering one characteristic claimed for oilseed rape MON 88302 by the applicant, namely that this oilseed rape can be treated at a late stage – right up to first flowering –, the test materials ought to have allowed testing of the impact of late treatment. Yet glyphosate was applied at the 4 to 5 true leaf growth stage in the field trials that were used for all the comparative assessments relating to oilseed rape MON 88302 in the dossier (confidential information (McPherson and Ahmad, 2012)).

EFSA (2010a). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. The EFSA Journal *8(11):1879*, 111 pp.

EFSA (2010b). 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 (2011b). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance document on selection of comparators for the risk assessment of GM plants. The EFSA Journal *9(5):2149*, 21 pp.

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

McPherson, M., and Ahmad, A. (2012). Phenotypic evaluation and environmental interactions of glyphosate-tolerant canola MON88302 when treated and untreated with glyphosate in North America (Canada and U.S.) in 2009 and Chile in 2009/2010 field trials. In Monsanto Technical Report, MSL0023777, pp. 1-81.

3.2.3 Statistical analysis

EFSA guidance on equivalence and difference tests has been scrupulously followed for compositional analysis and agronomic and phenotypic analysis, apart from in the supplementary studies assessing seed dormancy and germination (see A.3.4.4) and pollen morphology and viability (see A.3.4.5).

The methodology is set out in clear detail and the data are available, as are the SAS statistical software codes used to analyse them. However, the HCB Scientific Committee regrets the absence of data transformation, the lack of power analysis, and an inconsistency in the use of statistical analysis to interpret some results (see A.3.3.2).

As regards data transformation, EFSA gives the following guidance ((EFSA, 2011c), p. 16):

'Data transformation may be necessary to ensure normality and to provide an appropriate scale on which statistical effects are additive.'

The models used are indeed additive and assume the data to have a Gaussian distribution. An asymmetric distribution could result in bias and in particular lead to some observations being considered outliers and therefore wrongly discarded.

As regards power analysis, the applicant justifies its absence by citing EFSA guidance (*Appendix G Statistics for comparative studies*, p. 4):

'The experimental designs followed in compositional and agronomic analyses comply with the requirements set in the EFSA guidance document.'

Yet the EFSA guidance document mentioned by the applicant (EFSA, 2011c) states (p. 2):

'[T]his document also provides up-to-date guidance on [...] the design of the field trials for compositional, agronomic and phenotypic characteristics ensuring sufficient statistical power (see EFSA, 2010b).'

The reference cited (EFSA, 2010b) specifies (p. 8):

'Ignoring Type II errors might lead to an erroneous indication of safety, while in reality the experiment simply was not sensitive enough to detect adverse effects. The complement of the probability of Type II error is termed 'statistical power'. [...] The risk assessor must ensure that an evaluation has sufficient power to provide reasonable evidence of equivalence [...]

'A power analysis, executed when the study is being planned and prior to its start may be used to estimate power, to choose appropriate replication and to give confidence that the experiment will detect any significant effect that is present.'

The same EFSA guidance document mentions on p. 11 that, at worst and in order to simplify the assessment, an in-depth consideration of the minimum number of replications required can be substituted for power analysis. This alternative approach is governed by specific EFSA recommendations (EFSA, 2010b). The applicant has offered no such consideration.

The HCB Scientific Committee requests that a power analysis or an in-depth consideration such as that outlined by EFSA be provided by the applicant for all difference tests.

EFSA (2010b). 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 (2011c). Scientific opinion on guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. The EFSA Journal 9 (5): 2150, 37 pp.

3.3. Compositional analysis

3.3.2 Results

The HCB Scientific Committee again stresses that the non-GM comparators used for the comparison with glyphosate-treated MON 88302 do not seem to have been treated. The applicant ought to clarify this point and allow for it when interpreting these comparative assessments.

All components were analysed using the equivalence and difference tests recommended by EFSA, apart from moisture: the HCB Scientific Committee is surprised that the applicant claims to be unable to comment on equivalence for moisture on the grounds of lack of observable variation in values for non-GM reference varieties for this component.

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 75:

'Equivalence limits for moisture could not be established due to a lack of observable variation in values for the conventional reference varieties.'

The HCB Scientific Committee believes that the equivalence test should be used in the same conditions for all components whatever the observed level of variation for the non-GM reference varieties. The HCB Scientific Committee requests the applicant to clarify this problem.

3.3.3 Conclusion

Apart from the question of moisture raised in 3.3.2, for which an explanation is requested, and despite the problem of methodological rigour regarding untreated comparators being compared with glyphosate-treated oilseed rape MON 88302, the HCB Scientific Committee agrees with the applicant that it can be concluded that the compositional variations observed for oilseed rape MON 88302 in the conditions tested are within the natural variation of the non-GM reference varieties. The HCB Scientific Committee emphasises, however, that the trial conditions did not include late treatment of oilseed rape MON 88302 with glyphosate.

3.4. Agronomic and phenotypic characteristics

3.4.2 Agronomic and phenotypic results

As before, the HCB Scientific Committee requests the applicant to make allowance for non-treatment of comparators with herbicide when interpreting comparative assessments involving MON 88302 treated with glyphosate. The HCB Scientific Committee draws attention to EFSA guidance on the three components covered by comparative assessment of herbicide-tolerant GM plants: GM plants exposed to the intended herbicide, their comparator treated with a conventional herbicide regime, and GM plants subjected to the same conventional herbicide regime (EFSA, 2010a, b, 2011b, c).

While no statistically significant differences were noted between MON 88302 (glyphosate-treated or glyphosate-untreated) and its near-isogenic non-GM comparator for 7 out of the 10 characteristics studied (early stand count, plant height, pod shattering, seed moisture, seed quality (percentage of green seeds at harvest), yield and final stand count), statistically significant differences were detected for 3 characteristics (seed maturity, lodging, and days to first flowering).

The delay in seed maturity and the reduction in lodging of MON 88302 in relation to its near-isogenic non-GM comparator are within the equivalence limits for the commercial reference varieties. This is not the case for the delay in flowering: 50% of oilseed rape MON 88302 plants took an average of 63 days to reach first flowering (63.4 days for glyphosate-treated MON 88302) compared with 58.7 days for the near-isogenic non-GM comparator and equivalence limits of 50.4 to 59.7 days for the conventional reference varieties.

The applicant then changes the assessment benchmark, referring to a Canola Council of Canada publication showing a broader range of variation for this characteristic (54-69 days) than that observed in the reference varieties taken as comparators in the dossier's experimental design, enabling the applicant to conclude that the values measured for oilseed rape MON 88302 were well within the expected range of values for this crop.

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 25:

'Although the mean value for days-to-first flowering of glyphosate-treated MON 88302 was outside the equivalence limits calculated for the commercial reference varieties (50.4 – 59.7 days), the Canola Council of Canada reports a typical range of 54 – 69 days to first flowering for field-grown oilseed rape. Thus, days-to-first flowering for glyphosate-treated MON 88302 were well within the range of values expected for the crop.'

This argument calls into question the value of the experiments used to optimise comparative assessment of GMPs and non-GM comparators grown under the same conditions. EFSA recommends that use of external publications to establish equivalence limits should be very much the exception and supported by sound reasons ((EFSA, 2010b), p. 25):

'There may be rare cases where it is impossible to assess the natural variation from data on commercial varieties in the same experiment, either because such an experiment would be impossible or unreasonable to perform, or because such varieties have for unforeseen reasons not yielded satisfactory data from the experiment. If very strong and explicit justification can be given for not performing an experiment with commercial varieties then the use of external data on natural variation might be considered.'

No justification is offered here, especially as the experiment was actually performed and produced Category IV results, demonstrating non-equivalence between the GM plant and the

non-GM reference varieties. Pursuant to EFSA guidance on this matter, the HCB Scientific Committee requests that a more detailed assessment of this characteristic be undertaken (EFSA, 2010b).

As for biological interpretation and risk assessment, the HCB Scientific Committee would like the applicant to comment on the statistically significant delay in seed maturity and reduction in lodging of MON 88302 compared with its near-isogenic non-GM comparator even if these two characteristics are within the equivalence limits for the commercial reference varieties.

As regards impact of the modification on weediness and persistence of MON 88302, the HCB Scientific Committee regrets that the duration of flowering was not measured in addition to the number of days to first flowering.

EFSA (2010a). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. The EFSA Journal 8(11):1879, 111 pp.

EFSA (2010b). 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 (2011b). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance document on selection of comparators for the risk assessment of GM plants. The EFSA Journal 9(5):2149, 21 pp.

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

3.4.3 Environmental interaction

The HCB Scientific Committee regrets that this section considers only biotic and abiotic stressors and takes no account of impact on pollinating insects, since these have a role in oilseed rape production (Bommarco et al., 2012) and effective dispersal of oilseed rape pollen (Chifflet et al., 2011).

Bommarco, R., Marini, L., and Vaissière, B.E. (2012). Insect pollination enhances seed yield, quality, and market value in oilseed rape. *Oecologia*, 1-8.

Chifflet, R., Klein, E.K., Lavigne, C., Le Féon, V., Ricroch, A.E., J., L., and Vaissière, B.E. (2011). Spatial scale of insect-mediated pollen dispersal in oilseed rape in an open agricultural landscape. *J Appl Ecol* 48, 689-696.

3.4.4 Evaluation of seed dormancy and germination

Secondary dormancy of oilseed can contribute to seed persistence in soil (Gulden et al., 2004). Yet the applicant has here tested primary dormancy, which is known to be negligible for oilseed rape. As was to be expected, there were far too few seeds in a state of primary dormancy to be able to assess statistically significant differences between MON 88302 and its near-isogenic comparator in the experiments conducted in the dossier (McPherson, 2010a, 2011) (main text, pp. 99-103). Despite the blatant lack of conclusive data, the applicant nevertheless states (p. 100):

'Based on the assessed characteristics, the results of this study demonstrate that there were no changes in the dormancy or germination characteristics that are indicative of increased plant weediness or pest potential of MON 88302 compared to the conventional counterpart.'

The HCB Scientific Committee stresses that such conclusions cannot be drawn without variance analysis to demonstrate the absence of statistically significant differences and power analysis to demonstrate the absence of biologically significant differences. Lastly, no

equivalence testing has been carried out to demonstrate equivalence between oilseed rape MON 88302 and the non-GM reference varieties regarding seed dormancy and germination.

But the HCB Scientific Committee particularly wishes to emphasise that the real problem here is that the applicant has not assessed secondary dormancy, which contributes to seed persistence in the soil. A number of methods of testing secondary dormancy and seed viability have been published (Gruber et al., 2004; Weber et al., 2010). The HCB Scientific Committee would like to point out that it is important to take this secondary dormancy into consideration in order to have a more accurate characterisation of the persistence in the soil of oilseed rape MON 88302, whatever its differences with non-GM oilseed rape.

Gruber, S., Pekrun, C., and Claupein, W. (2004). Seed persistence of oilseed rape (*Brassica napus*): variation in transgenic and conventionally bred cultivars. *J Agric Sci* 142, 29-40.

Gulden, R.H., Thomas, A.G., and Shirtliffe, S.J. (2004). Secondary dormancy, temperature, and burial depth regulate seedbank dynamics in canola. *Weed Sci* 52, 382-388.

McPherson, M. (2010a). Dormancy and germination evaluation of glyphosate tolerant canola MON 88302 using seed produced in the U.S. during 2009. In Monsanto Technical Report, MSL0022876, p. 1-34.

McPherson, M. (2011). Dormancy and germination evaluation of canola MON 88302 using seed produced at a USA site. In Monsanto Technical Report, RAR-2011-0058, pp. 1-12.

Weber, E.A., Frick, K., Gruber, S., and Claupein, W. (2010). Research and development towards a laboratory method for testing the genotypic predisposition of oilseed rape (*Brassica napus* L.) to secondary dormancy. *Seed Science and Technology* 38, 298-310.

3.4.5 Evaluation of pollen morphology and viability

This study is surprising on more than one count, given that the methods used are out of date and even clearly inappropriate, so that the conclusion that there are no differences between pollen from oilseed rape MON 88302 and pollen from a control consisting of a near-isogenic non-GM variety or from the non-GM commercial reference varieties is actually very uninformative.

Thus the Alexander test for pollen viability (Alexander, 1980) is in fact a pollen stainability test rather than a viability test, as has long been shown in many species, since even dead pollen is stained by acid fuchsin in the Alexander test (see publications of Barrow, 1983 on *Gossypium hirsutum* and Parfitt and Ganeshan, 1989 on *Prunus*). It is also worthy of note that the study's authors were not surprised at their results, since the 'viability' measured varied between 99% and 100% (main text, Table 20, p. 105). The current recognised method of measuring pollen viability is the fluorochromatic reaction (FCR) method (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970; Heslop-Harrison et al., 1984). No publications on pollen viability validated by this method give values as high as those reported here whatever the plant model studied (see, for example, the case of cantaloupe pollen (Vaissière et al., 1996)). Admittedly, these values were obtained by examining between 70 and 100 grains with 5 replicates (confidential information, McPherson, 2010b), but the Mesquida team, for example, have obtained a maximum 91% germination rate with oilseed rape pollen also extracted directly from the flowers (Mesquida et al., 1987).

As regards pollen morphology, this was observed in 10 grains with 5 replicates (one sample per plant) under 400x magnification (confidential information (McPherson, 2010b), Figure 1). Under these conditions and given a mean diameter of 25 µm, it is not really surprising that no difference could be detected between pollen from oilseed rape MON 88302 and pollen from the near-isogenic non-GM comparator or the non-GM commercial reference varieties.

To have a representative measurement of pollen the study ought to have been conducted with a particle counter, for example, so as to analyse a large quantity of grains (as in Lau and Stephenson, 1993). Finally, with regard to pollen morphology, more accurate observation would have required the grains to be acetolysed (Erdtman, 1952) before then being examined

under an optical microscope or else examined directly using scanning electron microscopy (as in Cooper et al., 2000).

Pollen production per flower would also have been an important factor to take into account for oilseed rape MON 88302 characterisation, since it has a direct impact on pollen dispersal from the plant in question (Devaux et al., 2008).

Lastly, in view of the applicant's claims concerning transgene expression in the pollen – which is supposed to allow later treatment of oilseed rape MON 88302 plants –, it would have been useful to have had a characterisation of the pollen grains after glyphosate treatment, since glyphosate resistance in pollen grains could be a supplementary persistence trait in a feral population of GM oilseed rape in a semi-natural zone treated with glyphosate or if the transgene entered a weed related to oilseed rape (such as wild radish).

Alexander, M.P. (1980). A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol* 55, 13-18.

Barrow, J.R. (1983). Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton. *Crop Sci* 23, 734-736.

Cooper, R.L., Osborn, J.M., and Philbrick, C.T. (2000). Comparative pollen morphology and ultrastructure of the Callitrichaceae. *Am J Bot* 87, 161-175.

Devaux, C., Klein, E.K., Lavigne, C., Sausse, C., and Messean, A. (2008). Environmental and landscape effects on cross-pollination rates observed at long distance among French oilseed rape *Brassica napus* commercial fields. *J Appl Ecol* 45, 803-812.

Erdtman, G. (1952). Pollen morphology and plant taxonomy. In *Angiosperms* (Stockholm, Almquist & Wiksell), p. 539.

Heslop-Harrison, J., and Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence - intracellular hydrolysis of fluoresceine diacetate. *Stain Technol* 45, 115-120.

Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., and Shivanna, K.R. (1984). The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor Appl Genet* 67, 367-375.

Lau, T.C., and Stephenson, A.G. (1993). Effects of soil nitrogen on pollen production, pollen grain size, and pollen performance in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Am J Bot* 80, 763-768.

McPherson, M. (2010b). Pollen morphology and viability evaluation of glyphosate tolerant canola MON 88302 produced in a growth chamber. In *Monsanto Technical Report*, MSL0022878, pp. 1-34.

Mesquida, J., Renard, M., and Mesquida, B. (1987). Etude préliminaire sur la germination *in vitro* du pollen de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) et sur l'évolution dans le temps de son aptitude à germer. *Agronomie* 7, 409-416.

Parfitt, D.E., and Ganeshan, S. (1989). Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. *HortScience* 24, 354-356.

Vaissière, B.E., Malaboëuf, F., and Rodet, G. (1996). Viability of cantaloupe pollen carried by honeybees *Apis mellifera* varies with foraging behavior. *Naturwissenschaften* 83, 84-86.

4. Toxicological assessment

4.2. Assessment of newly expressed proteins

4.2.2 Up-to-date bioinformatic search for homology

This assessment contains no citations. The HCB Scientific Committee requests that the dossier systematically cite the experimental reports whose conclusions are described in the text in order to allow experts to assess them effectively without having to waste time looking for the relevant reports in the depths of the dossier.

4.2.3 Information on the stability of the protein under the relevant processing and storage conditions for the food and feed derived from the GM plant

The assessment relating to influence of pH on the CP4 EPSPS protein contains no specific citations of experiments. The HCB Scientific Committee requests that the dossier systematically cite the experimental reports whose conclusions are described in the text in order to allow experts to assess them effectively without having to waste time looking for the relevant reports in the depths of the dossier.

4.2.4 Data concerning the resistance of the newly expressed protein to proteolytic enzymes

The HCB Scientific Committee again draws attention to a citation problem in the main text that prevents the applicant's statements from being verified, as demonstrated in the examples below:

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 123:

'When crops are processed for food or feed purposes, they typically encounter conditions such as heating that can denature proteins. However, the nutritional value of the protein is not lost, and evidence suggests that proteins are more rapidly cleaved by digestive proteases in their denatured form than in their native form (Hammond and Fuchs, 1998).'

This passage cites a review paper containing no research data (Hammond B., Fuchs R.L., Safety evaluation of new varieties of food crops developed through biotechnology, Biotechnology and Safety Assessment, 1998, 61-79).

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 123 (ctd):

'Thus it is reasonable to expect that the digestibility of an individual protein will not be substantially reduced due to processing conditions. This hypothesis has been examined using heat treatment (100 °C, 5 minutes) as a surrogate for processing conditions (Alcalde and Camara, 2007). The authors demonstrated that CP4 EPSPS, whether heated as a purified solution or in soybean extract, was readily digested in an SGF assay.'

This passage ostensibly addressing the digestibility of the CP4 EPSPS protein cites a paper dealing with cultivation of Bt maize in Spain (Alcalde E., Camara M., 10 years of Bt maize. The case of Spain, J. Biotechnol., 131, S21-S22, 2007).

4.2.5 Repeated toxicity studies using laboratory animals

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 124:

'Based on the weight of evidence described in this application, consisting of: 1) the history of safe use for the CP4 EPSPS protein and its source organism; 2) the lack of structural or functional relationship of CP4 EPSPS to proteins that adversely affect human or animal health; 3) the low expression level of CP4 EPSPS in seed; 4) the digestibility of CP4 EPSPS in SGF and SIF; 5) the lack of acute toxicity of CP4 EPSPS at doses several orders of magnitude higher than anticipated human exposure; a repeated dose toxicity study for MON 88302 is not necessary to confirm safety.'

The HCB Scientific Committee believes that there is no justification for extrapolating the acute toxicity results for the CP4 EPSPS protein to the whole plant.

4.5. Assessment of the whole food and/or feed derived from GM plants

4.5.1 Design and performance of 90-day feeding study in rodents

The applicant argues that a 90-day rodent feeding study is not necessary to assess the toxicity of oilseed rape MON 88302 considering that (1) the seed composition of oilseed rape MON 88302 is no different from that of its near-isogenic non-GM comparator (which is incorrect in itself; see comments in A.4.6) and the differences observed (which do exist) are

within the range of natural variability for oilseed rape, and (2) the safety of the CP4 EPSPS protein has been demonstrated.

The HCB Scientific Committee requests that a 90-day rodent feeding study be carried out to assess the toxicity of oilseed rape MON 88302 meal. The study must be conducted on treated and untreated oilseed rape, with treatment occurring under the anticipated treatment conditions for this oilseed rape. For the HCB Scientific Committee, the study's function is to reveal any unforeseen toxic effects of oilseed rape MON 88302. It therefore insists on this study whatever the results of equivalence tests for oilseed rape MON 88302 and the non-GM commercial reference varieties and despite the results demonstrating the safety of the CP4 EPSPS protein.

4.6. Conclusions

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 125:

'Additionally, a thorough evaluation of the natural constituents of MON 88302 (Section A.3.3) establish that seed composition of MON 88302 is not different to the seed composition of the conventional counterpart.'

This statement is incorrect. Statistically significant differences have indeed been observed between oilseed rape MON 88302 and its near-isogenic non-GM comparator. The applicant seems to be confusing the equivalence test results for MON 88302 and the non-GM commercial reference varieties (where the values observed for MON 88302 were indeed within the range of variation for these reference varieties) with the difference test results for MON 88302 and its near-isogenic non-GM comparator.

6. Nutritional assessment

6.3. Conclusions

These comments also apply to A.6.1 and A.6.2.

All the applicant's statements to the effect that the seed composition of MON 88302 is no different from (or equivalent to) that of its *'conventional counterpart'* are wrong. Statistically significant differences in composition have indeed been observed between the seed of oilseed rape MON 88302 and that of its near-isogenic non-GM comparator. The applicant seems to be confusing the equivalence test results for MON 88302 and the non-GM commercial reference varieties (where the values observed for MON 88302 were indeed within the range of variation for these reference varieties) with the difference test results for MON 88302 and its near-isogenic non-GM comparator.

Furthermore, the HCB Scientific Committee requests that a nutritional study be conducted to assess the nutritional impact of oilseed rape MON 88302 meal derived from plants treated with glyphosate in the conditions corresponding to the applicant's claims for MON 88302 crops, i.e. late treatment.

E. Environmental risk assessment

2. General approach of the ERA

2.1. Characteristics of oilseed rape (*Brassica napus*) pertinent to this risk assessment

Crop biology and ecology

There are inaccuracies regarding the origin and date of formation of the oilseed rape species (*Brassica napus*): it is polyphyletic in origin (Allender and King, 2010; Palmer et al., 1983; Song and Osborn, 1992) and appears to have formed in areas where its ancestors coexisted, as mentioned, or else in gardens (Prakash and Hinata, 1980). There are no accounts of populations in the wild, and this species, like common wheat, is thought to be derived from domestication after natural hybridisation between *B. oleracea* and *B. rapa* (Prakash and Hinata, 1980). This certainly to some extent explains its inability to compete in natural

environments, mentioned in the main text, and the fact that volunteers grow in environments with little competition from other plants, like most Brassicaceae (Colbach et al., 2001a, b).

A number of elements of oilseed rape biology and ecology ought to be considered in more detail, documented better, and even occasionally corrected in this section of the dossier because of their role in dispersal, persistence and weediness of oilseed rape:

1. Pollen dispersal

As regards pollen, the applicant only cites certain articles (Lavigne et al., 1998 is missing, for example) but in particular omits to mention that there is still a debate about underestimation of long-distance dispersal (Klein et al., 2006) (see also following section);

2. Pod shattering rates

As regards seed, there is no mention of the high pod shattering rates (100 times the quantity sown) (www.brassica.fr), and the debate on seed persistence and the resulting volunteers is not closed, since seeds and their progeny can survive over several years (Pessel et al., 2001). No reference is made to work on modelling (Colbach et al., 2001a, b; Fargue et al., 2004; Garnier et al., 2008);

3. Secondary seed dispersal, seed spillage in transport

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 142:

'The seeds have no special or specific adaptations to facilitate widespread dispersal (they are not wind transported and have no structures to allow them to stick to animal fur) and so any shattered seed will remain in close proximity to the site of production. Further dissemination may occur by means of fauna or machinery. Seed dissemination is increased by excessive pod shattering during harvesting, but seed remains in the area where it is shed.'

This passage lacks detail and citations. Oilseed rape seed falling on roads, for example from harvest-related spillage or pod shattering of oilseed rape plants growing on the verges, can be carried along the road by wind turbulence from vehicles. This so-called secondary entrainment, once the seeds have already fallen on the ground, can result in effective dispersal, i.e. producing viable progeny, up to over 20 m (Garnier et al., 2008).

As regards spillage during transport, mention ought to be made of seed spillage (1) by grain trailers between field and silo (Bailleul et al., 2012), (2) by lorries during transport (von der Lippe and Kowarik, 2007), but also (3) by lorries and trains when seed arrives at the port and when it is being transported to crushing plants (Aono et al., 2006; Kawata et al., 2009; Nishizawa et al., 2009; Saji et al., 2005). All these factors show the difficulty of controlling oilseed rape seed flows. In cases (2) and (3), spillage events were inferred from viable progeny, and in case (3) transgenic oilseed rape plants were detected in the vicinity of bulk ports. Obviously, only case (3) is relevant to this application.

4. Semi-natural habitats

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 142:

'In undisturbed habitats, oilseed rape plants show poor survival characteristics; regular disturbance is needed for the establishment of oilseed rape plants from seeds in natural habitats.'

'Brassica napus is not generally regarded as an environmentally hazardous, colonizing (EC,2000), or invasive species in undisturbed natural ecosystems (Crawley et al., 2001). [...]

'Brassica napus has been documented to be present in disturbed areas such as roadsides and railways used for transportation of seed and the margins of fields where it has been previously grown (Aono et al., 2006; Knispel et al., 2008; Nishizawa et al., 2009; Pivard et al., 2008; Saji et al., 2005; Schafer et al., 2011; Tamis and de Jong, 2010).'

The first statement ought to be supported by citations. Moreover, since the so-called wild biodiversity of natural habitats is widely interlinked with disturbed environments in European landscapes (Hails, 2002), it seems more appropriate to consider persistence of feral oilseed rape populations in habitats bordering farmland rather than in so-called natural habitats. The term 'semi-natural' habitats, encompassing a mixture of wild and crop biodiversity, therefore appears more appropriate, without its being necessary to distinguish between natural and disturbed habitats here. In these semi-natural habitats, disturbances such as mowing or chemical treatment, particularly glyphosate treatment in France, occur quite regularly, and feral populations can become established.

5. Feral populations, secondary dormancy and seed persistence

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 142:

'However, populations of oilseed rape outside agricultural fields do not effectively compete with perennial vegetation, and usually persist only for a few years in the absence of ongoing seed introductions into areas from spillage during handling and transport or processing (Baker and Preston, 2008; Crawley and Brown, 1995; Crawley and Brown, 2004) (Crawley et al., 1993; Knispel et al., 2008). Most researchers have concluded that ruderal oilseed rape populations are not self-sustaining.'

Studies have shown that oilseed rape seed can produce progeny in semi-natural habitats. Feral oilseed rape populations can persist for several years (Pessel et al., 2001; Schafer et al., 2011). While they persist mainly through the soil seed bank (Pivard et al., 2008a; Pivard et al., 2008b), they can in fact constitute transgene reservoirs. Knispel & Lachlan (2010) have found that feral herbicide-resistant populations have now become a permanent feature of agricultural landscapes in western Canada (Knispel and McLachlan, 2010). Under selection pressure (for example glyphosate treatment for glyphosate-tolerant oilseed rape), these populations can grow in number and contribute to gene flows in neighbouring fields (Squire et al., 2011). The presence of two transgenes in populations in Japanese ports already suggests flows between oilseed rape fields and feral populations (Aono et al., 2006).

6. Problems in controlling oilseed rape volunteers

Main text (*Part II, Scientific information*), pp. 142/143:

'Problems controlling volunteer oilseed rape are not common (Boyles et al., 2009). Volunteers, including volunteers with herbicide-tolerant traits, can be managed with pre-plant or selective post-emergent herbicide applications or by mechanical means (Boyles et al., 2009), (EC, 2000).'

Control of volunteers is not as easy as the dossier suggests. In the handbook by Boyles et al. (2009) cited in the dossier, it is stated, *'Dormant canola is much more difficult to control'* (Boyles et al., 2009). This is an important unmentioned problem, given that oilseed rape seeds could well survive ten years in the soil (Gruber et al., 2010). Moreover, the extreme variability of the volunteer life cycle arising from the variability of local conditions (temperature, water, pathogens, physical soil structure, etc.) makes it difficult to establish predetermined methods of control (Gruber et al., 2010). Lastly, pollen flows between different herbicide-resistant varieties can result in multiple resistance in volunteers (Hall et al., 2000).

Sexual compatibility with other cultivated or wild plant species

Potential for cross-pollination with cultivated oilseed rape varieties

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 143:

'Pollen of B. napus is heavy and sticky (OECD, 1997) and pollen movement is primarily by insects, such as honey bees (Thompson et al., 1999) although wind is also responsible for some pollen movement.'

Oilseed rape pollen is not particularly heavy, but it is indeed covered with pollenkitt, which makes it sticky (Cresswell et al., 2004). However, oilseed rape pollen is found in the atmosphere and can assist in pollination (Pierre et al., 2010).

The HCB Scientific Committee regrets that references to most of the recent papers on effective dispersal of oilseed rape pollen are missing from the dossier. Consequently, the dossier is not up to date regarding oilseed rape pollen dispersal distances, the long-distance pollen dissemination methods responsible for this dispersal, and assessment of the ensuing risks (examples of relevant publications: Chifflet et al., 2011; Cresswell, 2005; Devaux et al., 2007; Devaux et al., 2005; Hayter and Cresswell, 2006; Hoyle et al., 2007).

The results of the SIGMEA project (2004-2007) on oilseed rape pollen dispersal and other published results following on from the PROSAMO project mentioned on p. 145 ought to be included in the references. They show, for example, that the maximum pollen dispersal distance (Table 31) provides less information than a dispersal function for predicting cross-pollination events across a particular area. In addition, the papers cited here consider the cross-pollination rate using a protocol based on a single 'donor' field, whereas landscape composition, i.e. the number of donor fields in a landscape, the type of varieties and other environmental variables may influence this rate. For example, Devaux et al. (2008) show that cross-pollination rates vary from 0% to 0.092% for recipient fields between 220 and 2000 m distant (Devaux et al., 2008) and that a fat-tailed dispersal function seems most suited to predicting these cross-pollination rates even if it underestimates the rate under 400 m (Devaux et al., 2008).

Potential for cross-pollination and introgression with other Brassica species

As regards assessment of oilseed rape gene flow to related crop weed species, the conditions for this gene flow ought to be specified: (1) The species must grow in or near the oilseed rape fields and flower at the same time as the gene-donor oilseed rape; (2) Hybrids must be able to develop; (3) They must be fertile and produce progeny; (4) The transgene must be able to enter the genome and persist in endemic populations. The list of species concerned would then be both shorter and more specific than that offered by the applicant. The HCB Scientific Committee offers the following supplements and corrections to the dossier's presentation of the weed species for consideration regarding oilseed rape gene flow.

The main species for which gene flow has been demonstrated is clearly wild turnip (*B. rapa*), but the applicant does not mention that introgressions into the genome of this weed occur easily and frequently; although the hybrids may be less fertile than oilseed rape, recombination easily permits introgression of oilseed rape genes (Leflon et al., 2007; Leflon et al., 2010). We may note that Ammitzbøll et al. (2005) show that F₁ hybrids of *B. rapa* and *B. napus* can have a reproductive fitness similar to that of their parents in certain environments (Ammitzbøll et al., 2005). Calculation of hybrid frequency and of hybrid persistence, which depends on parental genotypes, environment, and transgene characteristics, cannot therefore be generalised from the findings of a single study as presented in the applicant's dossier.

Indian mustard (*B. juncea*) is a largely irrelevant species as a crop weed, but breeders are well aware that it is possible for genes to be exchanged between the genomes (Barret et al., 1998).

Wild forms of cabbage (*B. oleracea*) are not crop weeds (Prakash and Hinata, 1980).

Black mustard (*B. nigra*), which can be found in fields in the south of France, does not hybridise easily with oilseed rape (Jahier et al., 1989).

Potential for cross-pollination and introgression with related species in the family Brassicaceae

Abyssinian mustard is a species that does not grow spontaneously in Europe (Prakash and Hinata, 1980). Hoary mustard (*Hirschfeldia incana*) is found in oilseed rape fields; this species can actually hybridise with oilseed rape, but the oilseed rape genome seems to be eliminated in descendants (Chèvre et al., 1996; Darmency and Fleury, 2000).

The two main oilseed rape weeds are wild radish (*Raphanus raphanistrum*) and charlock (*Sinapis arvensis*) (Chèvre et al., 2004). For wild radish, the applicant rightly points out that hybridisation is extremely rare, although it has been demonstrated in Canada (Warwick et al., 2003), Australia (Rieger et al., 2001) and France (Chèvre et al., 2000) at similar frequencies of 10⁻⁵ to 10⁻⁷, and first-generation hybrids have limited fertility. However, the applicant omits to

mention that over several generations of pollination by wild radish, the plants become fertile again (Chèvre et al., 1997), although no publication has yet reported introgression into the wild radish genome. For hoary mustard, hybridisation is indeed rare, and it has not been possible to study the progeny (Chèvre et al., 1996; Warwick et al., 2003).

There is almost zero probability of gene flow from oilseed rape to the other species mentioned in the dossier (Chèvre et al., 2004).

Allender, C.J., and King, G.J. (2010). Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biol* 10, 9.

Ammitzbøll, H.A., Mikkelsen, T., and Jørgensen, R.B. (2005). Environmental effects of transgene expression on hybrid fitness - a case study on oilseed rape. *Environ Biosafety Res* 4, 3-12.

Aono, M., Seiji, W., Masato, N., Nobuyoshi, N., Masanori, T., Akihiro, K., and Hikaru, S. (2006). Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environ Biosafety Res* 5, 77-87.

Bailleul, D., Ollier, S., Huet, S., Gardarin, A., and Lecomte, J. (2012). Seed spillage from grain trailers on road verges during oilseed rape harvest: an experimental survey. *PLoS One* 7, 7.

Barret, P., Guerif, J., Reynoird, J.P., Delourme, R., Eber, F., Renard, M., and Chevre, A.M. (1998). Selection of stable *Brassica napus* *Brassica juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 2. A 'to and fro' strategy to localise and characterise interspecific introgressions on the B-*napus* genome. *Theor Appl Genet* 96, 1097-1103.

Boyles, M., Peeper, T., and Stamm, M. (2009). Great Plains Canola Production Handbook. (Kansas State University).

Chèvre, A.M., Eber, F., Baranger, A., Kerlan, M.C., Barret, P., Vallée, P., and Renard, M. (1996). Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic Brassicas. Ninth Crucifer genetic workshop. ISHS. *Acta Horticultrae* 407, 167-179.

Chèvre, A.M., Eber, F., Baranger, A., and Renard, M. (1997). Gene flow from transgenic crops. *Nature* 389, 924-924.

Chèvre, A.M., Eber, F., Darmency, H., Fleury, A., Picault, H., Letanneur, J.C., and Renard, M. (2000). Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor Appl Genet* 100, 1233-1239.

Chèvre, A.M., Ammitzbøll, H.A., Breckling, B., Dietz-Pfeilstetter, A., Eber, F., Fargue, A., Gomez-Campo, C., Jenczewski, E., Jørgensen, R., Lavigne, C., et al. (2004). A review on interspecific gene flow from oilseed rape to wild relatives. In: *Introgression from Genetically Modified Plants into wild relatives*. Edts H.C.M. . In *Introgression from Genetically Modified Plants into wild relatives*, H.C.M. den Nijs, D. Bartsch, and J. Sweet, eds. (Cambridge, CABI Publishing), pp. 235-251.

Chifflet, R., Klein, E.K., Lavigne, C., Le Féon, V., Ricroch, A.E., J., L., and Vaissière, B.E. (2011). Spatial scale of insect-mediated pollen dispersal in oilseed rape in an open agricultural landscape. *J Appl Ecol* 48, 689-696.

Colbach, N., Clermont-Dauphin, C., and Meynard, J.M. (2001a). GeneSys: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers - I. Temporal evolution of a population of rapeseed volunteers in a field. *Agric Ecosyst Environ* 83, 235-253.

Colbach, N., Clermont-Dauphin, C., and Meynard, J.M. (2001b). GeneSys: a model of the influence of cropping system on gene escape from herbicide tolerant rapeseed crops to rape volunteers - II. Genetic exchanges among volunteer and cropped populations in a small region. *Agric Ecosyst Environ* 83, 255-270.

Cresswell, J.E. (2005). Accurate theoretical prediction of pollinator-mediated gene dispersal. *Ecology* 86, 574-578.

- Darmency, H., and Fleury, A. (2000). Mating system in *Hirschfeldia incana* and hybridization to oilseed rape. *Weed Res* 40, 231-238.
- Devaux, C., Lavigne, C., Falentin-Guyomarc'h, H., Vautrin, S., Lecomte, J., and Klein, E.K. (2005). High diversity of oilseed rape pollen clouds over an agro-ecosystem indicates long-distance dispersal. *Mol Ecol* 14, 2269-2280.
- Devaux, C., Lavigne, C., Austerlitz, F., and Klein, E.K. (2007). Modelling and estimating pollen movement in oilseed rape (*Brassica napus*) at the landscape scale using genetic markers. *Mol Ecol* 16, 487-499.
- Devaux, C., Klein, E.K., Lavigne, C., Sausse, C., and Messean, A. (2008). Environmental and landscape effects on cross-pollination rates observed at long distance among French oilseed rape *Brassica napus* commercial fields. *J Appl Ecol* 45, 803-812.
- Fargue, A., Meynard, J.M., Colbach, N., Vallee, P., Grandeau, G., and Renard, M. (2004). Contamination of rapeseed harvest by volunteers of other varieties: a study of intergenotypic competition. *Eur J Agron* 21, 193-207.
- Garnier, A., Pivard, S., and Lecomte, J. (2008). Measuring and modelling anthropogenic secondary seed dispersal along roadverges for feral oilseed rape. *Basic Appl Ecol* 9, 533-541.
- Gruber, S., Buhler, A., Mohring, J., and Claupein, W. (2010). Sleepers in the soil — vertical distribution by tillage and long-term survival of oilseed rape seeds compared with plastic pellets. *Eur J Agron* 33, 81-88.
- Hails, R.S. (2002). Assessing the risks associated with new agricultural practices. *Nature* 418, 685-688.
- Hall, L., Topinka, K., Huffman, J., Davis, L., and Good, A. (2000). Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B-napus* volunteers. *Weed Sci* 48, 688-694.
- Hayter, K.E., and Cresswell, J.E. (2006). The influence of pollinator abundance on the dynamics and efficiency of pollination in agricultural *Brassica napus*: implications for landscape-scale gene dispersal. *J Appl Ecol* 43, 1196-1202.
- Hoyle, M., Hayter, K., and Cresswell, J.E. (2007). Effect of pollinator abundance on self-fertilization and gene flow: Application to GM canola. *Ecol Appl* 17, 2123-2135.
- Jahier, J., Chevre, A.M., Tanguy, A.M., and Eber, F. (1989). Extraction of disomic addition lines *Brassica napus* - *B.nigra*. *Genome* 32, 408-413.
- Kawata, M., Murakami, K., and Ishikawa, T. (2009). Dispersal and persistence of genetically modified oilseed rape around Japanese harbors. *Environ Sci Pollut Res* 16, 120-126.
- Klein, E.K., Lavigne, C., Picault, H., Renard, M., and Gouyon, P.H. (2006). Pollen dispersal of oilseed rape: estimation of the dispersal function and effects of field dimension. *J Appl Ecol* 43, 141-151.
- Knispel, A.L., and McLachlan, S.M. (2010). Landscape-scale distribution and persistence of genetically modified oilseed rape (*Brassica napus*) in Manitoba, Canada. *Environ Sci Pollut Res* 17, 13-25.
- Lavigne, C., Klein, E.K., Vallee, P., Pierre, J., Godelle, B., and Renard, M. (1998). A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theor Appl Genet* 96, 886-896.
- Leflon, M., Brun, H., Eber, F., Delourme, R., Lucas, M.O., Vallee, P., Ermel, M., Balesdent, M.H., and Chevre, A.M. (2007). Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B-napus*. *Theor Appl Genet* 115, 897-906.
- Leflon, M., Grandont, L., Eber, F., Huteau, V., Coriton, O., Chelysheva, L., Jenczewski, E., and Chevre, A.M. (2010). Crossovers get a boost in *Brassica* allotriploid and allotetraploid hybrids. *Plant Cell* 22, 2253-2264.

- Nishizawa, T., Nobuyoshi, N., Mitsuko, A., Masanori, T., Akihiro, K., and Hikaru, S. (2009). Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. *Environ Biosafety Res* 8, 33-44.
- Palmer, J.D., Shields, C.R., Cohen, D.B., and Orton, T.J. (1983). Chloroplast DNA evolution and the origin of Amphidiploid Brassica species. *Theor Appl Genet* 65, 181-189.
- Pessel, F.D., Lecomte, J., Emeriau, V., Krouti, M., Messean, A., and Gouyon, P.H. (2001). Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theor Appl Genet* 102, 841-846.
- Pierre, J., Vaissière, B., Vallee, P., and Renard, M. (2010). Efficiency of airborne pollen released by honeybee foraging on pollination in oilseed rape: a wind insect-assisted pollination. *Apidologie* 41, 109-115.
- Pivard, S., Adamczyk, K., Lecomte, J., Lavigne, C., Bouvier, A., Deville, A., Gouyon, P.H., and Huet, S. (2008a). Where do the feral oilseed rape populations come from? A large-scale study of their possible origin in a farmland area. *J Appl Ecol* 45, 476-485.
- Pivard, S., Demsar, D., Lecomte, J., Debeljak, M., and Dzeroski, S. (2008b). Characterizing the presence of oilseed rape feral populations on field margins using machine learning. *Ecol Model* 212, 147-154.
- Prakash, S., and Hinata, K. (1980). Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review. *Opera Bot* 55, 1-57.
- Rieger, M.A., Potter, T.D., Preston, C., and Powles, S.B. (2001). Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor Appl Genet* 103, 555-560.
- Saji, H., Nobuyoshi, N., Mitsuko, A., Masanori, T., Akihiro, K., Seiji, W., Yoriko, H., and Masato, N. (2005). Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ Biosafety Res* 4, 217-222.
- Schafer, M.G., Ross, A.A., Londo, J.P., Burdick, C.A., Lee, E.H., Travers, S.E., Van de Water, P.K., and Sagers, C.L. (2011). The establishment of genetically engineered canola populations in the US. *PLoS One* 6, 4.
- Song, K., and Osborn, T.C. (1992). Polyphyletic origins of *Brassica napus* - New evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome* 35, 992-1001.
- Squire, G.R., Breckling, B., Pfeilstetter, A.D., Jorgensen, R.B., Lecomte, J., Pivard, S., Reuter, H., and Young, M.W. (2011). Status of feral oilseed rape in Europe: its minor role as a GM impurity and its potential as a reservoir of transgene persistence. *Environ Sci Pollut Res* 18, 111-115.
- von der Lippe, M., and Kowarik, I. (2007). Crop seed spillage along roads: a factor of uncertainty in the containment of GMO. *Ecography* 30, 483-490.
- Warwick, S.I., Simard, M.J., Legere, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Seguin-Swartz, G., and Stewart, C.N. (2003). Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theor Appl Genet* 107, 528-539.

2.2. Identification of potential hazards from molecular characterisation and comparative assessment

2.2.3 Phenotypic/Agronomic characterisation

The statement that there are no differences between oilseed rape MON 88302 and its conventional comparator in terms of weediness and invasiveness potential should be reviewed with regard to glyphosate treatment.

In addition, seed dormancy and pollen characteristics should be re-examined with appropriate experimental and statistical methodologies (see comments in A.3.4.4 and A.3.4.4). Secondary dormancy has not been assessed.

The conclusions regarding the other phenotypic and agronomic characteristics assessed ought to be qualified, particularly concerning the number of days to flowering (see comments in A.3.4.2)

2.4. Exposure characterisation

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 151:

'Since quantifying exposure due to these routes of exposure is not feasible, a qualitative approach has been followed.'

Why should environmental exposure to oilseed rape MON 88302 be impossible to quantify? The applicant could assess this exposure more accurately by obtaining from Member States specific information on the location of seed storage facilities and crushing plants in relation to entry ports, as well as on the import routes and the means of transport used to carry the oilseed rape seed.

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 151:

'Indeed, the containment systems used to transport and handle oilseed rape for direct use or processing are characterized by highly reduced interactions with the environment. Oilseed rape is normally held, transported and handled in a confined manner that restricts the potential for release into the local environment. In practice, the oilseed rape will mostly be confined to fixed locations (seaports, grain elevators and processing facilities) and enclosed to minimize or prevent spillage (transport vehicles including trucks and railroad cars). Under such conditions, oilseed rape is significantly limited in its entry into the environment, and therefore environmental exposure is low.'

Could this general, unreferenced, description be qualified with some actual data?

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 151:

'Some incidental spillage of oilseed rape may occur during import, handling, storage and processing of oilseed rape. However, modern methods of grain handling minimize such losses. Furthermore, the locations of spillage will be predictable, since they will be near the storage facilities and along transportation routes. Environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of oilseed rape destined for food and feed use.'

'Thus, the exposure of organisms in the environment to the import of MON 88302 in the EU would be negligible.'

It is difficult to assess the potential scale of the dispersal and persistence of this oilseed rape and the associated consequences without having precisely located these potential areas of dispersal along import routes, i.e. without having located seed storage facilities and crushing plants in relation to seed entry ports, and without knowing the precise means of transport and exact routes to be taken by the GM oilseed rape seed. It may also be noted that the statement, *'Environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of oilseed rape destined for food and feed use'* is qualified on page 154: *'In many cases, environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of oilseed rape destined for food and feed use.'*

The applicant ought therefore to obtain accurate data to make a quantitative assessment of dispersal risks with full knowledge of the facts instead of offering general predictions for the whole of the European Union without any basis in actual data.

We may note that the presence of feral populations of oilseed rape in the vicinity of Japanese ports (Aono et al., 2006; Kawata et al., 2009; Nishizawa et al., 2009; Saji et al., 2005) is the result of seed spillage from trains and lorries upon arrival of the seed at the port and its transport to the crushing plant. The presence of two transgenes in populations in Japanese

ports could be the result of gene flows between oilseed rape fields and feral populations (Aono et al., 2006).

Aono, M., Seiji, W., Masato, N., Nobuyoshi, N., Masanori, T., Akihiro, K., and Hikaru, S. (2006). Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environ Biosafety Res* 5, 77-87.

Kawata, M., Murakami, K., and Ishikawa, T. (2009). Dispersal and persistence of genetically modified oilseed rape around Japanese harbors. *Environ Sci Pollut Res* 16, 120-126.

Nishizawa, T., Nobuyoshi, N., Mitsuko, A., Masanori, T., Akihiro, K., and Hikaru, S. (2009). Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. *Environ Biosafety Res* 8, 33-44.

Saji, H., Nobuyoshi, N., Mitsuko, A., Masanori, T., Akihiro, K., Seiji, W., Yoriko, H., and Masato, N. (2005). Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ Biosafety Res* 4, 217-222.

3. Specific areas of risk

3.1. Persistence and invasiveness including plant-to-plant gene flow

3.1.1 Step 1: Problem formulation

The step-by-step approach recommended by EFSA guidance ((EFSA, 2010a), pp. 40-48) is followed in this dossier without taking into account the selection pressure from application of a glyphosate-based herbicide (Appendix 5). As a result, the assessment stops at Step 3. As recommended in EFSA guidance regarding GMPs showing enhanced fitness compared to their non-GM comparators (EFSA, 2010a), the assessment ought to continue until Step 4 to take account of glyphosate-treated areas.

In France, glyphosate is the most widely used foliage-applied herbicide in non-agricultural zones, where it accounts for 30 to 40% of herbicide applications (information from Ministry of Agriculture experts). Approximately a third of total tonnage of glyphosate-based herbicides sold in France is used in non-agricultural zones (source: BNVD (national databank of distributor sales of plant protection products)).

EFSA (2010a). EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *The EFSA Journal* 8(11):1879, 111 pp.

3.1.2 Step 2: Hazard characterisation

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 155:

'In many cases, environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of oilseed rape destined for food and feed use. For example, processing facilities may have no or poor soil conditions, or routine roadside maintenance (mowing or other vegetation control measures), and MON 88302, like any other oilseed rape, is unlikely to effectively compete with perennial vegetation outside agricultural fields (Section E.2.1). As described above in Section E.2.1, the likelihood for spilt seed to survive and establish is negligible.'

Feral populations of oilseed rape in Japan (Aono et al., 2006; Kawata et al., 2009; Nishizawa et al., 2009; Saji et al., 2005), or the oilseed rape GT73 populations recently detected in Switzerland in May 2012, occur in cleared areas where vegetation has already been eradicated through the addition of herbicides. These populations produce flowering plants capable of producing pollen and seed.

Aono, M., Seiji, W., Masato, N., Nobuyoshi, N., Masanori, T., Akihiro, K., and Hikaru, S. (2006). Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environ Biosafety Res* 5, 77-87.

Kawata, M., Murakami, K., and Ishikawa, T. (2009). Dispersal and persistence of genetically modified oilseed rape around Japanese harbors. *Environ Sci Pollut Res* 16, 120-126.

Nishizawa, T., Nobuyoshi, N., Mitsuko, A., Masanori, T., Akihiro, K., and Hikaru, S. (2009). Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. *Environ Biosafety Res* 8, 33-44.

Saji, H., Nobuyoshi, N., Mitsuko, A., Masanori, T., Akihiro, K., Seiji, W., Yoriko, H., and Masato, N. (2005). Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ Biosafety Res* 4, 217-222.

3.2. Plant to micro-organisms gene transfer

3.2.6 Step 6: Conclusions

Quotation from *Part VII, Summary of application*, p. 15:

'None of the genetic elements inserted in MON 88302 has a genetic transfer function. Therefore, no changes are expected in the ability of this oilseed rape to transfer genetic material to bacteria.'

The scope of this application covers import, processing and all uses of MON 88302 on the same basis as any other oilseed rape in the EU, excluding cultivation. In theory, environmental risks such as impact on soil microflora are negligible because confined to volunteers resulting from accidental escape of plant material during transport.

It is nevertheless wrong to assert, as the applicant does, that this transgenic plant is entirely incapable of transferring genetic material to bacteria. The possibility of gene transfer from transgenic plants to environmental bacteria has been demonstrated in the laboratory with models using a range of transgenic plants with naturally transformable bacteria as recipients, mainly *Acinetobacter baylii* (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008).

This possibility of transgene DNA transfer is linked to the presence of prokaryotic sequences in these transgenes. These sequences can be integrated by homologous or homeologous recombination into bacterial genome regions with strong nucleotide similarity at significant, and therefore detectable, frequencies. It should be pointed out that, in theory, other typical plant sequences from GM plant genomes could also be integrated into bacterial genomes by illegitimate recombination but at extremely low frequencies. Moreover, since such sequences constitute a genetic burden for the bacteria, as they cannot be expressed in the latter, they are not fixed in these genomes, as shown by analysis of bacterial genome sequences, in which very few plant-derived sequences have been detected.

Oilseed rape MON 88302 contains a copy of the EPSPS cassette, consisting of the *cp4 epsps* gene from the *Agrobacterium tumefaciens* CP4 strain encoding a CP4 EPSPS protein insensitive to glyphosate inhibition so as to confer glyphosate tolerance on the plants. The *cp4 epsps* gene can therefore constitute a priming region for recombination in genomes of *Agrobacterium tumefaciens*, which are ubiquitous soil bacteria, but also in other bacteria, since this gene is common in bacteria. The frequency of integration diminishes as sequence similarity declines with phyletic distance from *Agrobacterium tumefaciens*. However, the consequences of such a transfer would be negligible, amounting to replacement of the endogenous copy of the bacteria gene by that expressed in the transgenic plant, further modified for expression in a eukaryotic system.

Lastly, it should be pointed out that such gene transfer events, whether from transgene sequences or flanking regions, have never been observed in the field (Demanèche et al., 2008).

The risk of transgene transfer from genetically modified oilseed rape MON 88302 to soil bacteria if such a plant were accidentally to grow on national territory is therefore extremely

low and the consequences of such an event, were it to happen, wholly negligible for human and animal health and the environment.

Demanèche, S., Sanguin, H., Pote, 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.

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

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.

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.

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.

4. Post Market Environmental Monitoring plan

The HCB Scientific Committee asks the applicant to propose (1) specific measures to mitigate the known risk of unintended dispersal of oilseed rape seed between ports of entry and crushing plants, (2) monitoring measures to detect oilseed rape MON 88302 volunteers, and (3) measures to destroy them if detected. The HCB Scientific Committee recommends that the applicant collaborate closely with national competent authorities and local stakeholders to ensure that these measures fit the circumstances, taking into account the specific features of the importing country.

The HCB Scientific Committee requests that monitoring of oilseed rape volunteers be continued beyond the duration of import authorisation.