

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 26 février 2013

AVIS

en réponse à la saisine **121206- saisine HCB - dossier 2012-109**¹
concernant le dossier **EFSA-GMO-NL-2012-109**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 11 décembre 2012 par les Autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-NL-2012-109 portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du colza génétiquement modifié 73496 à des fins d'importation, transformation, et alimentation humaine et animale.

Ce dossier a été déposé par Pioneer Hi-Bred International, Inc. dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003 auprès de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), sous la référence **EFSA-GMO-NL-2012-109**. La saisine du HCB correspondante est référencée **121206- saisine HCB - dossier 2012-109**.

Dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est centralisée par l'EFSA. 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'EFSA d'ici le 28 février 2013.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 12 février 2013 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Les commentaires du HCB à destination de l'EFSA sont transmis par ce rapport aux Autorités compétentes françaises.

¹ La saisine « **121206- saisine HCB - dossier 2012-109** » 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'EFSA	4
2.1. REMARQUES GÉNÉRALES	4
2.2. COMMENTAIRES PAR SECTIONS DÉFINIES PAR L'EFSA	5
3. BIBLIOGRAPHIE	15
ANNEXE 1 : SAISINE	18
ANNEXE 2 : ELABORATION DES COMMENTAIRES	19
ANNEXE 3 : COMMENTAIRES TRADUITS EN ANGLAIS À DESTINATION DE L'EFSA ...	20
A3.1. GENERAL COMMENTS	20
A3.2. COMMENTS PER SECTION	21

1. Introduction

1.1. Contexte et enjeu de la saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 11 décembre 2012 par les Autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-NL-2012-109, portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du colza génétiquement modifié 73496 à des fins d'importation, transformation, et alimentation humaine et animale. Le dossier EFSA-GMO-NL-2012-109 a été déposé par Pioneer Hi-Bred International, Inc. dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003³ (EC, 2003) auprès de l'EFSA⁴.

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'EFSA, 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'EFSA 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'EFSA.

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

Les groupes de travail de l'EFSA 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'EFSA. Les commentaires de chaque Etat membre, ainsi que les réponses correspondantes de l'EFSA, sont rendus publics, en annexe de l'opinion scientifique de l'EFSA à destination de la Commission européenne.

La procédure de transmission des commentaires à l'EFSA 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'EFSA 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'EFSA, 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'EFSA 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 EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments, traduction de *European Food Safety Authority*

⁵ OGM : organismes génétiquement modifiés.

1.2. **Présentation du dossier**

Le colza génétiquement modifié 73496 est un colza de printemps rendu tolérant aux herbicides à base de glyphosate par l'expression du gène *gat4621*. L'enzyme GAT4621 (Glyphosate N-Acétyltransférase) acétyle le glyphosate, l'empêchant ainsi d'inhiber sa cible, la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP Synthase), enzyme clef de la synthèse des acides aminés aromatiques essentiels à la survie de la plante.

Le gène *gat4621* est un gène synthétique dont la séquence nucléotidique a été définie à partir de trois gènes *gat* de la bactérie *Bacillus licheniformis*, afin d'optimiser son expression dans la plante et son efficacité d'acétylation du glyphosate.

Le fragment d'ADN portant la cassette d'expression de ce gène a été transféré dans la plante par transformation biolistique de microspores. Il 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 le fragment d'ADN transféré n'est présent dans le colza 73496.

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 73496 dans l'Union européenne. Le CS du HCB propose d'envoyer les remarques suivantes à l'EFSA concernant les points du dossier identifiés comme critiquables.

2. **Commentaires à destination de l'EFSA**

2.1. **Remarques générales**

Commentaire préliminaire :

Deux instances d'évaluation ont été saisies pour l'examen de ce dossier en France : le Haut Conseil des biotechnologies (HCB), saisi par le Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, et l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), saisie par le Ministère de l'économie, des finances et du commerce extérieur. Les commentaires concernant la toxicité, l'allergénicité et l'alimentarité sont envoyés par l'Anses via le Ministère de l'économie, des finances et du commerce extérieur, en complément aux commentaires du HCB sur les autres aspects du dossier.

Remarques principales :

1. Le CS du HCB demande au pétitionnaire de parfaire l'évaluation du risque de formation de populations férales de colza 73496 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.
2. 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 73496, 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, les gestionnaires des voies de transport empruntées et les acteurs locaux, pour que ces mesures soient définies de manière circonstanciée, en prenant en compte les spécificités du pays d'importation.

Autres remarques :

1. Le CS du HCB demande que le pétitionnaire évalue l'impact de l'importation du colza 73496 sur les organismes non-cibles.

2. Le CS du HCB demande que le pétitionnaire évalue la dormance des graines pour mieux caractériser les capacités de persistance des graines de colza 73496.
3. Le CS du HCB relève les faiblesses suivantes concernant les évaluations comparatives présentées dans le dossier, dans le souci d'améliorer la pertinence de leur analyse :

Des différences significatives ont été relevées entre les 9 sites expérimentaux concernant les lignées testées, les traitements réalisés et les modalités d'observations, sans qu'il n'en soit toujours clairement fait mention lors de l'interprétation des résultats des analyses comparatives correspondantes.

Concernant la qualité de l'analyse statistique, les tests de comparaison et d'équivalence suivent globalement les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010b). Le CS du HCB déplore toutefois l'absence systématique d'analyse de puissance, l'absence occasionnelle de transformation des données, et la formulation confuse des conclusions. Le CS du HCB demande qu'une analyse de puissance ou qu'une réflexion approfondie telle que celle proposée en alternative par l'EFSA (EFSA, 2010b) soit réalisée par le pétitionnaire pour toutes les analyses de comparaison. Enfin, il est attendu du pétitionnaire une analyse claire et des conclusions concordantes, ainsi que des commentaires sur le sens de ces résultats en termes de biologie et d'impact sur la santé ou l'environnement.

4. Le CS du HCB note l'élévation attendue, et clairement mise en évidence par le pétitionnaire, des teneurs de certains acides aminés N-acétylés (NAA, NAG et NAT) dans le colza 73496 exprimant une acétylase GAT. Ces augmentations de concentration impliquent que la sécurité liée à la consommation humaine et animale du colza 73496 fasse l'objet d'études de toxicité et d'alimentarité spécifiques (voir l'analyse de ces parties du dossier par l'Anses).

Remarque supplémentaire :

Certains membres du CS du HCB soulignent qu'une étude plus large serait souhaitable concernant les conséquences en Europe de la culture du colza 73496 dans des pays tiers exportateurs, non seulement en termes socio-économiques, mais également en termes de biodiversité. Ils rappellent que, dans le cadre de la Convention pour la diversité biologique, les pays exportateurs ont des responsabilités internationales sur les espèces menacées. Ils suggèrent que le dossier fasse état des résultats d'une analyse d'impact de la culture sur la biodiversité des pays producteurs exportateurs. De plus, ils recommandent une étude supplémentaire pour évaluer 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'EFSA

N.B. : Les titres soulignés correspondent aux sections de dossier définies par l'EFSA, et aux différents formulaires mis à disposition par l'EFSA 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

3. Comparative assessment

3.1. Criteria for the selection of comparator(s)

Le CS du HCB s'interroge sur la complexité sans raisons apparentes de la définition du comparateur conventionnel du colza 73496. Pourquoi avoir utilisé la variété 99SNR11526 pour générer la lignée 5676M, au lieu d'utiliser simplement la généalogie directement équivalente au colza 73496 sans transformation, à savoir un croisement des lignées 1822B et 1822R, auto-pollinisé trois fois puis croisée à la lignée 5536F ?

Le CS du HCB note que parmi les 6 lignées de référence testées comme comparateurs du colza 73496 GM, 3 variétés ne sont pas des variétés hybrides, à la différence du colza testé. Ceci est d'autant plus problématique que les variétés hybrides et non-hybrides sont inégalement réparties entre les différents sites d'expérimentation, ce qui introduit une variabilité supplémentaire entre expériences.

3.2. Field trials: experimental design and statistical analysis

3.2.1 Experimental design

Le CS du HCB relève des différences significatives entre les 9 sites expérimentaux concernant les lignées testées, les traitements réalisés et les modalités d'observations, sans qu'il n'en soit toujours clairement fait mention dans le document principal lors de l'interprétation de certains résultats des analyses comparatives.

1) Les lignées de référence sont réparties aléatoirement entre les sites, avec seulement 3 variétés sur 6 par site. Considérant l'existence de 3 variétés non-hybrides sur les 6 lignées de référence, cette répartition ne permet de tester ni des lignées de référence équivalentes ni les lignées de référence les plus pertinentes à chacun des sites.

Annexe 17 (p. 11) :

"Each block at each site contained conventional herbicide-treated 73496 canola, glyphosate-treated 73496 canola, conventional herbicide-treated control canola, and three of six conventional herbicide-treated commercial reference canola lines (44A04, 44A89, 45H72, 45H73, 46H02, and/or 46A65 canola)."

2) Sur un site, le taux d'herbicide conventionnel reçu par le colza est très nettement inférieur à ceux appliqués aux 8 autres sites, plus proches du taux cible.

Annexe 17 (p. 12) :

"The target rate was 2.5 pt/A (2.92 L/ha) for sethoxydim and 0.5 pt/A (0.58 L/ha) for clopyralid. All product application rates for each herbicide treatment were within 90-110% of the corresponding target rate, with the exception of the BBCH 15 sethoxydim treatment at site RG006MB5, which was applied at 66.48% of the target rate."

3) L'ajout de surfactants aux pulvérisations phytosanitaires n'a pas été homogène sur l'ensemble des sites et entre traitements.

Annexe 17 (p. 13) :

"Non-ionic surfactant (NIS) and ammonium sulfate (AMS) were added to the glyphosate spray mixture at a rate of approximately 0.25% NIS volume/volume of spray solution and approximately 3.0 lb/A AMS (3.4 kg/ha), respectively. At site RG006SK2, less than 3.0 lb/A AMS were applied to the BBCH 11 glyphosate-treatment. At sites RG006SK3A and RG006SK3B, NIS and AMS were added to the conventional herbicide-treated 73496 canola, conventional herbicide-treated control canola, and the conventional herbicide-treated commercial reference canola."

4) Les observations de certaines composantes ont été faites à des stades différents, sans que cela ne soit mentionné dans le texte principal. Concernant l'évaluation de la résistance aux insectes et aux dégâts par exemple, sur 9 sites testés, 1 site a été noté avant la période préconisée et 1 site après. Cela est particulièrement problématique si l'on considère qu'il est impossible de prendre en compte l'impact des charançons des siliques et des cécidomyies au stade pleine floraison (BBCH 65), auquel le site RG006ND1 a été noté.

Annexe 17 (p. 15) :

"A visual estimate of insect damage was assessed using a 1-9 scale, with 1 corresponding to poor insect resistance or high damage, and 9 corresponding to excellent insect resistance or low damage during BBCH 79-83 growth stages, with the exception of sites RG006ND1, RG006ND3, RG006SK2, and RG006SK3B, in which the growth stages ranged from BBCH 65, BBCH 86-87, BBCH 79-85, and BBCH 70-83, respectively."

3.2.2 Statistical analysis

Les recommandations de l'EFSA en termes de tests de comparaison et d'équivalence ont été suivies pour l'analyse statistique des données de composition et des données agronomiques et phénotypiques. En ce qui concerne les analytes, lorsque le pourcentage de données sous la limite inférieure de quantification LLOQ (données BLQ) est supérieur à 50 %, seul un test de Fisher exact est utilisé pour comparer les proportions de données BLQ. La méthodologie est clairement détaillée, les données sont disponibles ainsi que les codes SAS utilisés pour leur analyse.

Le CS du HCB déplore toutefois (1) l'absence d'analyse de puissance, (2) une transformation des données occasionnelle et pas toujours la plus appropriée, (3) une définition trop large des intervalles de tolérance et (4) des conclusions confuses et imprécises par rapport aux résultats des analyses statistiques, sans commentaires sur le sens de ces résultats en termes de biologie ou d'impact sur la santé et l'environnement.

1) Analyse de puissance

Aucune étude de puissance n'est proposée dans le dossier. L'EFSA précise, en introduction de ses lignes directrices pour l'évaluation des risques des aliments provenant des plantes génétiquement modifiées (EFSA, 2011b) :

"[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) spécifiant (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'EFSA mentionne p. 11 qu'au minimum et par simplification, l'analyse de puissance peut être remplacée par une réflexion approfondie sur le nombre de réplifications minimum de mesures à effectuer. Cette approche alternative est cadrée par des recommandations spécifiques de l'EFSA (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'EFSA soit réalisée par le pétitionnaire pour s'assurer que le plan d'expérience mis en œuvre permet de détecter d'éventuelles différences biologiquement significatives.

(2) Transformation des données

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

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

Certaines données du dossier ont été transformées conformément à ces recommandations : les modèles utilisés sont additifs et font l'hypothèse que les données ont une distribution gaussienne. Mais il semble que seule une transformée *log* ait été utilisée pour certains paramètres. Pourquoi ne pas avoir utilisé une transformée Box-Cox pour tous les paramètres, en estimant un paramètre de puissance pour chaque paramètre ? Une telle transformée est en effet très flexible et couvre de nombreuses distributions, depuis la distribution normale jusqu'à la distribution log-normale.

(3) Intervalles de tolérance

Lorsque le test d'équivalence conclut à la non équivalence entre le colza GM et les variétés commerciales de référence évaluées dans les expérimentations du dossier, les données observées sont comparées à un intervalle de tolérance établi à partir de données provenant d'autres variétés non GM, non testées dans le cadre de ce dossier. La définition de cet intervalle est issue d'un modèle qui intègre de nombreuses sources de variabilité (inter-sites, inter-variétés, inter-blocs, interactions, ...). La variabilité totale estimée à partir de ce modèle linéaire mixte est alors importante et l'étendue de l'intervalle de tolérance particulièrement grande. L'utilisation de cet intervalle est sans doute informative par rapport à la « variabilité naturelle » des composantes concernées, mais ce critère ne devrait pas permettre de conclure, comme le fait le pétitionnaire, que les concentrations des composantes concernées de colza GM sont « comparables » à celles trouvées dans le comparateur conventionnel ou dans les lignées de référence utilisées dans l'expérimentation. En revanche, il pourrait être conclu que ces concentrations entrent dans la « variabilité naturelle » observée chez des variétés de colza non GM. Cette conclusion pourrait être établie s'il a été vérifié que les conditions d'analyse de ces variétés étaient comparables aux conditions utilisées dans les analyses mises en œuvre pour ce dossier.

(4) Interprétation des résultats et conclusions des analyses comparatives

Les résultats des analyses comparatives sont présentés pour chacun des 4 groupes de composantes (analytes OCDE, acides aminés N-acétyl, acides aminés libres, caractéristiques agronomiques) en les assignant de manière systématique à des catégories de classification statistique, d'une manière rébarbative et peu informative autrement que d'un point de vue statistique. Le CS du HCB attend du pétitionnaire des commentaires sur le sens de ces résultats en termes de biologie et en termes d'impact potentiel sur la santé et l'environnement, et en conséquence, la mise en œuvre d'une stratégie d'évaluation approfondie si nécessaire.

3.3. Compositional analysis

3.3.2 Results

Le CS du HCB ne trouve pas de conclusion sur l'analyse de composition à part une série de bilans statistiques, qui ne reflètent pas clairement les résultats observés (*Part II, Scientific information*, Document principal) :

Analytes OCDE (p. 105) :

"In summary: The comparative assessment of the "OECD" analytes demonstrated that the nutrient composition of 73496 oilseed rape was comparable to that of conventional oilseed rape represented by the non-GM near-isoline conventional control line and non-GM commercial reference lines."

Acides aminés N-acétylés (p. 110) :

"In summary: The comparative assessment of five N-acetylated amino acids in 73496 oilseed rape demonstrated that while the concentration of NAA, NAG, and NAT has been elevated the concentration of NAS and NAGly remained comparable to those of the conventional oilseed rapes represented by non-GM near-isoline conventional counterpart and non-GM commercial reference lines."

Acides aminés libres (p. 117) :

"In summary: The comparative assessment of the free amino acids in 73496 oilseed rape demonstrated that the concentrations of free amino acids were comparable to those in the conventional oilseed rapes represented by the non-GM near-isoline conventional counterpart and non-GM commercial reference lines."

Comme indiqué dans la section 3.2.2, le CS du HCB juge que le terme « comparable » utilisé dans ces conclusions ne reflète pas les situations dans lesquelles des différences et des non équivalences de composition ont été mises en évidence entre le colza GM et son comparateur

conventionnel ou les lignées de référence utilisées dans les expériences. L'utilisation d'intervalles de tolérance apporte une information supplémentaire intéressante sur la variabilité naturelle des composantes du colza, mais qui devrait être clairement décrite pour ce qu'elle est, sans brouiller l'information expérimentale des analyses effectuées sur les comparateurs utilisés dans le dossier. Le CS du HCB attend du pétitionnaire une analyse claire et des conclusions concordantes, ainsi que des commentaires sur le sens de ces résultats en termes de biologie et d'impact sur la santé ou l'environnement.

Par ailleurs, le CS du HCB note l'élévation attendue, et clairement mise en évidence par le pétitionnaire, des teneurs en acides aminés N-acétylés NAA, NAG et NAT dans le colza 73496 exprimant une acétylase GAT. Ces augmentations de concentration impliquent que la sécurité liée à la consommation humaine et animale du colza 73496 fasse l'objet d'études de toxicité et d'alimentarité spécifiques (voir l'analyse de ces parties du dossier par l'Anses).

Dans la mesure où l'huile est débarrassée des constituants hydrophiles de la graine, le CS du HCB note d'ores et déjà que l'alimentation humaine n'est *a priori* pas concernée par l'augmentation des teneurs en acides aminés N-acétylés.

3.4. Agronomic and phenotypic characteristics

3.4.2 Results and Discussion

Comme pour les résultats de composition, le pétitionnaire donne un bilan statistique d'équivalence générale qui ne reflète pas les nuances des résultats obtenus :

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

"In summary: the comparative assessment of agronomic characteristics of 73496 oilseed rape demonstrated that 73496 oilseed rape is comparable in terms of agronomic characteristics to those of oilseed rape represented by non-GM near-isoline control and non-GM commercial reference lines under conventional agronomic practice."

Les résultats sont en effet plus nuancés, quatre des douze composantes testées sur le colza GM 73496 étant significativement différentes par rapport au colza non GM ($P\text{-value} < 0,1$) : (1) le nombre total de plants levés (2-4 feuilles étalées), (2) le nombre total de plants juste avant la récolte, (3) le nombre de jours de floraison pour le colza GM 73496 soumis au traitement herbicide conventionnel, et (4) la hauteur des plantes pour le colza GM 73496 traité glyphosate.

Les différences de hauteur des plantes et de durée de floraison du colza GM 73496 par rapport à son comparateur non GM quasi isogénique sont numériquement très faibles (< à 2 jours en moyenne de floraison en plus), et sans impact sur le caractère d'adventicité et de persistance du colza. De plus, elles s'inscrivent dans les limites d'équivalence définies pour les lignées de référence.

En revanche, la diminution du nombre de plantes chez le colza GM par rapport à son comparateur non GM quasi isogénique atteint un niveau important :

- à 2-4 feuilles, 15 % de moins pour le colza GM soumis au traitement herbicide conventionnel et 27 % de moins pour le colza GM traité glyphosate
- à la récolte, 18 % de moins pour le colza GM soumis au traitement herbicide conventionnel et 21,5 % de moins pour le colza GM traité glyphosate.

L'interprétation biologique et l'analyse de risque nécessitent un commentaire du pétitionnaire sur l'infériorité du nombre total de plantes, tant à 2-4 feuilles que juste avant la récolte pour le colza GM 73496 par rapport à son comparateur non GM quasi isogénique, sachant que les données observées sur les composantes maladies et insectes ne pourraient expliquer cette différence de nombre de plantes.

Seed germination characteristics

Les tests réalisés montrent que le taux de germination du colza GM 73496 en conditions chaudes, contrairement à celui testé en conditions froides et également en conditions diurnes, est significativement plus faible que celui du colza non GM, tout en se situant dans la fourchette de taux de germination des lignées de référence de colza, ce qui le conduit à affirmer (p. 124) : *"It can be concluded that no unintended changes resulting from the transformation process were observed that affected seed germination."*

Cependant, bien que le pétitionnaire ait pris en compte des recommandations de l'AOSA, (Association of Official Seed Analysts) pour effectuer ces tests de germination, il ne teste pas la dormance secondaire, qui peut pourtant contribuer à la persistance des graines dans le sol (Gulden et al., 2004).

Le CS du HCB est d'avis que le pétitionnaire devrait tester la dormance secondaire selon les méthodes précédemment publiées (Gruber et al., 2004; Weber et al., 2010) afin d'évaluer la capacité de persistance du colza GM 73496.

3.4.3 Conclusions

Le pétitionnaire conclut :

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

"In summary: the comparative assessment of agronomic characteristics of 73496 oilseed rape demonstrated that 73496 oilseed rape is comparable in terms of agronomic characteristics to those of oilseed rape represented by non-GM near-isoline control and non-GM commercial reference lines under conventional agronomic practice".

Au regard des commentaires précédents (section 3.4.2), une telle conclusion ne peut être affirmée aussi catégoriquement et des compléments d'information et d'analyse seraient souhaitables, notamment concernant les nombres totaux de plantes levées à au stade de 2-4 feuilles étalées et avant la récolte, et concernant la dormance et la germination.

4. Toxicological assessment

Voir les commentaires de l'Anses, transmis à l'EFSA par le Ministère de l'économie, des finances et du commerce extérieur.

5. Allergenicity assessment

Voir les commentaires de l'Anses, transmis à l'EFSA par le Ministère de l'économie, des finances et du commerce extérieur.

6. Nutritional assessment

Voir les commentaires de l'Anses, transmis à l'EFSA par le Ministère de l'économie, des finances et du commerce extérieur.

E. Environmental risk assessment

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'EFSA (p. 40-48 (EFSA, 2010a)) est réalisée dans ce dossier sans prendre en compte de manière appropriée la pression de sélection exercée par l'application d'herbicide à base de glyphosate. Du coup,

l'évaluation est stoppée au stade 3. Comme préconisé dans les recommandations de l'EFSA pour une PGM montrant une fitness améliorée comparée à ses comparateurs non GM (EFSA, 2010a), l'évaluation devrait être poursuivie 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).

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 205-206 :

“Crawley et al. (1993; 2001) demonstrated that GM herbicide tolerant oilseed rape could not persist in established vegetation in the UK over a 3 year period indicating that the GM trait is unlikely to alter the fitness of feral plants or compatible relatives in semi-natural habitats. It even appeared that seed survival can, under non-agricultural conditions, be reduced for GM herbicide tolerant oilseed rape (Hails et al., 1997) therefore it is highly unlikely to invade other habitats (Salisbury, 2002). Also, the herbicide-tolerance trait conferred by gat4621 gene does not provide a selective advantage in unmanaged ecosystems, but rather only in settings where glyphosate is being applied for weed control. Furthermore, Devos et al. (2012) concluded that GM herbicide tolerant oilseed rape is not more persistent nor more invasive than its conventional counterpart in the absence of the herbicide related to the mode of action. Devos et al. (2012) also stated that there is no evidence indicating that the presence of the herbicide tolerance trait in compatible relatives would alter their fitness, persistence and invasiveness. Answers to questions 8 and 9 are “NO”.”

Les milieux semi-naturels comme les bordures de champs et les voies de transport peuvent être traités avec du glyphosate en France. Les populations férales de colza tolérant au glyphosate peuvent donc bénéficier d'un avantage sélectif dans ce cas.

Par ailleurs, les milieux naturels sont largement interconnectés aux milieux anthropisés naturels dans les paysages européens (Hails, 2002). Des espèces protégées qui pourraient être présentes dans les milieux semi-naturels sont susceptibles d'être impactées par l'envahissement par les populations férales en cas d'avantage sélectif (traitement de glyphosate).

S'il a été montré que le maintien des populations férales se fait majoritairement via la banque de graines du sol (Pivard et al., 2008a; Pivard et al., 2008b), ces populations peuvent aussi, de fait, constituer des réservoirs de transgènes.

La publication de Knispel & McLachlan (2010) n'est pas mentionnée dans le dossier alors qu'elle conclut que les populations férales tolérantes à un herbicide sont maintenant devenues des composantes permanentes des paysages agricoles de l'Ouest du Canada. Par ailleurs, sous pression de sélection par le glyphosate, ces populations peuvent augmenter en effectif et contribuer à des flux de gènes via les espèces apparentées ou 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).

3.1.2 Step 2: Hazard characterisation

3.1.2.1. Background information

Species-specific background information

(a) Reproductive biology

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 206 :

“The pollen is heavy and sticky, and can be transferred from plant to plant through physical contact. Oilseed rape pollen has been detected in the air above rape fields (Williams,

1984). *Approximately half of oilseed rape pollen travels less than three meters from the source, and the vast majority of pollen travels less than 10 meters, with the amount of pollen decreasing as the distance from the pollen source increases (Scheffler et al., 1993; Thompson et al., 1999). Pollinating insects, in particular honeybees (Apis mellifera) and bumblebees (Bombus sp.), play a major role in B. napus pollination and are believed to be involved in the transfer of pollen over long distances.*"

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). On retrouve toutefois du pollen de colza dans l'atmosphère et celui-ci peut participer à la fécondation (Pierre et al., 2010). Le CS du HCB déplore que la plupart des références récentes sur la dispersion efficace du pollen de colza manquent au dossier. Une actualisation de la bibliographie du pétitionnaire est nécessaire concernant la dispersion du pollen de colza, les modes de vecteur 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)). Le transfert de pollen fécondant sur des distances supérieures au km a clairement été mis en évidence (par exemple, Chifflet et al., 2011). Le pétitionnaire devrait prendre en compte le fait qu'une grande diversité d'hyménoptères et de mouches transportent du pollen fécondant entre différentes plantes de colza et ce, sur des distances qui excèdent le kilomètre (Chifflet et al., 2011).

(b) Characteristics associated with weediness and invasiveness

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 207 :

"It is generally accepted that most crop plants, including oilseed rape, have undergone many years of selective breeding and domestication, and only function optimally under managed agricultural conditions, such as high soil fertility or low plant competition. These conditions rarely occur in natural habitats (including roadsides and ports), resulting in poor fitness of oilseed rape plants outside of a managed field. Reduced recruitment, low survivorship, poor competitive ability, and low seed production are common indicators of poor fitness of oilseed rape in natural situations (OGTR, 2002)."

Les milieux semi-naturels comme les bordures de champs et les abords de voies de transport sont fauchés et traités avec des herbicides plusieurs fois par an. Il existe donc plusieurs périodes par an pendant lesquelles la compétition interspécifique y est relativement faible. Par ailleurs, les populations férales de colza issues de fuite de graines lors de l'importation de colza transgénique 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 avril et mai 2012 se situent dans des zones dégagées où la végétation a déjà été éliminée par l'adjonction d'herbicides. Ces populations peuvent donc se développer en absence de compétition interspécifique. Ces populations produisent des plants fleuris susceptibles de produire du pollen et des graines. Ceci conduit à un nombre de plantes de populations férales qui peut être relativement élevé (Squire et al., 2011). Certaines populations férales peuvent persister plusieurs années (Pessel et al., 2001). Les graines des populations férales persistent dans le sol formant une banque de graines, et si une population n'émerge pas une année donnée, elle peut réapparaître plus tard et être dispersée dans le paysage par les engins agricoles ou les véhicules (Garnier et al., 2008). Les approches de modélisation qui intègrent les processus de dynamique mais aussi les processus de dispersion de ces populations sont des outils précieux pour évaluer les déterminants de cette invasion (Garnier et al., 2008).

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 207 :

"Oilseed rape is not considered a significant weed, nor invasive of natural undisturbed temperate habitats in Canada (CFIA, 1994; Warwick et al., 1999), similar to those conditions found in Europe."

Knispel & McLachlan (2010) concluent que les populations férales tolérantes à un herbicide sont maintenant devenues des composantes permanentes des paysages agricoles de l'Ouest du Canada Cette référence manque au dossier du pétitionnaire.

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 207 :

"Weed species typically spread easily in disturbed areas or within crops and generally have a range of life history characteristics in common that enables them to rapidly colonize and persist in an ecosystem. Several characteristics of weeds have been described by Baker (1974) and are indicated in Table E.3.2. In general, these characteristics do not apply to cultivated oilseed rape varieties."

Il ne paraît pas opportun de comparer les caractéristiques des adventices avec celle des plantes cultivées mais plutôt d'étudier le devenir des populations férales de colza qui ne sont pas à proprement parler des adventices de culture. Initialement, le terme "féral" vient de la zoologie. Il signifie : "qui a abandonné son caractère domestique et est en particulier capable de se reproduire en dehors de la domestication". Transposé aux plantes, une plante férale est une plante poussant hors des champs qui dérive pleinement ou en partie d'une espèce cultivée et est capable de se reproduire seule, sans dépendre directement des pratiques agricoles (Gressel, 2005).

Table E.3.2.

La bibliographie du Tableau E.3.2. n'est pas à jour.

Concernant la dissémination des graines, les articles mentionnant les pertes liées au transport ne sont pas mentionnées, que cela soit 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, risque développé plus loin dans le texte, (3) par les camions et les trains lors de l'arrivée des graines dans les ports et leur transport vers les usines de trituration (Aono et al., 2006; Kawata et al., 2009; Nishizawa et al., 2009; Saji et al., 2005). 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. Enfin, les observations de populations férales de colza tolérant à un herbicide en Suisse (où l'importation de colza est interdite) devraient être mentionnées. Tous ces éléments témoignent de la difficulté à maîtriser les flux de graines de colza.

La dissémination des graines de colza par le vent n'est également pas mentionnée. En effet, 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).

Manquent également au dossier les références concernant la banque de graines du sol et la survie à long terme des graines dans le sol dans les milieux semi-naturels. Ces articles mettent en évidence que les populations férales se maintiennent via la banque de graines du sol et peuvent atteindre des densités importantes en France (Pessel et al., 2001; Pivard et al., 2008b; Squire et al., 2011).

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 210 :

"The history of cultivation of oilseed rape provides confirmatory evidence that this plant has not become a weed or invasive elsewhere."

Cet argument est surprenant compte tenu d'articles qui 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).

(c) Factors limiting persistence and invasiveness

Le dossier devrait mentionner que la dormance secondaire peut conduire à une persistance des graines de colza jusqu'à 10 ans.

(d) Hybridisation and introgression potential with any sympatric compatible relatives

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 211 :

"Overall, although sympatric compatible relatives exist in the EU, success of interspecific crossing is limited and dependant on exposure which would ultimately be low in the case of B. napus present in the environment through accidental spillage."

Les flux colza-ravenelle ne sont pas mentionnés dans le texte alors qu'ils sont pourtant indiqués dans le Tableau E.3.3. L'hybridation du colza vers la ravenelle 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} . Les hybrides de première génération sont peu fertiles. En revanche, au fil des générations de pollinisation par la ravenelle, les plantes retrouvent une fertilité (Chèvre et al., 1997). Aucune publication ne fait toutefois encore état d'introgression de colza dans le génome de la ravenelle.

Par ailleurs, le Tableau E.3.3. n'est pas exhaustif pour ce qui concerne les espèces à même de s'hybrider avec le colza : il manque la moutarde brune (*Brassica juncea*) avec laquelle le colza peut échanger des gènes (ex (Barret et al., 1998)).

3.1.3 Step 3: Exposure characterisation

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 215 :

"Although oilseed rape has characteristics such as secondary dormancy and small seed size that enable it to persist and disseminate in the landscape it is neither a weed nor an invasive species of natural or semi-natural habitats (Devos et al., 2012). Also, the scale of exposure is limited to accidental spillage (See Section E.3.1.1). Therefore, the scale of environmental exposure for any hazards identified in the questions of the problem formulation is considered negligible."

L'avantage sélectif en présence de glyphosate n'est pas pris en compte ici. Or les milieux de bordure de champ tout comme les ports, lieux de stockage et voies de transport comme les voies ferrées où circulent les containers de graines de colza sont soumis à des pressions de sélection d'herbicide comme le glyphosate en France.

3.1.6 Step 6: Conclusions

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 216 :

"Cross-hybridisation and introgression with wild-type relative can occur, however given that this would only ever occur as the result of accidental spillage the risk of hybridisation and introgression occurring will be low and furthermore the herbicide tolerance trait is unlikely to confer selective advantage or disadvantage to oilseed rape or wild relatives."

Cette conclusion semble hâtive compte tenu de la pression de sélection exercée par l'herbicide, probable dans les lieux où les fuites accidentelles de graines peuvent se produire.

3.4. Interactions of the GM plant with non-target organisms (NTOs)

3.4.1 Step 1: Problem formulation

Document principal (*Part II, Scientific information*), p. 222 :

"73496 oilseed rape has been developed to confer tolerance to herbicides, no target organisms are associated with this product. Therefore, even if protected organisms were exposed through manure and faeces, the likelihood that adverse effects could occur would be highly unlikely. Therefore an assessment of potential direct effects of 73496 oilseed rape on NTO populations is not applicable for this application."

Conformément aux lignes directrices de l'EFSA, le CS du HCB juge que le pétitionnaire devrait évaluer l'impact de l'importation du colza 73496 sur les organismes non-cibles, en

prenant en compte l'exposition possible par les fuites accidentelles de graines de colza et par les excréments provenant d'animaux nourris avec ce colza.

4. Post Market Environmental Monitoring plan

En complément à la surveillance d'incidents majeurs de dissémination, réalisée par l'association EuropaBio, 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 – qui devraient être géolocalisées, (2) des mesures de surveillance pour détecter les repousses de colza 73496, 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, les gestionnaires des voies de transport empruntées et les acteurs locaux pour que ces mesures soient définies de manière circonstanciée, 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.

Le CS du HCB note qu'au 21 février 2013, les méthodes de détection et de quantification spécifique à l'événement du colza 73496 ne sont pas encore validées. Le matériel de référence n'est pas encore disponible, selon le catalogue IRMM de janvier 2013.

3. Bibliographie

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.

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.

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.

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). Scientific opinion on guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *The EFSA Journal* 9 (5): 2150, 37 pp.
- 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.
- Gressel, J. (2005). Introduction - The challenges of ferality. In *Crop ferality and volunteerism*, J. Gressel, ed. (Boca Raton, Florida, CRC Press), pp. 1-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

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

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

11 DEC. 2012

Paris, le

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

Références : 121206- saisine HCB - dossier 2012-109

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 (AES). 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-NL-2012-109**, concernant la mise sur le marché du colza génétiquement modifié 73496 pour l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Les États membres peuvent transmettre leurs commentaires à l'AESA jusqu'au 4 mars 2013.

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 28 février 2013**.

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'Ingénieur en chef des Ponts,
des Bâtiments et des Forêts
de la Qualité et de la Sécurité des Végétaux*

Robert TESSIER

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'EFSA en tant que membre du panel OGM de l'EFSA, 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.

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-NL-2012-109 traduits en anglais à destination de l'EFSA, prêts à être postés en ligne de manière indépendante par section dans les formulaires du site de l'EFSA.

A3.1. General comments

Preliminary remark

Two assessment bodies were asked to study this application in France: the High Council for Biotechnology (HCB), receiving a referral from the Ministry for Agriculture, the Food Processing Industry and Forestry, and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), receiving a referral from the Ministry for the Economy, Finance and Foreign Trade. Comments on toxicity, allergenicity and nutrition have been forwarded by ANSES through the Ministry for the Economy, Finance and Foreign Trade to supplement HCB comments on other aspects of the application.

Main comments

1. The HCB Scientific Committee requests the applicant to complete the risk assessment with regard to formation of feral populations of oilseed rape 73496 in semi-natural habitats, 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.
2. The HCB Scientific Committee requests 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 73496 volunteers, and (3) measures to destroy them if detected. The HCB Scientific Committee recommends that the applicant collaborate closely with national competent authorities, local stakeholders and the management authorities for the transport routes used, to ensure that these measures are specified in detail, taking into account the specific features of the importing country.

Other comments

1. The HCB Scientific Committee requests the applicant to assess the impact of import of oilseed rape 73496 on non-target organisms.
2. The HCB Scientific Committee requests the applicant to assess secondary dormancy of seeds in order to characterise the persistence capability of oilseed rape 73496 seed more accurately.
3. The HCB Scientific Committee points out the following weaknesses in the comparative assessment with a view to improving the latter's relevance:
 - Significant differences were found between the nine trial sites with regard to lines tested, treatments applied and methods of recording, without this always being made clear in the interpretation of results of the relevant comparative assessments.
 - As regards the quality of statistical analysis, the equivalence and difference tests generally follow EFSA guidance (EFSA, 2010b). However, the HCB Scientific Committee regrets the systematic lack of power analysis, the occasional lack of data transformation and the ambiguous wording of the conclusions. 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 comparative assessments. Lastly, the applicant is expected to provide a clear

assessment and matching conclusions as well as comments on the significance of these results in terms of biology and environmental and health impact.

4. The HCB Scientific Committee notes the predictable increase, clearly demonstrated by the applicant, in the content of some N-acetylated amino acids (NAA, NAG and NAT) in oilseed rape 73496 expressing a GAT acetyltransferase. These increased concentrations suggest that the safety of oilseed rape 73496 in terms of food and feed should be covered by specific toxicity and nutritional studies (see analysis of these sections of the application by ANSES).

Additional comment

Some members of the HCB Scientific Committee have emphasised that a broader study of the consequences for Europe of oilseed rape 73496 cultivation in exporting third-countries would be desirable, not only in socio-economic terms but also with regard to biodiversity. They point out that under the Convention on Biological Diversity exporting countries have international responsibilities with regard to threatened species. They suggest that the application should mention the results of an assessment of the crop's biodiversity impact in producing and exporting countries. In addition, they recommend a further study to assess how import of certain products influences selection of crops in Europe and therefore the biodiversity resulting from these agrosystem choices.

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.

A3.2. Comments per section

A. Hazard identification and characterisation

3. Comparative assessment

3.1. Criteria for the selection of comparator(s)

The HCB Scientific Committee asks why the definition of the conventional counterpart of oilseed rape 73496 is so inexplicably complex. Why was variety 99SNR11526 used to breed the 5676M line instead of simply using the genealogy directly equivalent to that of oilseed rape 73496 without transformation, namely a cross between lines 1822B and 1822R self-pollinated three times and then crossed with line 5536F?

The HCB Scientific Committee notes that of the six reference lines tested as GM oilseed rape 73496 comparators, three are not hybrids, unlike the oilseed rape tested. This is all the more problematic as hybrid and non-hybrid varieties are distributed unevenly between the various trial sites, thus introducing additional variation between trials.

3.2. Field trials: experimental design and statistical analysis

3.2.1 Experimental design

The HCB Scientific Committee has found significant differences between the nine trial sites with regard to lines tested, treatments applied and methods of recording, without this always being made clear in the main text in the interpretation of results of the relevant comparative assessments.

- 1) Reference lines were distributed at random between sites, with only three varieties out of six on each. Given that three of the six reference lines are non-hybrid varieties, this distribution cannot be used to test either equivalent reference lines or the most relevant reference lines for each site.

Annex 17 (p. 11):

'Each block at each site contained conventional herbicide-treated 73496 canola, glyphosate-treated 73496 canola, conventional herbicide-treated control canola, and three of six conventional herbicide-treated commercial reference canola lines (44A04, 44A89, 45H72, 45H73, 46H02, and/or 46A65 canola).'

2) On one site, the conventional herbicide rate applied to the oilseed rape was markedly lower than those applied on the eight other sites, which were closer to the target rate.

Annex 17 (p. 12):

'The target rate was 2.5 pt/A (2.92 L/ha) for sethoxydim and 0.5 pt/A (0.58 L/ha) for clopyralid. All product application rates for each herbicide treatment were within 90-110% of the corresponding target rate, with the exception of the BBCH 15 sethoxydim treatment at site RG006MB5, which was applied at 66.48% of the target rate.'

3) Addition of surfactants to the herbicide sprays was not uniform across all sites and treatments.

Annex 17 (p. 13):

'Non-ionic surfactant (NIS) and ammonium sulfate (AMS) were added to the glyphosate spray mixture at a rate of approximately 0.25% NIS volume/volume of spray solution and approximately 3.0 lb/A AMS (3.4 kg/ha), respectively. At site RG006SK2, less than 3.0 lb/A AMS were applied to the BBCH 11 glyphosate-treatment. At sites RG006SK3A and RG006SK3B, NIS and AMS were added to the conventional herbicide-treated 73496 canola, conventional herbicide-treated control canola, and the conventional herbicide-treated commercial reference canola.'

4) Some parameters were recorded at different stages, without this being mentioned in the main text. Concerning assessment of resistance to insect damage for example, of the nine sites tested, one was evaluated prior to the recommended period and one afterwards. This is particularly problematic given that it is impossible to take account of the impact of silique weevils and gall midges at the full flowering stage (BBCH 65), which was when the RG006ND1 site was evaluated.

Annex 17 (p. 15):

'A visual estimate of insect damage was assessed using a 1-9 scale, with 1 corresponding to poor insect resistance or high damage, and 9 corresponding to excellent insect resistance or low damage during BBCH 79-83 growth stages, with the exception of sites RG006ND1, RG006ND3, RG006SK2, and RG006SK3B, in which the growth stages ranged from BBCH 65, BBCH 86-87, BBCH 79-85, and BBCH 70-83, respectively.'

3.2.2 Statistical analysis

EFSA guidance on equivalence and difference tests has been followed for compositional analysis and agronomic and phenotypic analysis. As regards the analytes, when the percentage of data below the lower limit of quantification LLOQ (BLQ data) was over 50%, a Fisher's exact test was used on its own to compare proportions of BLQ data. The methodology is set out clearly and in detail and the data are available, as are the SAS codes used to analyse them.

However, the HCB Scientific Committee regrets (1) the lack of power analysis, (2) data transformation that is not consistent and not always strictly appropriate, (3) too broad a definition of tolerance intervals and (4) ambiguous and unclear conclusions regarding the statistical analysis results, with no commentary on their significance in terms of biology and environmental and health impact.

1) Power analysis

No power analysis is offered in the application. EFSA states, by way of introduction to its guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants (EFSA, 2011b):

[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 the very least, 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 to ensure that the experimental design used is able to detect any biologically significant differences.

(2) Data transformation

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

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

Some of the application's data have been transformed in line with this guidance: the models used are additive and assume the data to have a Gaussian distribution. But it seems that a log transformation alone was used for some parameters. Why was a Box-Cox transformation not used for all parameters, estimating a power parameter for each parameter? This type of transformation is actually very flexible and covers a range of distributions, from normal distribution to log-normal distribution.

(3) Tolerance intervals

When the equivalence test found non-equivalence between GM oilseed rape and the commercial reference lines assessed in the application's trials, the recorded data were compared to a tolerance interval generated using data from other non-GM varieties not tested as part of this application. The definition of this interval comes from a model incorporating various sources of variability (between sites, lines, blocks, treatments, etc.). Total variability calculated using this linear mixed model is thus substantial and the tolerance interval is particularly broad. This interval is undoubtedly informative with regard to the 'natural variability' of the relevant analytes, but it cannot be used to infer, as the applicant does, that concentrations of the relevant GM oilseed rape analytes are 'comparable' to those found in the conventional counterpart or the reference lines used in the trial. On the other hand, it might be concluded that these concentrations come within the 'natural variability' observed in non-GM oilseed rape lines if it had been ascertained that the assessment conditions for these varieties were comparable to those used in this application.

(4) Interpretation of comparative assessment results and conclusions

Comparative assessment results are presented for each of the 4 component groups (OECD analytes, N-acetylated amino acids, free amino acids, agronomic characteristics): they are systematically assigned to statistical categories in a way that is off-putting and uninformative other than from a statistical point of view. The HCB Scientific Committee expects the applicant

to provide comments on the significance of these results in terms of biology and the potential environmental and health impact and, consequently, to implement an in-depth assessment strategy if necessary.

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). 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 has found no compositional analysis conclusions apart from a set of statistical summaries that do not clearly reflect the results recorded (*Part II, Scientific information*, main text):

OECD analytes (p. 105):

'In summary: The comparative assessment of the "OECD" analytes demonstrated that the nutrient composition of 73496 oilseed rape was comparable to that of conventional oilseed rape represented by the non-GM near-isoline conventional control line and non-GM commercial reference lines.'

N-acetylated amino acids (p. 110):

'In summary: The comparative assessment of five N-acetylated amino acids in 73496 oilseed rape demonstrated that while the concentration of NAA, NAG, and NAT has been elevated the concentration of NAS and NAGly remained comparable to those of the conventional oilseed rapes represented by non-GM near-isoline conventional counterpart and non-GM commercial reference lines.'

Free amino acids (p. 117):

'In summary: The comparative assessment of the free amino acids in 73496 oilseed rape demonstrated that the concentrations of free amino acids were comparable to those in the conventional oilseed rapes represented by the non-GM near-isoline conventional counterpart and non-GM commercial reference lines.'

As pointed out in section 3.2.2, the HCB Scientific Committee considers that the term 'comparable' used in these conclusions fails to reflect situations in which compositional difference and non-equivalence were shown between GM oilseed rape and its conventional counterpart or reference lines used in the trials. Use of tolerance intervals provides valuable additional information on the 'natural variability' of the oilseed rape analytes, but this should be clearly described for what it is, without confusing it with experimental information from assessment of comparators used in the application. The HCB Scientific Committee expects the applicant to provide a clear assessment and matching conclusions as well as comments on the significance of these results in terms of biology and environmental and health impact.

The HCB Scientific Committee notes the predictable increase, clearly demonstrated by the applicant, in the content of some N-acetylated amino acids (NAA, NAG and NAT) in oilseed rape 73496 expressing a GAT acetyltransferase. These increased concentrations suggest that the safety of oilseed rape 73496 in terms of food and feed should be covered by specific toxicity and nutritional studies (see analysis of these sections of the application by ANSES).

To the extent that the oil has been divested of the seed's hydrophilic constituents, the HCB Scientific Committee notes that food is not in theory affected by the increase in N-acetylated amino acid content.

3.4. Agronomic and phenotypic characteristics

3.4.2 Results and discussion

As in the case of the compositional results, the applicant gives a statistical summary of general equivalence that fails to reflect the shades of difference in the results obtained:

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

'In summary: the comparative assessment of agronomic characteristics of 73496 oilseed rape demonstrated that 73496 oilseed rape is comparable in terms of agronomic characteristics to those of oilseed rape represented by non-GM near-isoline control and non-GM commercial reference lines under conventional agronomic practice.'

The results are actually more varied, since four of the twelve parameters tested in GM oilseed rape 73496 were significantly different from non-GM oilseed rape (p -value <0.1): (1) total number of plants emerged (2-4 leaves unfolded), (2) total number of plants just prior to harvest, (3) number of flowering days for GM oilseed rape 73496 treated with conventional herbicide, and (4) plant height for glyphosate-treated GM oilseed rape 73496.

Differences in plant height and flowering duration between GM oilseed rape 73496 and its near-isogenic non-GM counterpart are numerically very small (< 2 extra flowering days on average) and do not affect oilseed rape persistence or invasiveness. Furthermore, they are within the equivalence limits laid down for the reference lines.

On the other hand, the number of GM oilseed rape plants in relation to the near-isogenic non-GM comparator is significantly lower:

- at 2-4 leaves: 15% lower for GM oilseed rape treated with conventional herbicide and 27% lower for GM oilseed rape treated with glyphosate;
- at harvest: 18% lower for GM oilseed rape treated with conventional herbicide and 21.5% lower for GM oilseed rape treated with glyphosate.

The biological interpretation and risk assessment demand that the applicant comment on the smaller total number of plants, both at the 2-4 leaf stage and just prior to harvest, for GM oilseed rape 73496 compared to its near-isogenic non-GM counterpart, since recorded data for the disease and insect parameters cannot explain this difference in plant numbers.

Seed germination characteristics

The tests carried out show that the germination rate for GM oilseed rape 73496 in warm conditions, unlike the cold and diurnal conditions that were also tested, was significantly lower than that for non-GM oilseed rape although within the range of germination rates for the reference oilseed rape lines, leading to the assertion (p. 124): *'It can be concluded that no unintended changes resulting from the transformation process were observed that affected seed germination.'*

However, although the applicant has taken account of AOSA (Association of Official Seed Analysts) recommendations when carrying out these germination tests, it has not tested secondary dormancy, which can nevertheless prolong persistence of seeds in the soil (Gulden et al., 2004).

The HCB Scientific Committee believes that the applicant ought to test secondary dormancy using previously published methods (Gruber et al., 2004; Weber et al., 2010) in order to assess the persistence capability of GM oilseed rape 73496.

3.4.3 Conclusions

The applicant concludes:

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

'In summary: the comparative assessment of agronomic characteristics of 73496 oilseed rape demonstrated that 73496 oilseed rape is comparable in terms of agronomic

characteristics to those of oilseed rape represented by non-GM near-isoline control and non-GM commercial reference lines under conventional agronomic practice.'

In the light of the previous comments (section 3.4.2), such a conclusion cannot be asserted so categorically, and further information and assessment would be advisable concerning total numbers of plants emerged at the 2-4 unfolded leaf stage and just prior to harvest, as well as on dormancy and germination.

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.

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.

4. Toxicological assessment

See comments from ANSES forwarded to EFSA by the Ministry for the Economy, Finance and Foreign Trade.

5. Allergenicity assessment

See comments from ANSES forwarded to EFSA by the Ministry for the Economy, Finance and Foreign Trade.

6. Nutritional assessment

See comments from ANSES forwarded to EFSA by the Ministry for the Economy, Finance and Foreign Trade.

E. Environmental risk assessment

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 (pp. 40-48 (EFSA, 2010a)) has been implemented in this application without properly taking account of selection pressure from application of a glyphosate-based herbicide. As a result, the assessment stops at Step 3. As recommended in EFSA guidance regarding GMPs showing enhanced fitness compared to their non-GM counterparts (EFSA, 2010a), assessment ought to be continued up to Step 4 in order 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)).

Main text (*Part II, Scientific information*), pp. 205-206:

'Crawley et al. (1993; 2001) demonstrated that GM herbicide tolerant oilseed rape could not persist in established vegetation in the UK over a 3 year period indicating that the GM

trait is unlikely to alter the fitness of feral plants or compatible relatives in semi-natural habitats. It even appeared that seed survival can, under non-agricultural conditions, be reduced for GM herbicide tolerant oilseed rape (Hails et al., 1997) therefore it is highly unlikely to invade other habitats (Salisbury, 2002). Also, the herbicide-tolerance trait conferred by gat4621 gene does not provide a selective advantage in unmanaged ecosystems, but rather only in settings where glyphosate is being applied for weed control. Furthermore, Devos et al. (2012) concluded that GM herbicide tolerant oilseed rape is not more persistent nor more invasive than its conventional counterpart in the absence of the herbicide related to the mode of action. Devos et al. (2012) also stated that there is no evidence indicating that the presence of the herbicide tolerance trait in compatible relatives would alter their fitness, persistence and invasiveness. Answers to questions 8 and 9 are "NO".'

Semi-natural habitats such as field margins and transport routes may be treated with glyphosate in France. Feral populations of glyphosate-tolerant oilseed rape may therefore have a selective advantage in this case.

Moreover, in Europe agriculture and the countryside are closely intertwined (Hails, 2002). Protected species in semi-natural habitats are likely to be affected by the invasiveness of feral populations in the event of a selective advantage (glyphosate treatment).

While it has been shown that feral populations are maintained mainly through seed banks in the soil (Pivard et al., 2008a; Pivard et al., 2008b), these populations may also, in fact, constitute reservoirs of transgenes.

The paper by Knispel and McLachlan (2010) is not mentioned in the application, although it finds that herbicide-tolerant feral populations have now become a permanent feature of agricultural landscapes in western Canada. Furthermore, under selection pressure from glyphosate, these populations could grow in number and promote gene flow through related species or neighbouring fields (Squire et al., 2011). The presence of two transgenes in populations found in Japanese ports already suggests 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.

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.

Hails, R.S. (2002). Assessing the risks associated with new agricultural practices. *Nature* 418, 685-688.

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.

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.

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.

3.1.2 Step 2: Hazard characterisation

3.1.2.1. Background information

Species-specific background information

(a) Reproductive biology

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 206:

'The pollen is heavy and sticky, and can be transferred from plant to plant through physical contact. Oilseed rape pollen has been detected in the air above rape fields (Williams, 1984). Approximately half of oilseed rape pollen travels less than three meters from the source, and the vast majority of pollen travels less than 10 meters, with the amount of pollen decreasing as the distance from the pollen source increases (Scheffler et al., 1993; Thompson et al., 1999). Pollinating insects, in particular honeybees (Apis mellifera) and bumblebees (Bombus sp.), play a major role in B. napus pollination and are believed to be involved in the transfer of pollen over long distances.'

Oilseed rape pollen is not particularly heavy but is indeed covered with pollenkitt, which makes it sticky (Cresswell et al., 2004). However, oilseed rape pollen is found in the atmosphere and can contribute to fertilisation (Pierre et al., 2010). The HCB Scientific Committee regrets that references to the majority of recent papers on effective dispersal of oilseed rape pollen are missing from the application. The applicant needs to update the references for oilseed rape pollen dispersal, the long-distance pollen dissemination methods responsible for this dispersal, and assessment of the ensuing risks (examples of relevant papers: (Chifflet et al., 2011; Cresswell, 2005; Devaux et al., 2007; Devaux et al., 2005; Hayter and Cresswell, 2006; Hoyle et al., 2007). Pollen transfer with pollination over distances above one kilometre has been clearly demonstrated (by Chifflet et al., 2011, for example). The applicant ought to take into account the fact that a wide range of Hymenoptera and flies carry pollen that can cross-pollinate different oilseed rape plants over distances exceeding one kilometre (Chifflet et al., 2011).

(b) Characteristics associated with weediness and invasiveness

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 207:

'It is generally accepted that most crop plants, including oilseed rape, have undergone many years of selective breeding and domestication, and only function optimally under managed agricultural conditions, such as high soil fertility or low plant competition. These conditions rarely occur in natural habitats (including roadsides and ports), resulting in poor fitness of oilseed rape plants outside of a managed field. Reduced recruitment, low survivorship, poor competitive ability, and low seed production are common indicators of poor fitness of oilseed rape in natural situations (OGTR, 2002).'

Semi-natural habitats such as field margins and road/railway verges are cut and treated with herbicides several times a year. There are thus several periods in the course of the year when interspecific competition is relatively low. Moreover, feral oilseed rape populations from seed escapes during import of transgenic oilseed rape into Japan (Aono et al., 2006; Kawata et al., 2009; Nishizawa et al., 2009; Saji et al., 2005) or, more recently, populations of oilseed rape GT73 detected in Switzerland in April and May 2012 have occurred in cleared areas where the vegetation had already been removed by the addition of herbicides. These populations can therefore expand in the absence of interspecific competition. They produce flowering plants likely to generate pollen and seed. This can lead to a relatively high number of plants in feral populations (Squire et al., 2011). Some feral populations can persist for several years (Pessel et al., 2001). Seed from feral populations persists in the soil forming a seed bank, and if a population does not emerge in a given year, it may reappear later and be dispersed within the landscape by agricultural machinery and vehicles (Garnier et al., 2008). Modelling approaches that incorporate both the dynamics and the dispersal processes of these populations are valuable tools for assessing the determinants of this invasiveness (Garnier et al., 2008).

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 207:

'Oilseed rape is not considered a significant weed, nor invasive of natural undisturbed temperate habitats in Canada (CFIA, 1994; Warwick et al., 1999), similar to those conditions found in Europe.'

Knispel and McLachlan (2010) conclude that herbicide-tolerant feral populations have now become a permanent feature of agricultural landscapes in western Canada. This reference is missing from the application.

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 207:

'Weed species typically spread easily in disturbed areas or within crops and generally have a range of life history characteristics in common that enables them to rapidly colonize and persist in an ecosystem. Several characteristics of weeds have been described by Baker (1974) and are indicated in Table E.3.2. In general, these characteristics do not apply to cultivated oilseed rape varieties.'

Comparing the characteristics of weeds with those of crop plants seems less appropriate than studying the evolution of feral populations of oilseed rape, which are not strictly speaking crop weeds. The term 'feral' originally came from zoology. It means 'having escaped from domestication and become wild'. Transposed to plants, a feral plant is a plant growing outside the field, fully or partly derived from a cultivated species and able to reproduce on its own without being directly dependent on agricultural methods (Gressel, 2005).

Table E.3.2.

The references in Table E.3.2. are not up to date.

Concerning seed dissemination, papers referring to spillage during transport are not cited, whether for seed spillage (1) from grain trailers between field and silo (Bailleul et al., 2012), (2) by lorries during transport (von der Lippe and Kowarik, 2007), but also, a risk treated at greater length below, (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). In cases (2) and (3), spillage events have been inferred from viable progeny, and in case (3) transgenic oilseed rape plants have been detected in the vicinity of bulk ports. Lastly, the reports of feral populations of herbicide-tolerant oilseed rape in Switzerland (where import of oilseed rape is prohibited) ought to be mentioned. All these factors show the difficulty of controlling oilseed rape seed flows.

Nor is there any mention of dissemination of oilseed rape seed by the wind. Oilseed rape seed falling on roads, for example from harvest-related spillage or pod shattering of oilseed rape plants growing on 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).

The application also lacks references concerning the soil seed bank and long-term survival of seed in soil in semi-natural habitats. Such papers show that feral populations are maintained through the soil seed bank and can achieve considerable densities in France (Pessel et al., 2001; Pivard et al., 2008b; Squire et al., 2011).

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 210:

'The history of cultivation of oilseed rape provides confirmatory evidence that this plant has not become a weed or invasive elsewhere.'

This argument is surprising in the light of papers concluding that herbicide-tolerant feral populations have now become a permanent feature of agricultural landscapes in western Canada (Knispel and McLachlan, 2010).

(c) Factors limiting persistence and invasiveness

The application ought to mention that secondary dormancy can lead to persistence of oilseed rape seeds for up to 10 years.

(d) Hybridisation and introgression potential with any sympatric compatible relatives

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 211:

'Overall, although sympatric compatible relatives exist in the EU, success of interspecific crossing is limited and dependant on exposure which would ultimately be low in the case of B. napus present in the environment through accidental spillage.'

Flows between oilseed rape and wild radish are not mentioned in the text, despite being included in Table E.3.3. Hybridisation of oilseed rape with wild radish 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} . First-generation hybrids have limited fertility. However, over several generations of pollination by wild radish the plants become fertile again (Chèvre et al., 1997). However, no publication has yet reported introgression of oilseed rape into the wild radish genome.

Moreover, Table E.3.3 is not exhaustive regarding species able to hybridise with oilseed rape: it lacks Indian mustard (*Brassica juncea*), with which oilseed rape is able to exchange genes (cf. (Barret et al., 1998)).

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.

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.

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.

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.

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.

Gressel, J. (2005). Introduction - The challenges of ferality. In *Crop ferality and volunteerism*, J. Gressel, ed. (Boca Raton, Florida, CRC Press), pp. 1-7.

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.

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.

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.

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.

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., 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.

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.

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.

3.1.3 Step 3: Exposure characterisation

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 215:

'Although oilseed rape has characteristics such as secondary dormancy and small seed size that enable it to persist and disseminate in the landscape it is neither a weed nor an invasive species of natural or semi-natural habitats (Devos et al., 2012). Also, the scale of exposure is limited to accidental spillage (See Section E.3.1.1). Therefore, the scale of environmental exposure for any hazards identified in the questions of the problem formulation is considered negligible.'

No allowance is here made for selective advantage from glyphosate. Yet field margin habitats, just like ports, storage sites and transport routes such as railways where containers of oilseed

rape seed are in transit, are subject to selection pressure from herbicides such as glyphosate in France.

3.1.6 Step 6: Conclusions

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 216:

'Cross-hybridisation and introgression with wild-type relative can occur, however given that this would only ever occur as the result of accidental spillage the risk of hybridisation and introgression occurring will be low and furthermore the herbicide tolerance trait is unlikely to confer selective advantage or disadvantage to oilseed rape or wild relatives.'

This conclusion seems rather hasty in the light of the herbicide selection pressure likely in places where accidental seed spillage may occur.

3.4. Interactions of the GM plant with non-target organisms (NTOs)

3.4.1 Step 1: Problem formulation

Main text (*Part II, Scientific information*), p. 222:

'73496 oilseed rape has been developed to confer tolerance to herbicides, no target organisms are associated with this product. Therefore, even if protected organisms were exposed through manure and faeces, the likelihood that adverse effects could occur would be highly unlikely. Therefore an assessment of potential direct effects of 73496 oilseed rape on NTO populations is not applicable for this application.'

In accordance with EFSA guidance, the HCB Scientific Committee considers that the applicant ought to assess the impact of import of oilseed rape 73496 on non-target organisms taking account of possible exposure through accidental spillage of oilseed rape seed and through faeces and manure from animals fed imported oilseed rape.

4. Post Market Environmental Monitoring plan

In addition to monitoring of major dispersal incidents by EuropaBio, 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 – which should be geolocated, (2) monitoring measures to detect oilseed rape 73496 volunteers, and (3) measures to destroy them if detected.

The HCB Scientific Committee recommends that the applicant collaborate closely with national competent authorities, local stakeholders and the management authorities of the transport routes used, to ensure that these measures are specified in detail, 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 consent.

The HCB Scientific Committee notes that as at 21 February 2013 the detection and quantification methods specific to the oilseed rape 73496 event had not yet been validated. Reference material is not yet available according to the IRMM catalogue of January 2013.