

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 05 avril 2013

AVIS

en réponse à la saisine **130110- saisine HCB - dossier 2012-104**¹
concernant le dossier **EFSA-GMO-ES-2012-104**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 12 février 2013 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-ES-2012-104 portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du coton génétiquement modifié GHB614 pour la culture.

Ce dossier a été déposé par la société Bayer CropScience dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003 auprès de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), via les autorités compétentes espagnoles, sous la référence **EFSA-GMO-ES-2012-104**. La saisine du HCB correspondante est référencée **130110- saisine HCB - dossier 2012-104**.

Dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de mise sur le marché pour la culture 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 5 avril 2013.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 12 mars 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 « **130110- saisine HCB - dossier 2012-104** » est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS ainsi que le rapporteur extérieur ayant contribué à l'expertise du dossier sont indiquées 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.....	5
2.1. REMARQUES GÉNÉRALES.....	5
2.2. COMMENTAIRES PAR SECTIONS DÉFINIES PAR L'EFSA	6
3. BIBLIOGRAPHIE.....	19
ANNEXE 2 : ELABORATION DES COMMENTAIRES.....	24
ANNEXE 3 : COMMENTAIRES TRADUITS EN ANGLAIS À DESTINATION DE L'EFSA ...	25
3.1. COMMENTS PER SECTION.....	25

1. Introduction

1.1. Contexte et enjeu de la saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 12 février 2013 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-ES-2012-104, portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du coton génétiquement modifié GHB614 pour la culture. Le dossier EFSA-GMO-ES-2012-104 a été déposé par la société Bayer CropScience dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003³(EC, 2003) auprès de l'EFSA⁴ via les autorités compétentes espagnoles.

Dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de mise sur le marché pour la culture 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 l'Espagne.

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 cotonnier GHB614 (Bayer CropScience) exprime le gène *2mepsps* codant une version mutée de la protéine EPSPS (5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) de maïs (*Zea mays*) qui lui confère une tolérance à l'herbicide glyphosate.

Le glyphosate est un herbicide non sélectif qui inhibe la fonction de l'enzyme EPSPS dans la majorité des plantes. L'EPSPS est une enzyme essentielle à la production des acides aminés aromatiques chez les plantes, les bactéries et les champignons. La tolérance au glyphosate est obtenue, dans le cotonnier, par l'ajout d'une copie mutée du gène *epsps* appelée *2mepsps*, afin de maintenir l'activité de la voie métabolique des composés aromatiques lors d'un traitement par l'herbicide. L'enzyme 2mEPSPS n'est pas inhibée par le glyphosate et le niveau d'expression obtenu dans le cotonnier GHB614 est suffisant pour conférer une tolérance à cet herbicide.

Ce cotonnier a été obtenu par transformation génétique d'explants de la variété Coker312 de *Gossypium hirsutum* avec une souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la cassette d'expression au sein de l'ADN-T du plasmide binaire pTEM2. L'événement GHB614 correspond à l'insertion d'une copie de la cassette d'expression en un locus d'insertion unique. Aucun autre transgène que celui porté par le fragment transféré n'est présent dans le cotonnier GHB614. L'insert suit un profil de ségrégation mendélien pour un caractère dominant situé à un locus unique.

Les régions flanquant la zone d'insertion ont été séquencées. L'analyse bioinformatique du locus de préinsertion indique qu'aucun gène connu ou séquence régulatrice ne sont affectés par l'insertion. La stabilité de l'insert a été étudiée jusqu'à la génération T7. Les résultats obtenus mettent en évidence la stabilité de l'insertion et de l'expression du transgène au cours des générations.

La quantité de protéine a été déterminée dans la plante ; elle est maximale dans les feuilles et dans les graines vêtues et détectable dans tous les tissus.

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. Les analyses statistiques mises en œuvre par le pétitionnaire souffrent de nombreuses faiblesses méthodologiques. Aucune analyse de puissance ne permet de justifier les conclusions avancées dans les sections « A.3. *Comparative assessment* » et « E.3.4. *Interactions of the GM plant with non-target organisms (NTOs)* ». Dans ces sections, il y a parfois confusion entre absence de différence significative et équivalence.
2. Certaines expérimentations présentent des dispositifs peu adaptés à l'obtention de données précises. C'est le cas des études de flux de gènes, de la viabilité du pollen, des études entomologiques et du suivi des repousses.
3. Certains points critiques sont minimisés, par exemple la capacité de germination, les flux de gènes et l'effet de l'usage du glyphosate sur l'acquisition de résistances. Le choix de certains paramètres agronomiques est inadapté pour évaluer les caractéristiques recherchées (par exemple : Seed Index pour la fécondité, Micronaire pour la qualité de la fibre...). L'ordre de grandeur de certains paramètres (% fibre, longueur...) est différent de ce qui est communément observé sur la variété Coker312.
4. Le plan de surveillance manque d'informations précises.

Autres remarques :

1. Le système racinaire du cotonnier est profond et permet la survivance à un hiver doux. S'il ne s'agit pas d'une plante envahissante, le cotonnier peut néanmoins persister plusieurs années sur un site en produisant une descendance.
2. L'introduction du gène *2mepsps* confère au cotonnier un avantage adaptatif hors culture dans les espaces entretenus par pulvérisation au glyphosate. Le pétitionnaire devrait prendre en compte l'utilisation du glyphosate notamment dans les zones non agricoles pour l'estimation de l'avantage sélectif du cotonnier GHB614 en cas de dissémination hors champ.

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 characterization

1. Information relating to the recipient or (where appropriate) parental plants

Le CS du HCB demande à ce qu'il soit bien précisé que le cotonnier cultivé, *Gossypium hirsutum*, est une plante pérenne (arbuste) et que son amélioration génétique n'a en rien changé son aptitude à persister longtemps dans son environnement. Seul son mode de culture, pour des raisons de productivité (meilleurs rendements en première année) et de lutte phytosanitaire (rupture des cycles des insectes ravageurs et maladies), impose une conduite annuelle dans l'assolement.

3. Comparative assessment

1. Le pétitionnaire conclut à de nombreuses reprises à l'équivalence sur la base de tests de comparaison. Le seul outil statistique proposé par le pétitionnaire est le *t*-test de comparaison de moyenne. A titre d'exemples :

« *For these compounds the proof of equivalence was done on basis of the by-site analysis (Rattemeyer-Matschurat, 2009, Oberdörfer, 2010c)* » (page 64).

Le premier lien est un document intitulé « *Analysis of **substantial equivalence** of transgenic and non-transgenic cotton by means of t-test for differences* », ce qui n'a pas de sens d'un point de vue statistique.

« ***No significant differences** between treatments mean values over all sites (p -value ANOVA for main effect treatment ≥ 0.05) were found for crude protein, phosphorus, potassium, free gossypol, most amino acids (except glycine and the five amino acids for which site*treatment interactions were detected), myristic (C14:0), palmitoleic (C16:1 ω 9), and cis oleic (C18:1) acid. In all these cases, **substantial equivalence** between data sets of GHB614 cotton and the conventional counterpart Coker312 groups can be stated.* » (page 66)

« ***No significant difference** between treatments mean values over all sites (p -value ANOVA for main effect treatment ≥ 0.05 in Table 24) was found for seed index. In this case, **substantial equivalence** between data sets of the conventional counterpart Coker312 and GHB614 cotton can be stated.* » (page 74)

2. Le pétitionnaire fait référence à l'avis de l'EFSA pour l'importation du coton GHB614 en Europe (EFSA, 2009) qui est antérieur aux nouvelles recommandations concernant l'utilisation des tests d'équivalence (EFSA, 2010a, 2010b) et qui concluait « *Based on comparative analyses, the EFSA GMO Panel concluded that cotton GHB614 is compositionally and agronomically equivalent to the non-GM counterpart and other conventional cotton except for the introduced trait* » (page 11).

La parution des nouvelles lignes directrices (EFSA, 2010b) rend caduque la conclusion (page 77) « *EFSA has already assessed and confirmed the compositional equivalence of GHB614 cotton and its conventional counterpart Coker312 grown in the US environment (EFSA, 2009a M-360059-01-1).* »

Le CS du HCB demande donc que les analyses statistiques de tout nouveau dossier soient conformes aux nouvelles recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010b).

3. A plusieurs reprises, le pétitionnaire trouve des différences statistiquement significatives lorsqu'une analyse globale (tous sites confondus) est effectuée. Il effectue alors des analyses site par site qui ne présentent plus de différences statistiquement significatives.

« The t-tests showed significant differences (p-values in t-tests < 0.05) in both individual treatment comparisons (A vs B and A vs C) for both parameters (Table 24). However in the by-site analysis, at the majority of sites no significant differences were observed. » (page 72)

« Overall treatment effects (p-value ANOVA for main effect treatment < 0.05) were found for number of embryos (seed/boll) and time to maturity (days to 1st open boll), so that the individual treatment comparisons had to be evaluated. As stated above, in the by-site analysis; at the majority of sites no significant difference was observed. » (page 73)

« Overall treatment effects (p-value ANOVA for main effect treatment < 0.05) were found for number of developed nodes, so that the individual treatment comparisons had to be evaluated. However in the by-site analysis; at the majority of sites no significant difference was observed. » (page 74)

Le CS du HCB remarque que l'absence de significativité peut être due à un manque de puissance puisque les effectifs des échantillons se trouvent réduits dans le cadre de comparaisons site par site.

4. Le pétitionnaire reconnaît que des différences statistiquement significatives n'ont pas forcément de sens biologique :

« The individual comparisons also showed significant differences for length uniformity, short fiber index and fiber elongation. But the relevance of the statistical differences is negligible for the following reasons:

- an absolute difference in fiber length of 0.03 inch does not mean a real difference in the fibre quality;*
- the average percentages for the fiber length uniformity were 83.2%, 85.2% and 85.4% which qualifies the fiber of all three regimens as high to very high quality;*
- the short fiber index is for all fiber types good, with slightly better results for the fibers from the GHB614 cotton plants;*
- the fiber strength is for all three fiber types ≥ 30 g/tex which is a very high strength;*
- the absolute difference in fiber elongation is maximum 0.7 %. which is also a very small difference and comparable to the variation within the Coker312 regimen. »* (page 74)

Ou bien a recours à des données historiques pour conclure à l'absence de significativité biologique :

« Only for the anti-nutrient CPFAs the majority of sites had statistically significant differences. In this case, the differences between the mean values are very small, they are within the range from the literature and the values for GHB614 cotton are lower than for the conventional counterpart were considered not biologically relevant. » (page 67)

Le CS du HCB souligne i) que la capacité du test à mettre en évidence une différence biologiquement significative ne peut être établie qu'après une analyse de puissance, ii) que l'hypothèse qu'il existe une différence biologiquement significative ne peut être rejetée qu'au moyen d'un test d'équivalence.

5. Sans remettre en question la validité biologique des conclusions avancées par le pétitionnaire, le CS du HCB souligne que ce n'est pas sur la base d'arguments statistiques que ces conclusions peuvent être formulées. Les arguments avancés par le pétitionnaire restent en effet très empiriques.

3.2 Field trials: experimental design and statistical analysis

Les distances d'isolement de 3,8 m entre parcelles « *the plots of each treatment regimen were separated by a minimum of 3.8 metres (planted with conventional cotton)* » (page 60) ne permettent pas d'éviter la pollinisation croisée mais de contribuer à sa réduction. En effet des taux d'hybridation de 2 % sont encore possibles à 5 m (Heuberger et al., 2008; Hofs et al., 2007). De même, les résultats fournis par le pétitionnaire au tableau 33 (page 106) convergent dans ce sens (il est observé un taux d'hybridation moyen de 2 % à 6 m). Les flux de pollen n'ont pas d'incidence sur la qualité de la fibre (issue d'un tissu maternel) mais par contre peuvent avoir un effet sur l'albumen (triploïde, après fusion de deux noyaux du sac embryonnaire et un noyau du pollen) et donc sur les résultats des travaux réalisés à partir de ces graines.

3.4 Agronomic and phenotypic characteristics

1. Le CS du HCB s'interroge sur les méthodologies mises en place dans ces études et note le caractère peu adapté de certains dispositifs utilisés :

En ce qui concerne les caractéristiques morphologiques de la plante, le pétitionnaire évalue la fécondité au moyen du *seed index* (page 72) qui se définit généralement par le poids de 100 graines et non par le poids de graines contenues dans 10 capsules (Khan et al., 2010). De plus cette caractéristique ne reflète pas la fécondité : chez le cotonnier, il s'agit d'un caractère variétal de surcroît fortement dépendant de l'environnement.

Concernant les caractéristiques reproductives de la plante (page 73), Currier (2006b) utilise la méthode de Barrow (Barrow, 1983) pour évaluer la viabilité du pollen de GHB614. Cette méthode ne permet pas de mettre en évidence les différences éventuelles suite à l'application de glyphosate (Pline et al., 2003) contrairement à la méthode fluorochromatique FCR (Heslop-Harrison et al., 1984; Pline et al., 2002). La difficulté de discerner précisément les tubes polliniques intacts de ceux endommagés au moyen de la méthode simple de Barrow représente un facteur limitant. L'ajout de bleu d'aniline aurait favorisé les comptages.

Par ailleurs Currier (2006b) ne compare la viabilité du pollen sauvage qu'au pollen de GHB614 non traité au glyphosate or c'est dans des conditions d'utilisation de glyphosate que le pollen aurait dû être étudié.

Le CS du HCB s'interroge sur les conséquences de d'une expression très faible du gène *2mepsps* dans les grains de pollen qui pourrait poser un problème de viabilité en conditions de traitement herbicide puisque le dernier traitement au glyphosate est réalisé environ 62 jours après le semis (Villagran et Cabrera, 2008a) et correspond à l'apparition des premières fleurs (tableau 25).

Par ailleurs, le micronaire (page 74) n'est qu'une indication grossière de la finesse de la fibre : il tient compte de la finesse intrinsèque de la fibre et de sa maturité (fortement dépendante de l'environnement) mais ne reflète pas une caractéristique variétale. Le pétitionnaire aurait dû utiliser la finesse standard (Hs).

2. Dans le tableau 24 (page 73), comment le pétitionnaire explique-t-il le grand nombre de sites dans lesquels il existe une différence significative entre Coker312 et GHB614 pour les variables *Short Fiber Index* et *% Lint* ? Il s'agit de caractères variétaux qui ne devraient pas varier entre lignées « quasi » isogéniques, une discussion de ces différences est attendue par le CS du HCB.

3. L'étude de Sowig (2010) compare l'abondance des insectes en absence/présence de traitement insecticide (page 75) mais fait abstraction de l'usage d'herbicide. Existe-t-il une interaction entre traitement insecticide et herbicide pour les régimes A, B et C ? Dans l'analyse statistique des données de ces essais, Sowig (2010) réalise des tests non-

paramétriques de Kruskal-Wallis qui ne permettent de détecter des différences que globalement dans l'ensemble des traitements. Ces tests ne renseignant pas sur les différences entre traitements (pris deux à deux), l'analyse devrait être poursuivie.

4. Concernant les tableaux 24 et 25 (page 76) :

Que désigne *range of commercial varieties* ? Sont-ce les données extrêmes relevées dans la littérature ou celles observées dans les essais de Bayer CropScience en Espagne avec les cultivars locaux ?

Les valeurs de % *Lint* (rendement à l'égrenage) sont extrêmement élevées. La base de données concernant les ressources génétiques coton conservées au CIRAD (renfermant certaines variétés commerciales utilisées comme témoin par le pétitionnaire) indique des % *Lint* compris dans une fourchette de 31,9 % et 42,9 %. De plus, le mode d'égrenage à la scie tel qu'il a été pratiqué dans les essais du pétitionnaire devrait donner des valeurs inférieures à l'égrenage au rouleau (pratiqué par le CIRAD). La lignée Coker312 présente un rendement à l'égrenage moyen de 39,9 % (source : Banque de gènes CIRAD, 2008), le chiffre de 45,4 % présenté dans le dossier semble donc surestimé.

Les résultats de l'analyse statistique montrent qu'il existe des différences entre GBH616 (issus de l'autofécondation répétée de la descendance du Coker312 transformé, GBH614/T6 et T7) et la variété quasi isogénique témoin. Dans le tableau 24, les variables % *Lint*, *Length* et *Short Fibre Index* et dans une moindre mesure *Strength* et *Elongation*, montrent une interaction génotype x environnement surprenante pour deux génotypes quasi isogéniques.

Concernant les paramètres de la fibre, les résultats sont identiques et semblent avoir été copiés par erreur à partir de la dernière ligne *Disease susceptibility*. Le pétitionnaire devrait corriger le tableau.

5. En ce qui concerne les caractéristiques des graines et le « *seed index* » en particulier, il existe des différences entre traitements dans un site, contrairement à ce qui est déclaré par le pétitionnaire « *No significant difference between treatments mean values over all sites (p-value ANOVA for main effect treatment ≥ 0.05 in Table 24) was found for seed index. In this case, substantial equivalence between data sets of the conventional counterpart Coker312 and GHB614 cotton can be stated.* » (page 74).

6. Selon Oberdörfer (2011), la viabilité du pollen de GHB614 est plus faible que celle du témoin de manière indépendante de l'application de glyphosate « *over the top* » (sur plante fleurie). Le CS du HCB estime qu'une étude complémentaire devrait être menée pour clarifier l'effet de l'introgression du transgène sur ce caractère.

3.6 Conclusions

Il existe des différences agronomiques entre GHB614 et Coker312, contrairement à ce qui est conclu par le pétitionnaire « *In the present application it has been shown that GHB614 cotton is agronomically and phenotypically equivalent to its conventional counterpart Coker312 when grown in Europe.* » (page 77).

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.

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.

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.

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.

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.

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.

E. ERA

2.3 Exposure scenarios

Le pétitionnaire soutient l'hypothèse selon laquelle des graines incorporées au sol à des températures inférieures à 15°C pourraient avant de pouvoir germer l'année suivante « *If incorporated before the soil temperature reaches 15°C, it is likely to rot in the soil.* » (page 101). Le CS du HCB demande que cette hypothèse soit vérifiée par des expérimentations.

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

3.1.1 Step 1: Problem formulation

1. Les deux références (*Flora Europaea*, 1968 ; Polunin, 1980) sont trop anciennes pour que le CS du HCB puisse se faire une idée quant aux éventuelles populations férales existantes dans les 3 pays prévus pour la culture : Espagne, Grèce et Bulgarie. Une bibliographie plus récente ou une enquête de terrain devrait permettre de connaître la ligne de base actuelle en populations férales qui risquent de poser problème (Bagavathiannan and Van Acker, 2008).

2. Le CS du HCB regrette que le pétitionnaire n'ait pas proposé de références sur les taux de repousses dans les différentes conditions pédo-climatiques prévues pour la culture (Espagne, Grèce et Bulgarie), alors que c'est un problème aux USA et en Australie (Roberts et al., 2002).

3. La présence de repousses a été constatée en fin d'expérimentation pour les essais menés en 2007 et 2008 « *A limited number of volunteers was detected in post-release monitoring and*

were managed using mechanical or chemical techniques (Martinez, 2010). » (page 107). Il aurait été préférable de poursuivre la surveillance des essais pour s'assurer que ces repousses ne survivent pas même si les cultures de coton ne doivent pas aller au-delà de 2 ans en Espagne.

4. Dans les études de Villagran (2008a,b et 2009b), les dates de resemis pour l'étude de « *regrowth and survival* » sont trop tardives par rapport à la date effective de récolte (« *One month after the seeds were sown no seed germination was observed in either GHB614 cotton seeds or its conventional counterpart Coker312 seeds one month after they were planted.* » (page 103)). Ce scénario n'est pas réaliste. En effet les semences produites au champ sont semées un mois après la récolte lorsque les conditions climatiques sont peu favorables et ne laissent guère de chance à la germination.

En Andalousie, les premières capsules de coton s'ouvrent 120 jours après la levée, soit à la mi-septembre pour un semis en mai. Bien que la plus grande partie de perte au sol de coton-graine ait lieu à la récolte, les graines des premières capsules sont susceptibles de tomber accidentellement et par conséquent le CS du HCB souhaite que le « *worst case scenario* » soit discuté sur ces bases.

5. Concernant les insectes floricoles du cotonnier (page 103) :

- La liste des pollinisateurs devrait être complétée par des espèces de Coléoptères (Pierre and Hofs, 2010) et de guêpes. Par ailleurs, le pétitionnaire ne précise pas quels insectes en Europe seraient les plus susceptibles d'être vecteurs, alors que la capacité de pollinisation entomophile varie selon les insectes (Van Deynze et al., 2005; Kareiva et al., 1994).

- Bien que le coton soit majoritairement autogame, le CS du HCB considère que la dissémination longue distance du pollen par des insectes pollinisateurs croisés connues pour améliorer le rendement de la culture (OECD, 2008) est insuffisamment prise en compte. Le pétitionnaire ne présente pas d'arguments soutenant l'hypothèse selon laquelle cette dissémination serait peu probable (Heuberger et al., 2008, 2010; Llewellyn et al., 2007).

6. Concernant les éventuels croisements entre GHB614 (de l'espèce *Gossypium hirsutum*) et l'espèce diploïde sauvage *Gossypium herbaceum*, la production de graines viables est possible chez l'hybride. Des hybrides *G. herbaceum* x *G. hirsutum* ont été obtenus sans émasculature des fleurs de la plante receveuse et représentaient 2% des graines récoltées. Les hybrides produits proviennent de gamètes non réduits et peuvent se développer sans pour autant produire des graines en régime d'autofécondation libre (Pannetier et al., 2009). Cette hypothèse devrait par conséquent être discutée dans les questions 4 à 7 et 9 lors de la formulation du problème.

« 4. *Will the GM plant be more persistent than conventional counterparts under agricultural conditions?*

5. *Will the GM trait increase the fitness of the GM plant or compatible relative under agricultural conditions?*

6. *Can the GM plant form feral population under EU conditions?*

7. *Can the GM plant hybridise with sympatric compatible relatives outside production systems?»* (page 104) et 8, 9 « 8. *Will the GM trait alter the fitness of feral plants or compatible relatives in semi-natural habitats?*

[...]

9. *Will the GM trait alter the range of feral plants or populations of compatible relatives?»* (page 107)

De plus les résultats de dissémination longue distance (et d'introgression dans des populations locales mexicaines) ne sont pas référencés (Wegier et al., 2011) ni leur

implication discutée pour l'Europe.

7. Le pétitionnaire propose l'isolation physique des cultures avec des plantes attractives pour les pollinisateurs afin de réduire les mouvements du pollen « *In addition, physical isolation with plants attractive to the bees significantly reduces the potential for pollen movement* » (page 103). Le CS du HCB pense qu'il est fort improbable qu'à l'échelle de l'exploitation ceci soit réaliste ni réalisé.

8. Concernant les essais de flux de pollen (page 104) réalisés par Aelvoet et Freyssinet (2007 et 2008) :

- Le CS du HCB juge le dispositif trop élémentaire.

« *A central 12 x 12 meter plot of GHB614 cotton, in Coker312 background, was planted into a 12 meter perimeter of the commercial variety Flora, in two different locations in 2006 (Table 31). Four plants from each perimeter border row on all four corners of the seed plot were tagged and harvested on a plant by plant basis. Plant samples represented distances from 1 to 12 meters in 1 meter increments from the pollen donor plots. Starting from each corner of the seed block, the 4 tagged plants were harvested from each row in a perpendicular line moving away from the center of the GHB614 seed plot. Four negative control plants were tagged in the outer border row (independent from the previously selected plants). In addition four positive control plants were tagged in the glyphosate tolerant plot.* »

Les quatre transects suivant les bissectrices de la parcelle carrée auraient dû être complétés par quatre sécantes perpendiculaires aux bords de la parcelle. Ce dispositif aurait permis de mieux évaluer les effets de vent dominant sur le déplacement des insectes et éventuellement trouver des fréquences d'hybridation plus élevées.

- Le CS du HCB aimerait savoir à quel stade le criblage des plantules issues du semis des capteurs à pollen a été réalisé.

- Le CS du HCB se demande pourquoi avoir attendu 9 mois pour semer les graines en serre (milieu protégé) et dans quelles conditions les graines ont été stockées. Une perte de pouvoir de germination, couplée à de faibles pourcentages d'hybridation, pourrait avoir un effet notable sur les résultats présentés.

9. Concernant la phrase « *The agronomical and compositional equivalence between GHB614 cotton and its conventional counterpart (Coker312) was confirmed in both cases* » (page 104), il n'y a pas eu de tests d'équivalence pour les caractères agronomiques mais il a été noté que les caractéristiques variaient dans des limites acceptables pour la culture et l'environnement.

10. Concernant la germination des graines vêtues :

« *Commercial seeds of G. hirsutum typically require some form of treatment to ensure adequate germination: heat treatment and a sulfuric acid delinting treatment to remove fuzz or linters from the seed coat (the delinted seed is also known as 'black' seed). Seed cotton and fuzzy seed germinate poorly, probably because the lint and linters attached to the seed coat limit contact with soil thereby inhibiting imbibing soil moisture (OGTR, 2008).* » (page 106).

Le pétitionnaire minimise leur potentiel de germination, il n'est pas absolument nécessaire de délinter les semences pour qu'elles germent de façon satisfaisante. Les graines vêtues peuvent atteindre 85% et les taux de germination courants sont de l'ordre de 60% (Lançon and Klassov, 1988). Les semences délintées nécessitent moins d'humidité pour initier la germination mais ont besoin d'humidité supplémentaire pour poursuivre le développement et atteindre le stade plantule. Par contre, dans le cas des graines vêtues, elles ne germent pas en dessous d'un niveau d'humidité cumulé. Si ce niveau est atteint, le processus de germination se déclenche et permet le développement jusqu'au stade plantule. Cela signifie que les graines délintées sont plus sensibles à la sécheresse durant la germination. Ces

facteurs influent sur la dissémination possible du coton GM, le taux de repousses et le maintien ou le développement de populations férales.

11. La dispersion accidentelle des graines lors du semis et des opérations de post-récolte n'a pas été discutée (page 107). La présence de repousses pouvant aboutir à la formation de populations férales dans les canaux d'irrigation, drains et routes devrait être discuté (AgBios, 2007; Messéan et al., 2006).

12. Concernant la question « 8. *Will the GM trait alter the fitness of feral plants or compatible relatives in semi-natural habitats?* » (page 107), dans des conditions similaires à celles de l'Andalousie, même avec un hiver un peu plus froid, des populations férales de cotonniers GM survivent le long des routes de la Province du Mpumalanga en Afrique du Sud (Hofs and Hau, 2006). Dès lors le caractère de résistance au glyphosate peut impacter l'adaptation des plantes férales s'il s'agit de populations implantées en bordure de route et traitées au glyphosate lors de l'entretien des infrastructures. Le pétitionnaire devrait s'informer sur l'usage du glyphosate en matière d'entretien des routes et si son utilisation était avérée, il devrait produire des résultats sur la persistance éventuelle de cotonniers dans ces conditions particulières. Ces informations sont nécessaires tant pour les plans de surveillance que pour la coexistence entre cultures OGM et non-OGM.

3.1.3 Step 3: Exposure characterization

Les graines de coton sont triturées pour produire de l'huile et du tourteau. Les graines sont également utilisées directement pour l'alimentation animale (en Espagne comme signalé par le pétitionnaire). Il conviendrait donc que les voies de transport soient surveillées, selon un protocole à fournir, surtout si leurs abords sont, comme en France, traités au glyphosate. Une attention particulière devrait être portée aux fermes qui utilisent les graines entières pour l'alimentation animale.

3.2 Plant to micro-organisms gene transfer

3.2.1 Step 1: Problem formulation

1. Le CS du HCB note que de façon générale la bibliographie proposée est ancienne et devrait citer par des travaux plus récents.

2. Le pétitionnaire indique: « *Under field conditions, soil has been show to inhibit such transformation.* » (page 109) or des événements de transformation ont été observés directement ou indirectement dans le sol, mais pas forcément avec l'ADN des plantes transgéniques. De plus en conditions au champ, des transferts pourraient avoir lieu dans la plante saine (Kay et al., 2002) ou en décomposition (Pontiroli et al., 2009). Puis le pétitionnaire indique : « *and HGT from plants to microbes has not yet been demonstrated in non-sterile soil (Thomson, 2001).* » Au sens strict, ceci n'est exact uniquement que si on considère que du matériel végétal en décomposition dans le sol peut être assimilé à l'environnement « sol ».

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

Les analyses statistiques sont décrites dans Sowig, 2007; 2009; 2010. L'objectif de ces études est d'établir s'il existe des différences entre les nombres d'animaux capturés dans des parcelles de coton OGM ou conventionnels, traités ou non traités. La même procédure est mise en œuvre indépendamment sur différents sites, à différentes périodes, et pour différentes variétés d'animaux.

1. Les distributions sont représentées graphiquement au moyen de boxplots, même lorsque les effectifs sont très faibles. Une telle représentation n'a aucun sens pour le CS du HCB.

2. Pour chaque période, chaque site et chaque variété, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis est mis en œuvre. Ce test n'a aucune puissance dans une telle situation. En raison de ce manque de puissance, chaque test individuel n'a aucune chance d'être statistiquement significatif. On peut néanmoins regrouper des sites, des périodes (voire des variétés) pour gagner en puissance et voir si un effet se dégage ou non. Le CS du HCB recommande l'utilisation d'un modèle global qui permettrait peut-être de mettre en évidence une différence entre OGM et non OGM.

3. Lorsqu'il y a plusieurs groupes OGM traité, OGM non traité, non OGM traité et non OGM non traité, la comparaison étant globale, le test utilisé ne permet pas de discerner un effet de la modification génétique.

3.5 Impacts of the specific cultivation, management and harvesting techniques

3.5.1 Step 1: Problem formulation

1. Le pétitionnaire mentionne (page 132) seulement 4 taxa de mauvaises herbes en culture cotonnière en Espagne : *Solanum nigrum*, *Abutilon theophrasti*, *Medicago* et *Cyperus spp.*

En effet, la problématique de l'enherbement avait été partiellement résolue au moyen du semis sous film plastique (Junta de Andalucía, 2002; Robledo de Pedro and Martín Vicente, 1981). Mais cette pratique est en voie d'abandon pour des raisons économiques et environnementales (déchets) et la liste actuelle des adventices du cotonnier dans les agrosystèmes espagnols est plus étendue que mentionné par le pétitionnaire (INFOAGRO, 2013).

Par ordre d'importance et de difficulté de contrôle, on distingue notamment: *Convolvulus spp.*, *Solanum nigrum*, *Cyperus spp.*, *Echinochloa sp.* Deux groupes particulièrement ciblés sur le plan de la résistance au glyphosate peuvent être distingués :

- les espèces ou genres ayant des biotypes résistants au glyphosate dans les pays non européens (*Amaranthus spp.*, *Digitaria spp.*, *Echinochloa spp.*, *Poa spp.*, *Sorghum halepense*),
- les espèces présentant des biotypes résistants au glyphosate en Espagne (*Lolium multiflorum*, *L. rigidum*).

Il n'existe pas encore de publication recensant certaines nouvelles espèces invasives introduites en Espagne et présentant des biotypes résistants au glyphosate (*Conyza canadense*, *C. bonariensis*, *C. sumatrensis*) mais il serait nécessaire de faire le point sur l'éventuelle présence de ces espèces dans les cultures cotonnières sachant qu'elles posent des problèmes dans les vergers (olivier et pêchers) du Sud de l'Espagne (González-Torraiva et al., 2012).

2. « *The commercial management regime for the GHB614 cotton varieties is the same as for conventional cotton* » (page 133). Il serait plus opportun de nuancer « is nearly the same as... »

3. Il n'existe pas d'étude sur les effets de l'application du glyphosate sur les invertébrés superficiels en culture cotonnière. L'étude d'Albajes et al. (2011) n'a pas le recul nécessaire pour aboutir à des conclusions valables. Les informations concernant les autres cultures ne peuvent être considérées que comme des indications « *A study performed with HT maize in Spain concluded that significant changes in heteropteran predator densities from moderate alterations in weeds arising from the deployment of herbicide-tolerant corn varieties are not expected (Albajes et al., 2011)* » (page 134).

4. Concernant l'impact potentiel de GBH614 sur l'acquisition de résistance au glyphosate « *Potential environmental impacts of GHB614 cultivation on weed shifts and the selection of weed communities composed of more tolerant or resistant species.* » (page 134), la résistance existait avant l'introduction des PGM sur certaines espèces (Heap, 2013) : *Plantagolanceolata* en Afrique du Sud, *Lolium rigidum* en Australie et en France où aucune PGM n'a été introduite. Par contre, aux Etats Unis où le MON01445-2 a été introduit en 1995, plusieurs biotypes se sont révélés postérieurement résistant au glyphosate. C'est le cas pour trois espèces d'*Amaranthus* spp. (2005 et 2012), de *Lolium multiflorum* (2004) et de *Conyza canadensis* (2000), (Green and Owen, 2011; Owen and Zelaya, 2005; Price et al., 2011; Webster and Nichols, 2012). L'adoption de plantes cultivées résistantes au glyphosate aux Etats-Unis a accentué le phénomène de sélection de résistance (Fok, 2011). Sachant qu'il existe déjà des biotypes résistants au glyphosate dans les agrosystèmes espagnols, l'introduction de GHB614 devra au minimum s'accompagner d'une gestion raisonnée et d'une cartographie des points critiques.

5. En ce qui concerne l'usage de glyphosate en combinaison avec un autre herbicide « *The use of glyphosate in combination with another herbicide will increase weed control efficacy and will delay herbicide resistance in weeds without causing any potential adverse effects (discussed in Devos et al., 2008).* » (page 135), les informations (Devos et al., 2008) sont valables pour le maïs mais pas pour le coton. Par conséquent le CS du HCB demande au pétitionnaire des informations relatives à la culture cotonnière. Par ailleurs, des informations spécifiques sur la modification de la composition des espèces de mauvaises herbes devraient être apportées. En effet l'usage répété du glyphosate dans les systèmes de culture engendre des modifications dans la prévalence des espèces d'adventices (Webster and Nichols, 2012).

6. Sur le plan de la caractérisation du danger : Le risque n'est pas faible contrairement à ce que le pétitionnaire peut indiquer (page 136), l'introduction de GHB614 et de son traitement herbicide pouvant accélérer la sélection de mauvaises herbes tolérantes au glyphosate.

7. Le CS du HCB regrette que la puissance statistique des tests mis en place dans cette partie ne soit pas mentionnée. Ce qui ne permet pas de se faire une idée de la pertinence des résultats.

3.5.3 Step 3: Exposure characterization

1. Le pétitionnaire fournit un rapport sur une « ligne de base » des pratiques culturales en cotoniculture (page 137) très peu détaillée en particulier en ce qui concerne les variations de pratiques agricoles entre cotoniculteurs, au sein et entre états membres (Rüdelsheim and Smets, 2012). Le CS du HCB considère que ces généralités ne peuvent être considérées comme une ligne de base.

2. Le pétitionnaire ne précise pas quels insectes en Europe seraient les plus susceptibles d'être vecteurs, alors que la capacité de pollinisation entomophile varie selon les insectes (Van Deynze et al., 2005; Kareiva et al., 1994).

3. Le CS du HCB regrette que le pétitionnaire n'ait pas proposé de références sur les taux de repousses dans les différentes conditions pédo-climatiques prévues pour la culture (Espagne, Grèce et Bulgarie), alors que c'est un problème aux USA et en Australie (Roberts et al., 2002).

4. Au niveau du champ, l'adoption de pratiques de conservation (*SCV* ou *labour minimum*) (page 136) peut faciliter le développement d'adventices résistantes (Dinelli et al., 2008) ou de

changement de profil des espèces d'adventices (Owen, 2008; Reddy et al., 2004). Au niveau du paysage ou de l'exploitation, l'adoption du GHB614 peut modifier la rotation s'il s'accompagne de l'introduction de pratiques de conservation et de culture sous couvert végétal (Givens et al., 2009a; Price et al., 2011).

3.5.4 Step 4: Risk characterization

Le CS du HCB souhaiterait une discussion plus approfondie en ce qui concerne la caractérisation du risque (page 137), le possible changement vers des techniques de culture de conservation utilisant le coton GHB614 impliquant des modifications dans les rotations culturales (et l'usage d'herbicides), associés à une prévalence de l'acquisition de résistance parmi les adventices en Espagne.

3.5.5 Step 5: Risk management strategies

Conformément aux lignes directrices de l'EFSA, des stratégies de gestion des risques doivent être proposées par le pétitionnaire (plan de rotation en culture de conservation, plans intégrés de gestion des mauvaises herbes) (page 137).

4. PMEM

1. Le CS du HCB aurait apprécié que le pétitionnaire fasse référence au suivi des cultures de GHB614 aux USA et au Brésil, ainsi qu'à celui d'autres cotons tolérants au glyphosate, comme par exemple : (Givens et al., 2009b, 2011; Green and Owen, 2011; National Academy of Science, 2010) , et qu'il les commente pour le cadre européen.,

2. Le CS du HCB s'étonne d'un plan de surveillance générale aussi peu détaillé :

- Aucun détail sur le nombre de fermes prospectées hormis qu'elles seront situées dans les zones actuelles de culture.
- Aucune indication sur la prospection éventuelle en dehors des champs de coton (autres champs d'une même ferme ou zones non agricoles) en particulier pour apprécier l'impact des changements de pratiques culturales sur la biodiversité. Il est prévisible, au vu des cultures de coton tolérant au glyphosate aux USA et des essais de cultures tolérantes au glyphosate des FarmScale Evaluation, que la biodiversité sera affectée, surtout si la pratique du « sans labour » se généralise, ex : (Bigler and Albajes, 2011; van den Brink et al., 2010; Carpenter, 2011).
- Aucune précision sur la puissance des tests statistiques prévus.
- Aucune indication quant à une éventuelle veille bibliographique.
- Aucune précision sur les réseaux existants qui seraient activés au sein de, ou via, EuropaBio.
- Aucune précision sur la base de données proposée sur les résultats des questionnaires aux cotoniculteurs.

3. Le CS du HCB souligne un problème général associé aux questionnaires destinés à être remplis par des agriculteurs. D'une part, les agriculteurs n'ont souvent pas tous les outils pour répondre de manière appropriée au questionnaire, et d'autre part, les réponses apportées peuvent présenter un biais stratégique au sens où les agriculteurs n'ont pas nécessairement intérêt à fournir des réponses conformes à la réalité. Pour remédier à ce double problème, le CS du HCB propose de faire reposer la surveillance générale non plus majoritairement sur l'outil du questionnaire mais plutôt sur une collecte d'informations dans les champs par des personnes formées, dans le cadre de réseaux d'observation indépendants aux méthodologies bien définies. Par ailleurs les questions sur la présence de vie sauvage (section 3.7 du questionnaire aux agriculteurs) sont formulées de manière très générale et ne permettent pas

d'avoir une indication fine et claire sur l'évolution de la vie sauvage dans et autour de la parcelle.

4. Le CS du HCB demande que le pétitionnaire propose un véritable plan de surveillance générale environnementale exposant effectivement les méthodologies et moyens dévolus à ce plan de surveillance.

Le pétitionnaire devra préciser :

- le nombre de parcelles échantillonnées
- le nombre de points échantillonnés par parcelle
- le rythme de collecte des données par point (un seul par an, un par semaine...), qui dépend de la biologie des espèces, uni ou multivoltines⁶ par exemple
- communautés suivies, sur différents critères : rôle important dans les agro-écosystèmes (contrôle des ravageurs, pollinisateurs), groupes clés dans le fonctionnement plus général des écosystèmes, ou témoins de leur bon fonctionnement, parce qu'au sommet des chaînes trophiques. Pour des raisons de faisabilité, il convient de choisir des types d'organismes aisément observables. Basé sur l'existant, on peut proposer *a minima* le suivi des communautés suivantes : oiseaux, papillons, chiroptères, lombrics, flore des bords de routes,
- le type de données collectées
- pour les communautés suivies : nombre d'espèces, abondance
- caractérisation des parcelles, d'un point de vue pédo-climatique, des paysages entourant les parcelles
- le protocole de recueil de ces données
- les méthodes d'analyse des données : analyse à l'échelle des communautés, prenant en compte les traits biologiques des espèces. Les indicateurs choisis, c.à.d. les métriques utilisées pour résumer les données collectées, nécessaires pour aller au-delà de l'idiosyncrasie des espèces, devront permettre d'avoir une puissance statistique suffisante.

5. Le CS du HCB souhaite que le risque de développement d'adventices résistantes au glyphosate fasse l'objet d'une surveillance spécifique. Des plantes adventices résistantes au glyphosate pourraient se développer en conséquence de mauvaises pratiques agricoles d'utilisation du glyphosate sur le coton GHB614. Cette remarque ne concerne pas un impact direct de la modification génétique sur l'environnement, mais souligne le risque de perte d'un outil de gestion des mauvaises herbes, dommageable pour l'agriculteur, qui devra faire appel à des pratiques alternatives dont certaines pourraient avoir un impact potentiellement plus important sur l'environnement.

6. Le CS du HCB demande au pétitionnaire que le plan de surveillance générale s'étende au-delà de la durée d'autorisation et que les coordonnées GPS/cadastrales des fermes auditées soient fournies dans les rapports annuels de façon à assurer un suivi pluriannuel des cultures. Le pétitionnaire devra également prévoir que ces données soient géolocalisées et intégrables au sein d'une base de données européenne centralisée incluant aussi les données des plans de surveillance d'autres pétitionnaires ainsi que d'autres données de pratiques agricoles.

⁶ Une espèce (insecte) capable de produire plusieurs générations par an.

7. Le CS du HCB demande que l'analyse des données recueillies et des traitements statistiques du plan de surveillance générale se réfère aux nouvelles règles d'analyse statistique proposées par l'EFSA (EFSA, 2010a), qui recommandent la mise en œuvre de procédures statistiques adaptées.

8. Le CS du HCB recommande de mobiliser en amont, et non *a posteriori*, des biostatisticiens pour définir conjointement les protocoles de surveillance. Il est primordial de configurer des protocoles avec un échantillonnage adéquat, et les outils statistiques adaptés et capables de détecter de faibles variations dans le temps avec une puissance statistique appropriée. Sur la base de propositions des biologistes pour les espèces pertinentes à surveiller, les biostatisticiens pourraient proposer un nombre de parcelles et un nombre d'échantillons par parcelle judicieux à analyser. Afin d'estimer ces nombres, il semble utile de faire une revue bibliographique de la variance des variables qui seront mesurées, ou de procéder à une estimation de cette variance, en l'absence d'information disponible dans la littérature.

9. Le CS du HCB rappelle au pétitionnaire qu'il est de son devoir, au cours de la période couverte par la demande de renouvellement, si elle est accordée, d'apporter son concours pour la bio-surveillance liée à l'utilisation des biotechnologies qu'il commercialise, quand celui-ci sera sollicité par les autorités nationales compétentes.

10. Le questionnaire destiné aux agriculteurs devrait être complété : coordonnées SIG des parcelles, différenciation « *direct sowing* » (semis direct) en « *no tillage* » (sol non travaillé) et autre pratique, culture intermédiaire ou pas, quantités de pesticides et périodes et types d'application (pré- ou post-levée), donner plus de place aux commentaires pour les causes de changements de pratique de lutte contre maladies et parasites, culture de GHB614 sur une ou plusieurs années, etc.

11. Les méthodes d'analyse des résultats de ces questionnaires devraient être précisées, avec tests de puissance et donc échantillonnages, appréciation de la représentativité des agriculteurs concernés.

12. Le CS du HCB regrette que les questionnaires fassent appel de manière importante à la subjectivité et ne proposent pas d'outils de quantification.

13. Le pétitionnaire fait référence aux lignes directrices (EFSA, 2006) des plans de surveillance et ne prévoit donc pas d'expérimentations. Les nouvelles lignes directrices (EFSA, 2011b) prévoient pourtant des expérimentations de façon à déterminer des lignes de base et des indicateurs à surveiller. Le plan de surveillance générale du pétitionnaire mérite donc d'être actualisé pour tenir compte des nouvelles lignes directrices EFSA en matière de plans de surveillance générale et fournir des précisions sur la façon dont il compte établir les lignes de base propres aux diverses régions pédo-climatiques.

14. Le pétitionnaire annonce que des guides de bonnes pratiques seront fournis aux agriculteurs. Aucune précision n'est fournie quant à ces lignes directrices de bonnes pratiques culturales.

3. Bibliographie

AgBios (2007). Pre Market ERA of transgenic Plants: A case study approach utilizing MON15985 cotton.

Bagavathiannan, M.V., and Van Acker, R.C. (2008). Crop fertility: Implications for novel trait confinement. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 127, 1–6.

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

Bigler, F., and Albajes, R. (2011). Indirect effects of genetically modified herbicide tolerant crops on biodiversity and ecosystem services: the biological control example. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit* 6, 79–84.

Van den Brink, L., Bus, C.B., Franke, A.C., Groten, J.A.M., Lotz, L.A.P., Trimmer, R.D., and van de Wiel, C.C.M. (2010). Inventory of observed unexpected environmental effects of genetically modified crops (Wageningen, NL).

Carpenter, J.E. (2011). Impact of GM crops on biodiversity. *GM Crops* 2, 7–23.

Devos, Y., Cougnon, M., Vergucht, S., Bulcke, R., Haesaert, G., Steurbaut, W., and Reheul, D. (2008). Environmental impact of herbicide regimes used with genetically modified herbicide-resistant maize. *Transgenic Research* 17, 1059–1077.

Van Deynze, A.E., Sundstrom, F.J., and Bradford, K.J. (2005). Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Science* 45, 1565–1570.

Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Catizone, P., Urbano, J.M., and Barnes, J. (2008). Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed Research* 48, 257–265.

EC (2009). Commission decision No 2009/770/EC of 13 October 2009 establishing standard reporting formats for presenting the monitoring results of the deliberate release into the environment of genetically modified organisms, as or in products, for the purpose of placing on the market, pursuant to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union L275*, 9–27.

EFSA (2006). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the Post Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. *The EFSA Journal* 319, 1–27.

EFSA (2009). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA-GMO-NL-2008-51) for the placing on the market of glyphosate tolerant genetically modified cotton GHB614, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Bayer CropScience. *The EFSA Journal* 985, 1–24.

EFSA (2010a). 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 (2010b). 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 (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 on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. *The EFSA Journal* 9 (8): 2316, 40 pp.
- Fok, M. (2011). Gone with transgenic cotton cropping in the USA. *Biotechnologie, Agronomie, Société Et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15, 545–552.
- Givens, W.A., Shaw, D.R., Kruger, G.R., Johnson, W.G., Weller, S.C., Young, B.G., Wilson, R.G., Owen, M.D.K., and Jordan, D. (2009a). Survey of Tillage Trends Following The Adoption of Glyphosate-Resistant Crops. *Weed Technology* 23, 150–155.
- Givens, W.A., Shaw, D.R., Johnson, W.G., Weller, S.C., Young, B.G., Wilson, R.G., Owen, M.D.K., and Jordan, D. (2009b). A Grower Survey of Herbicide Use Patterns in Glyphosate-Resistant Cropping Systems. *Weed Technology* 23, 156–161.
- Givens, W.A., Shaw, D.R., Newman, M.E., Weller, S.C., Young, B.G., Wilson, R.G., Owen, M.D.K., and Jordan, D.L. (2011). Benchmark study on glyphosate-resistant cropping systems in the United States. Part 3: Grower awareness, information sources, experiences and management practices regarding glyphosate-resistant weeds. *Pest Manag. Sci.* 67, 758–770.
- González-Torralva, F., Gil-Humanes, J., Barro, F., Brants, I., and De Prado, R. (2012). Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiol. Biochem.* 58, 16–22.
- Green, J.M., and Owen, M.D.K. (2011). Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5819–5829.
- Heap, I. (2013). *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*.
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., and Shivanna, K.R. (1984). The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor. Appl. Genet.* 67, 367–375.
- Heuberger, S., Yafuso, C., Degrandi-Hoffman, G., Tabashnik, B.E., Carrière, Y., and Dennehy, T.J. (2008). Outcrossed cottonseed and adventitious Bt plants in Arizona refuges. *Environ Biosafety Res* 7, 87–96.
- Heuberger, S., Ellers-Kirk, C., Tabashnik, B.E., and Carrière, Y. (2010). Pollen- and Seed-Mediated Transgene Flow in Commercial Cotton Seed Production Fields. *PLoS ONE* 5, e14128.
- Hofs, J.-L., and Hau, B. (2006). Etude des flux de gènes entre le cotonnier cultivé et les espèces voisines dans les agrosystèmes sud africains.
- Hofs, J.-L., Klein, E., Pierre, J., Chevre, A.M., and Hau, B. (2007). GM cotton gene flow in small-scale farming systems: Probable impact on organic cotton production in Africa. In *Proceedings of the GMCC3, (Seville (Spain))*, pp. 87–90.
- INFOAGRO (2013). *Agricultura. El cultivo del algodón. 2ª parte*.
- Junta de Andalucía (2002). *Informe sobre el sector del algodón y la industria transformadora en Andalucía. (Empresa pública de desarrollo agrario y pesquero)*.
- Kareiva, P., Morris, W., and Jacobi, C.M. (1994). Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3, 15–21.
- Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002). In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3345–3351.

- Khan, N.U., Marwat, K.B., Hassan, G., Farhatullah, B.S., Makhdoom, K., Ahmad, W., and Khan, H.U. (2010). Genetic variation and heritability for cotton seed, fiber and oil. *Traits in Gossypium hirsutum*. *L. Pak J Bot* 42, 615–625.
- Lançon, J., and Klassov, C. (1988). Mise au point sur graines de coton (*G. hirsutum* L.) d'une methode de germination en laboratoire. *Coton Et Fibres Tropicales* 43, 311–317.
- Llewellyn, D., Tyson, C., Constable, G., Duggan, B., Beale, S., and Steel, P. (2007). Containment of regulated genetically modified cotton in the field. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121, 419–429.
- Messéan, A., Angevin, F., Gómez-Barbero, M., Menrad, K., and Rodríguez-Cerezo, E. (2006). New case studies on the coexistence of GM and non-GM crops in European agriculture.
- National Academy of Science (2010). *Impact of Genetically Engineered Crops on Farm Sustainability in the United States* (Washington, D.C.: The National Academies Press).
- OECD (2008). Consensus document on the biology of cotton ENV/JM/MONO(2008)33. In *Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology* (OECD).
- Owen, M.D.K. (2008). Weed species shifts in glyphosate-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 64, 377–387.
- Owen, M.D.K., and Zelaya, I.A. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag. Sci.* 61, 301–311.
- Pannetier, C., Hofs, J.-L., Montes, E., Eber, F., Coriton, O., Huteau, V., Hau, B., and Chevre, A.M. (2009). Evidence of unreduced gamete production from interspecific crosses between *G. herbaceum* and *G. hirsutum*. (St Malo (France)).
- Pierre, J., and Hofs, J.-L. (2010). *Astylus atromaculatus* (Coleoptera: Melyridae): abundance and role in pollen dispersal in Bt and non-Bt cotton in South Africa. *Environ. Entomol.* 39, 1523–1531.
- Pline, W.A., Edmisten, K.L., Oliver, T., Wilcut, J.W., Wells, R., and Allen, N.S. (2002). Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. *Crop Science* 42, 2193.
- Pline, W.A., Edmisten, K.L., Wilcut, J.W., Wells, R., and Thomas, J. (2003). Glyphosate-induced reductions in pollen viability and seed set in glyphosate-resistant cotton and attempted remediation by gibberellic acid (GA3). *Weed Science* 51, 19–27.
- Pontiroli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T.M., and Monier, J.M. (2009). Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Appl Environ Microbiol* 75, 3314–3322.
- Price, A.J., Balkcom, K.S., Culpepper, S.A., Kelton, J.A., Nichols, R.L., and Schomberg, H. (2011). Glyphosate-resistant Palmer amaranth: A threat to conservation tillage. *Journal of Soil and Water Conservation* 66, 265–275.
- Reddy, K.N., Rimando, A.M., and Duke, S.O. (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5139–5143.
- Roberts, G., Kerlin, S., and Hickman, M. (2002). Controlling volunteer cotton - a guide for integrated management of weeds in cotton. In *Weed Pak*, p. 6.
- Robledo de Pedro, F., and Martín Vicente, L. (1981). *Aplicación de los plásticos en la agricultura* (Madrid: Mundi-Prensa).

Rüdelshiem, P.L.J., and Smets, G. (2012). Baseline information on agricultural practices in the EU cotton (*Gossypium hirsutum* L.).

Webster, T.M., and Nichols, R.L. (2012). Changes in the Prevalence of Weed Species in the Major Agronomic Crops of the Southern United States: 1994/1995 to 2008/2009. *Weed Science* 60, 145–157.

Wegier, A., Piñeyro-Nelson, A., Alarcón, J., Gálvez-Mariscal, A., Alvarez-Buylla, E.R., and Piñero, D. (2011). Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. *Mol. Ecol.* 20, 4182–4194.

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

Courrier reçu le

12 FEV. 2013

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

Paris, le - 7 FEV. 2013

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

Références : 130110- saisine HCB - dossier 2012-104

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

Monsieur le Président,

Dans le cadre du règlement 1829/2003 relatif aux denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est confiée à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs). Lorsqu'un dossier est considéré comme valide par l'AESA, le dossier est mis à disposition des États membres qui disposent de 3 mois pour faire des commentaires.

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

- dossier **EFSAs-GMO-ES-2012-104**, concernant la mise sur le marché du coton génétiquement modifié **GHB614** pour la culture.

Les États membres peuvent transmettre leurs commentaires à l'AESA jusqu'au 9 avril 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 **5 avril 2013**.

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

L'ingénieur
Sous-Directeur de la Direction 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.

Un expert extérieur, Jean-Luc Hofs, du CIRAD, a été consulté pour compléter l'expertise du CS. M. Hofs a signé un engagement de confidentialité, et a certifié ne pas avoir de conflits d'intérêts après avoir pris connaissance du dossier. Il a révisé le dossier concernant son domaine d'expertise, et a été auditionné par le CS. Il n'a toutefois pas contribué directement à l'élaboration de l'avis du CS, qui reste de la responsabilité de ses membres.

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

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

Cette annexe est une compilation des commentaires du HCB sur le dossier EFSA-GMO-ES-2012-104 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.

3.1. *Comments per section*

A. Hazard identification and characterization

The statistical analysis used by the applicant suffers from numerous methodological weaknesses. No power analysis is provided to justify the conclusions put forward in Sections A.3. 'Comparative assessment' and E.3.4. 'Interactions of the GM plant with non-target organisms (NTOs)'. In these sections, lack of significant difference is sometimes confused with equivalence.

1. Information relating to the recipient or (where appropriate) parental plants

The HCB Scientific Committee requests that it be made clear that the cotton grown, *Gossypium hirsutum*, is a perennial (shrub) and that its genetic improvement has in no way changed its ability to persist for a long time in its environment. It is only its method of cultivation that, for reasons of productivity (higher yields the first year) and pest control (breaking pest and disease cycles), necessitates annual crop rotation.

3. Comparative assessment

1. The applicant frequently infers equivalence on the basis of difference tests. The only statistical tool offered by the applicant is the *t*-test for mean differences. Some examples are provided below:

'For these compounds the proof of equivalence was done on basis of the by-site analysis (Rattemeyer-Matschurat, 2009, Oberdörfer, 2010c)' (page 64).

The Rattemeyer-Matschurat citation is a paper called '*Analysis of **substantial equivalence** of transgenic and non-transgenic cotton **by means of t-test for differences***', which makes no sense in statistical terms.

*'**No significant differences** between treatments mean values over all sites (*p*-value ANOVA for main effect treatment ≥ 0.05) were found for crude protein, phosphorus, potassium, free gossypol, most amino acids (except glycine and the five amino acids for which site*treatment interactions were detected), myristic (C14:0), palmitoleic (C16:1 ω 9), and cis oleic (C18:1) acid. In all these cases, **substantial equivalence** between data sets of GHB614 cotton and the conventional counterpart Coker312 groups can be stated.'* (page 66)

*'**No significant difference** between treatments mean values over all sites (*p*-value ANOVA for main effect treatment ≥ 0.05 in Table 24) was found for seed index. In this case, **substantial equivalence** between data sets of the conventional counterpart Coker312 and GHB614 cotton can be stated.'* (page 74)

2. The applicant refers to the EFSA scientific opinion on import of cotton GHB614 into Europe (EFSA, 2009), which predates new guidance on use of equivalence tests and contains the following conclusion (EFSA, 2010a, 2010b): '*Based on comparative analyses, the EFSA GMO Panel concluded that cotton GHB614 is compositionally and agronomically equivalent to the non-GM counterpart and other conventional cotton except for the introduced trait.*'

The publication of the new guidance (EFSA, 2010b) invalidates the applicant's conclusion (page 77) that '*EFSA has already assessed and confirmed the compositional equivalence of GHB614 cotton and its conventional counterpart Coker312 grown in the US environment (EFSA, 2009a M-360059-01-1)*'.

The HCB Scientific Committee therefore requests that statistical analysis for all new applications comply with the new EFSA guidance (EFSA, 2010b).

3. On a number of occasions the applicant finds statistically significant differences in the course of all-site analysis. The applicant then carries out site-by-site analysis that shows no such differences.

'The t-tests showed significant differences (p-values in t-tests < 0.05) in both individual treatment comparisons (A vs B and A vs C) for both parameters (Table 24). However in the by-site analysis, at the majority of sites no significant differences were observed.' (page 72)

'Overall treatment effects (p-value ANOVA for main effect treatment < 0.05) were found for number of embryos (seed/boll) and time to maturity (days to 1st open boll), so that the individual treatment comparisons had to be evaluated. As stated above, in the by-site analysis, at the majority of sites no significant difference was observed.' (page 73)

'Overall treatment effects (p-value ANOVA for main effect treatment < 0.05) were found for number of developed nodes, so that the individual treatment comparisons had to be evaluated. However in the by-site analysis, at the majority of sites no significant difference was observed.' (page 74)

The HCB Scientific Committee notice that the lack of significance might be due to a lack of power, since sample sizes were reduced for site-by-site comparisons.

4. The applicant recognises that statistically significant differences are not necessarily biologically meaningful:

'The individual comparisons also showed significant differences for length uniformity, short fiber index and fiber elongation. But the relevance of the statistical differences is negligible for the following reasons:

- *an absolute difference in fiber length of 0.03 inch does not mean a real difference in the fibre quality;*
- *the average percentages for the fiber length uniformity were 83.2%, 85.2% and 85.4% which qualifies the fiber of all three regimens as high to very high quality;*
- *the short fiber index is for all fiber types good, with slightly better results for the fibers from the GHB614 cotton plants;*
- *the fiber strength is for all three fiber types ≥ 30 g/tex which is a very high strength;*
- *the absolute difference in fiber elongation is maximum 0.7 %, which is also a very small difference and comparable to the variation within the Coker312 regimen.'* (page 74)

or else uses historical data to infer absence of biological significance:

'Only for the anti-nutrient CPFAs the majority of sites had statistically significant differences. In this case, the differences between the mean values are very small, they are within the range from the literature and the values for GHB614 cotton are lower than for the conventional counterpart were considered not biologically relevant.' (page 67)

The HCB Scientific Committee stresses that i) the test ability to demonstrate a biologically significant difference can only be demonstrated subsequent to a power analysis and ii) that the assumption that a biologically significant difference exists can only be dismissed subsequent to an equivalence test.

5. Without challenging the biological validity of the conclusions put forward by the applicant, the HCB Scientific Committee emphasises that these conclusions cannot be drawn on the basis of statistical arguments, since the arguments advanced by the applicant are highly empirical.

EFSA (2009). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA-GMO-NL-2008-51) for the placing on the market of glyphosate tolerant genetically modified cotton GHB614, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Bayer CropScience. The EFSA Journal 985, 1–24

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

3.2 Field trials: experimental design and statistical analysis

The isolation distance of 3.8 m between plots (*'the plots of each treatment regimen were separated by a minimum of 3.8 metres (planted with conventional cotton)'*, page 60) cannot prevent cross-pollination but helps to reduce it. Outcrossing rates of 2% are still possible at 5 m (Heuberger et al., 2008; Hofs et al., 2007), and the applicant's results in Table 33 (page 106) tend to bear this out (a mean outcrossing rate of 2% is recorded at 6 m). Pollen flows have no effect on fibre quality (a product of maternal tissue) but may on the other hand affect the endosperm (triploid, after fusion of the two embryo sac nuclei and a pollen nucleus) and therefore the findings of work based on such seeds.

Heuberger, S., Yafuso, C., Degrandi-Hoffman, G., Tabashnik, B.E., Carrière, Y., and Dennehy, T.J. (2008). Outcrossed cottonseed and adventitious Bt plants in Arizona refuges. Environ Biosafety Res 7, 87–96.

Hofs, J.-L., Klein, E., Pierre, J., Chevre, A.M., and Hau, B. (2007). GM cotton gene flow in small-scale farming systems: Probable impact on organic cotton production in Africa. In Proceedings of the GMCC3, (Seville (Spain)), pp. 87–90.

3.4 Agronomic and phenotypic characteristics

1. The experimental design is not always suited to obtaining accurate data. This is the case in the studies concerning gene flow, pollen viability, entomology and volunteer monitoring.

2. Some critical points are played down, such as germination capacity, gene flows and effect of glyphosate use on development of resistance. The choice of some agronomic parameters is ill-suited to evaluating the relevant characteristics (e.g. seed index for fecundity, micronaire for fibre quality). The order of magnitude of some parameters (% lint, fibre length, etc.) is different from that commonly observed for the Coker 312 variety.

3. The HCB Scientific Committee questions the methodologies employed in these studies and notes the unsuitable nature of some of their designs:

With regard to plant morphology characteristics, the applicant has evaluated fecundity by means of seed index (page 72), usually defined as the weight of 100 seeds rather than weight of seed per 10 bolls (Khan et al., 2010). Furthermore, this characteristic does not reflect fecundity: in cotton it is a varietal characteristic that is, moreover, highly dependent on the environment.

For plant reproductive characteristics (page 73), Currier (2006b) uses Barrow's method (Barrow, 1983) to evaluate GHB614 pollen viability. This method cannot be used to demonstrate possible differences following glyphosate application (Pline et al., 2003), unlike the fluorochromatic (FCR) method (Heslop-Harrison et al., 1984; Pline et al., 2002). The difficulty in accurately distinguishing damaged pollen tubes from undamaged ones using Barrow's simple method is a limiting factor. Addition of aniline blue would have facilitated counting.

Furthermore, the comparisons in Currier (2006b) are only to GHB614 not treated with glyphosate, but the pollen should have been studied when glyphosate was used.

The HCB Scientific Committee wonders about consequences of the very low *2mepsps* gene expression level in pollen grains, which might pose a viability problem when treated with herbicide, since the last glyphosate treatment takes place approximately 62 days after sowing (Villagran et Cabrera, 2008a) and coincides with first flowering (Table 25).

In addition, micronaire (page 74) is only a rough indication of fineness, covering the fibre's intrinsic fineness and its maturity (heavily depending on environment), and does not reflect a varietal characteristic. The applicant ought to have used standard fineness (Hs).

4. In Table 24 (page 73), how does the applicant explain the large number of sites for which there is a significant difference between Coker 312 and GHB614 for the '*short fibre index*' and '*% lint*' variables? These are varietal characteristics that ought not to vary between 'near-isogenic' lines. The HCB Scientific Committee would appreciate a discussion on those discrepancies.

5. Sowig's study (2010) compares insect abundance for insecticide/no-insecticide treatment (page 75) but takes no account of herbicide use. Is there any interaction between insecticide and herbicide treatments in regimens A, B and C? In his statistical analysis of the data from these trials, Sowig (2010) uses Kruskal-Wallis non-parametric tests, which can only detect general differences for all treatments. Since these tests provide no information about differences between treatments (taken in pairs), further analysis is required.

6. Regarding Tables 24 and 25 (page 76):

To what does '*Range of commercial varieties*' refer? Are they the maximum and minimum values found in the literature or those recorded in Bayer CropScience trials in Spain with local cultivars?

The '*% lint*' values (ginning outturn) are extremely high. The CIRAD database on cotton genetic resources (covering some commercial varieties used as controls by the applicant) shows lint percentages in a range between 31.9% and 42.9%. Moreover, saw ginning, as in the applicant's trials, ought to give lower values than roller ginning. The Coker 312 line has a mean ginning outturn of 39.9% (source: CIRAD gene bank, 2008); the 45.4% figure given in the application therefore seems an overestimate.

The results of the statistical analysis show that there are differences between GBH616 (inbred from progeny of transformed Coker 312 and GBH614/T6 and T7) and the near-isogenic control variety. In Table 24, the variables '*% lint*', '*length*' and '*short fibre index*' and, to a lesser extent '*strength*' and '*elongation*', show genotype-environment interaction. Such interaction is surprising for two near-isogenic genotypes.

For the fibre parameters, the Table 25 results are all the same and seem to have been copied by mistake from the previous line ('*disease susceptibility*'). The applicant should correct the table.

7. As regards seed characteristics, and '*seed index*' in particular, there are differences in treatment values between sites, contrary to what is stated by the applicant: '*No significant difference between treatments mean values over all sites (p-value ANOVA for main effect treatment ≥ 0.05 in Table 24) was found for seed index. In this case, substantial equivalence between data sets of the conventional counterpart Coker312 and GHB614 cotton can be stated.*' (page 74)

8. According to Oberdörfer (2011), pollen viability of GHB614 is lower than that of the control and independent of over-the-top glyphosate application. The HCB Scientific Committee believes that an additional study should be carried out to clarify the effect of transgene introgression on this characteristic.

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

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

Khan, N.U., Marwat, K.B., Hassan, G., Farhatullah, B.S., Makhdoom, K., Ahmad, W., and Khan, H.U. (2010). Genetic variation and heritability for cotton seed, fiber and oil. *Traits in Gossypium hirsutum. L. Pak J Bot* 42, 615–625.

Pline, W.A., Edmisten, K.L., Oliver, T., Wilcut, J.W., Wells, R., and Allen, N.S. (2002). Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. *Crop Science* 42, 2193.

Pline, W.A., Edmisten, K.L., Wilcut, J.W., Wells, R., and Thomas, J. (2003). Glyphosate-induced reductions in pollen viability and seed set in glyphosate-resistant cotton and attempted remediation by gibberellic acid (GA3). *Weed science* 51, 19–27.

3.6 Conclusions

There are agronomic differences between GHB614 and Coker312, contrary to what is concluded by the applicant: *'In the present application it has been shown that GHB614 cotton is agronomically and phenotypically equivalent to its conventional counterpart Coker312 when grown in Europe'* (page 77).

4. Toxicological assessment

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

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 and 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.

5. Allergenicity assessment

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

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 and 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.

6. Nutritional assessment

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

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 and 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.

E. ERA

2.3 Exposure scenarios

The applicant argues that seed placed in the soil at temperatures below 15°C would rot before being able to germinate the following year: *'If incorporated before the soil temperature reaches 15°C, it is likely to rot in the soil'* (page 101). The HCB Scientific Committee requests that this assumption be verified by experiment.

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

1. Introduction of the *2mepsps* gene gives cotton plants an adaptive advantage on uncultivated sites maintained by glyphosate spraying. The applicant should take account of glyphosate use, particularly in non-agricultural areas, in assessing the selective advantage of cotton GHB614 when disseminated outside the field.

2. Cotton has a deep root system, allowing it to survive mild winters. While not invasive, cotton can nevertheless persist on a site for several years and produce progeny.

3.1.1 Step 1: Problem formulation

1. The two citations for feral populations (*Flora Europaea*, 1968; Polunin, 1980) are too old to give the HCB Scientific Committee any idea of the populations currently existing in the three countries where cotton is mainly cultivated: Spain, Greece and Bulgaria. More recent citations or a field survey should be used to provide a current base line for feral populations that might present problems (Bagavathiannan and Van Acker, 2008).

2. The HCB Scientific Committee regrets that the applicant has offered no citations for regrowth rates in the range of soil-climate conditions expected for cultivation (Spain, Greece and Bulgaria), although volunteers are a problem in the USA and Australia (Roberts et al., 2002).

3. Presence of volunteers was noted subsequent to trials in 2007 and 2008: *'A limited number of volunteers was detected in post-release monitoring and were managed using mechanical or chemical techniques (Martinez, 2010)'* (page 107). It would have been preferable to continue the trials to make sure that these volunteers did not survive even though cotton crops are not to be grown for more than two years consecutively in Spain.

4. In the Villagran studies (2008a,b et 2009b) the regrowth sowing dates for the regrowth and survival study are too late in relation to the actual harvesting date: *'One month after the seeds were sown no seed germination was observed in either GHB614 cotton seeds or its conventional counterpart Coker312 seeds one month after they were planted'* (page 103). This scenario is not realistic, since the seeds produced in the field were sown one month after harvest, when the climatic conditions were unfavourable and left little chance of germination.

In Andalusia the first cotton bolls open 120 days after emergence, i.e. in mid-September for a May sowing. Although most ground spillage of seed cotton occurs at harvesting, seeds from

the first bolls may be shed accidentally, and therefore the HCB Scientific Committee would like the worst-case scenario to be discussed on this basis.

5. As for the cotton plant's flower-dwelling insects (page 103):

- The list of pollinators ought to be completed by coleoptera (Pierre and Hofs, 2010) and wasps. Moreover, the applicant does not specify which insects in Europe would be most likely to be vectors, although pollination potential varies according to insect (Van Deynze et al., 2005; Kareiva et al., 1994).
- Although cotton is largely self-pollinating, the HCB Scientific Committee believes that long-distance pollen dispersal by insects (cross-pollination known to improve crop yield (OECD, 2008)) has not been sufficiently taken into account. The applicant offers no arguments supporting the assumption that this dispersal would be unlikely (Heuberger et al., 2008, 2010; Llewellyn et al., 2007).

6. For crosses between GHB614 (species *Gossypium hirsutum*) and the diploid wild species *Gossypium herbaceum*, the hybrid is able to produce viable seeds. *G. herbaceum* x *G. hirsutum* hybrids have been obtained without emasculation of the recipient plant's flowers and accounted for 2% of the seed harvested. The hybrids were derived from unreduced gametes and were able to develop, although without producing seeds in free self-pollination conditions (Pannetier et al., 2009). This possibility ought therefore to be discussed in the problem formulation under Questions 4 to 7 and 9:

'4. Will the GM plant be more persistent than conventional counterparts under agricultural conditions?

5. Will the GM trait increase the fitness of the GM plant or compatible relative under agricultural conditions?

6. Can the GM plant form feral population under EU conditions?

7. Can the GM plant hybridise with sympatric compatible relatives outside production systems?' (page 104)

and Questions 8 and 9:

'8. Will the GM trait alter the fitness of feral plants or compatible relatives in semi-natural habitats?

[...]

9. Will the GM trait alter the range of feral plants or populations of compatible relatives?' (page 107).

Furthermore, citations for results relating to long-distance dispersal (and to introgression in local populations in Mexico) are not given (Wegier et al., 2011) nor discussed for their implication for Europe.

7. The applicant proposes physical crop isolation with alternative plants for pollinators in order to reduce pollen movement: *'In addition, physical isolation with plants attractive to the bees significantly reduces the potential for pollen movement'* (page 103). The HCB Scientific Committee thinks that it is highly unlikely that this would actually be done or doable on farms.

8. Concerning the pollen dissemination studies (page 104) conducted by Aelvoet and Freyssinet (2007 and 2008):

- The HCB Scientific Committee judges the design too rudimentary:

'A central 12 x 12 meter plot of GHB614 cotton, in Coker312 background, was planted into a 12 meter perimeter of the commercial variety Flora, in two different locations in 2006 (Table 31). Four plants from each perimeter border row on all four corners of the seed plot were tagged and harvested on a plant by plant basis. Plant samples represented distances from 1 to 12 meters in 1 meter increments from the pollen donor

plots. Starting from each corner of the seed block, the 4 tagged plants were harvested from each row in a perpendicular line moving away from the center of the GHB614 seed plot. Four negative control plants were tagged in the outer border row (independent from the previously selected plants). In addition four positive control plants were tagged in the glyphosate tolerant plot.'

The four transects bisecting the square plot should have been supplemented by four secants perpendicular to the plot edges. This design could have been used to evaluate the effect of the prevailing wind on insect movement more accurately and possibly find higher hybridization frequencies.

- The HCB Scientific Committee would like to know at what stage pollen sensor screening of the young plants from the sowing was undertaken.

- The HCB Scientific Committee wonders why there was a nine-month wait to sow the seeds in the greenhouse (protected environment) and in what conditions the seeds were stored. A loss of germinating power, coupled with low hybridisation percentages, might have a considerable effect on results.

9. Regarding the sentence, '*The agronomical and compositional equivalence between GHB614 cotton and its conventional counterpart (Coker312) was confirmed in both cases*' (page 104), there were no equivalence tests for the agronomic characteristics, but it was noted that the variation in characteristics was within acceptable limits for the crop and environment.

10. As regards germination of fuzzy seeds:

'Commercial seeds of G. hirsutum typically require some form of treatment to ensure adequate germination: heat treatment and a sulfuric acid delinting treatment to remove fuzz or linters from the seed coat (the delinted seed is also known as 'black' seed). Seed cotton and fuzzy seed germinate poorly, probably because the lint and linters attached to the seed coat limit contact with soil thereby inhibiting imbibing soil moisture (OGTR, 2008)' (page 106).

The applicant plays down its potential for germination, it is not absolutely necessary to delint seed for it to germinate satisfactorily. Germination rates in the region of 60% are normal for up to 85% fuzzy seed (Lançon and Klassov, 1988). Delinted seed requires less moisture to start germinating but needs additional moisture for continued growth to the seedling stage. Fuzzy seed, on the other hand, will not germinate below a certain cumulative moisture level. If this level is reached, the germination process starts and allows development to the seedling stage. This means that delinted seed is more sensitive to dry spells during germination. Those factors have an implication on GM cotton possible dissemination, regrowth rates, or feral population development.

11. The results provided by Martinez (2010) do not indicate the variety of cotton present as volunteers (page 105), since each plot contains at least three regimens. The HCB Scientific Committee would have appreciated an assessment of how each variety interacted with the herbicide treatments.

12. Accidental dispersal of seed during sowing and post-harvest operations is not considered (page 107). Existence of volunteers that might result in formation of feral populations on roadsides and in irrigation channels and drains ought to be discussed (AgBios, 2007; Messéan et al., 2006).

13. With regard to Question 8 ('*Will the GM trait alter the fitness of feral plants or compatible relatives in semi-natural habitats?*' page 107), in conditions similar to those in Andalusia, with winters that are even somewhat colder, feral populations of GM cotton survive on roadsides in Mpumalanga Province in South Africa (Hofs and Hau, 2006). Consequently, the glyphosate resistance trait may affect adaptation of feral plants in the case of roadside populations treated

with glyphosate during infrastructure maintenance. The applicant should obtain information on glyphosate use for highway maintenance, and, if such use is confirmed, produce results concerning possible persistence of cotton plants in these specific conditions. Those information are essential for monitoring and GM and non GM cotton coexistence.

AgBios (2007). Pre-Market Environmental Risk Assessment of Transgenic Plants: A case-study approach utilizing MON 15985 cotton.

Bagavathiannan, M.V., and van Acker, R.C. (2008). Crop ferality: Implications for novel trait confinement. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 127, 1–6.

van Deynze, A.E., Sundstrom, F.J., and Bradford, K.J. (2005). Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Science* 45, 1565–1570.

Heuberger, S., Yafuso, C., Degrandi-Hoffman, G., Tabashnik, B.E., Carrière, Y., and Dennehy, T.J. (2008). Outcrossed cottonseed and adventitious Bt plants in Arizona refuges. *Environ Biosafety Res* 7, 87–96.

Heuberger, S., Ellers-Kirk, C., Tabashnik, B.E., and Carrière, Y. (2010). Pollen- and Seed-Mediated Transgene Flow in Commercial Cotton Seed Production Fields. *PLoS ONE* 5, e14128.

Hofs, J.-L., and Hau, B. (2006). Etude des flux de gènes entre le cotonnier cultivé et les espèces voisines dans les agrosystèmes sud africains

Llewellyn, D., Tyson, C., Constable, G., Duggan, B., Beale, S., and Steel, P. (2007). Containment of regulated genetically modified cotton in the field. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121, 419–429.

Kareiva, P., Morris, W., and Jacobi, C.M. (1994). Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3, 15–21.

Lançon, J., and Klassov, C. (1988). Mise au point sur graines de coton (*G. hirsutum* L.) d'une methode de germination en laboratoire. *Coton Et Fibres Tropicales* 43, 311–317.

Messéan, A., Angevin, F., Gómez-Barbero, M., Menrad, K., and Rodríguez-Cerezo, E. (2006). New case studies on the coexistence of GM and non-GM crops in European agriculture.

OECD (2008). Consensus document on the biology of cotton ENV/JM/MONO(2008)33. In Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology (OECD).

Pannetier, C., Hofs, J.-L., Montes, E., Eber, F., Coriton, O., Huteau, V., Hau, B., and Chevre, A.M. (2009). Evidence of unreduced gamete production from interspecific crosses between *G. herbaceum* and *G. hirsutum*. (St Malo (France)).

Pierre, J., and Hofs, J.-L. (2010). *Astylus atromaculatus* (Coleoptera: Melyridae): abundance and role in pollen dispersal in Bt and non-Bt cotton in South Africa. *Environ. Entomol.* 39, 1523–1531.

Roberts, G., Kerlin, S., and Hickman, M. (2002). Controlling volunteer cotton - a guide for integrated management of weeds in cotton. In *Weed Pak*, p. 6.

Wegier, A., Piñeyro-Nelson, A., Alarcón, J., Gálvez-Mariscal, A., Alvarez-Buylla, E.R., and Piñero, D. (2011). Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. *Mol. Ecol.* 20, 4182–4194.

3.1.3 Step 3: Exposure characterization

Cottonseed is crushed to produce oil and meal. The seed is also used directly for animal feed (in Spain, as indicated by the applicant). It would therefore be advisable to monitor transport routes, under procedures to be specified, especially if their edges are treated with glyphosate, as in France. Special attention should be paid to farms using whole seed for animal feed.

3.2 Plant to micro-organisms gene transfer

3.2.1 Step 1: Problem formulation

1. The HCB Scientific Committee notes that, by and large, the literature cited is old and should be replaced by more recent work.

2. The applicant states, '*Under field conditions, soil has been shown to inhibit such transformation*' (page 109). Yet transformation events have been observed to occur directly or indirectly in soil although not necessarily with DNA from transgenic plants. Moreover, in field conditions transfer could take place within plants that are healthy (Kay et al., 2002) or decaying (Pontioli et al., 2009). The applicant then continues, '*and HGT from plants to microbes has not yet been demonstrated in non-sterile soil (Thomson, 2001)*'. This is true only in the narrow sense if it is thought that decaying plant material in the soil can be considered a 'soil' environment.

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

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

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

The statistical analysis is provided by Sowig, 2007; 2009; 2010. The purpose of these studies is to establish whether there are differences between numbers of animals caught in conventional and GM cotton plots, treated and untreated. The same procedure was used independently on different sites, at different periods, and for different varieties of animal.

1. Distributions are represented graphically by boxplots, even when the numbers are very small. This type of representation makes no sense to the HCB Scientific Committee.

2. A Kruskal-Wallis non-parametric test is used for each period, site and variety. This test possesses no power in such circumstances. Because of this lack of power, the individual tests have no chance of being statistically significant. It would nevertheless be possible to group together sites, periods (and even varieties) to gain more power and see whether an effect emerges. The HCB Scientific Committee recommends the use of a comprehensive model that might make it possible to demonstrate a difference between GMOs and non-GMOs.

3. When there are several 'treated GMO', 'untreated GMO', 'treated non-GMO' and 'untreated non-GMO' groups, because the comparison is general the test is unable to detect any effect of the genetic modification.

3.5 Impacts of the specific cultivation, management and harvesting techniques

3.5.1 Step 1: Problem formulation

1. The applicant refers (page 132) to only 4 weed taxa for cotton-growing in Spain: *Solanum nigrum*, *Abutilon theophrasti*, *Medicago* and *Cyperus* spp..

The weed problem had, indeed, been partially solved by sowing under plastic mulch (Junta de Andalucía, 2002; Robledo de Pedro and Martín Vicente, 1981). This practice is now being abandoned for economic and environmental reasons (waste). The current list of cotton weeds in Spanish agrosystems is lengthier (INFOAGRO, 2013).

First in order of importance and control difficulty are *Convolvulus* spp., *Solanum nigrum*, *Cyperus* spp. and *Echinochloa* spp. There are two groups requiring particular attention in terms of glyphosate resistance:

- Species and genera with glyphosate-resistant biotypes in non-European countries (*Amaranthus* spp., *Digitaria* spp., *Echinochloa* spp., *Poa* spp., *Sorghum halepense*),
- Species with glyphosate-resistant biotypes in Spain (*Lolium multiflorum*, *L. rigidum*).

So far there is no literature covering some of the new invasive species introduced into Spain that have glyphosate-resistant biotypes (*Conyza canadense*, *C. bonariensis*, *C. sumatrensis*), but there ought to be a review of the possible presence of these species in cotton crops, since they are a problem in (olive and peach) orchards in the south of Spain (González-Torraiva et al., 2012).

2. 'The commercial management regime for the GHB614 cotton varieties is the same as for conventional cotton' (page 133). It would be better to qualify this by saying 'is nearly the same as'.

3. No studies exist on effects of glyphosate management on above-ground invertebrates in cotton crops. The study by Albajes et al. (2011) is too recent for any valid conclusions to be drawn. Information about other crops can serve only as guidance: 'A study performed with HT maize in Spain concluded that significant changes in heteropteran predator densities from moderate alterations in weeds arising from the deployment of herbicide-tolerant corn varieties are not expected (Albajes et al., 2011)' (page 134).

4. As regards the potential impact of GHB614 on development of glyphosate resistance ('Potential environmental impacts of GHB614 cultivation on weed shifts and the selection of weed communities composed of more tolerant or resistant species', page 134), resistance existed in some species before the introduction of GMPs (Heap, 2013): *Plantago lanceolata* in South Africa and *Lolium rigidum* in Australia and in France, where no GMPs have been introduced. In the United States, on the other hand, where MON01445-2 was introduced in 1995, a number of species have developed glyphosate resistance subsequently. This is the case for three species of *Amaranthus* spp. (2005 and 2012), *Lolium multiflorum* (2004) and *Conyza canadensis* (2000) (Green and Owen, 2011; Owen and Zelaya, 2005; Price et al., 2011; Webster and Nichols, 2012). Adoption of glyphosate-tolerant plants in the United States has increased the phenomenon of resistance development (Fok, 2011). Since glyphosate-resistant biotypes already exist in Spanish agrosystems, introduction of GHB614 must at the very least be accompanied by management and mapping of critical points.

5. Regarding combined use of glyphosate with another herbicide, the applicant states: 'The use of glyphosate in combination with another herbicide will increase weed control efficacy and will delay herbicide resistance in weeds without causing any potential adverse effects (discussed in Devos et al., 2008)' (page 135). This information (Devos et al., 2008) is valid for maize but not for cotton. The HCB Scientific Committee therefore asks the applicant to provide information relevant to cotton-growing. In addition, specific information on changes in the composition of weed species should be supplied, since repeated glyphosate use in cropping systems leads to changes in the prevalence of weed species (Webster and Nichols, 2012).

6. As for hazard characterisation, the risk is not low, contrary to what the applicant states (page 136), since introduction of GHB614 and its herbicide package can accelerate selection of glyphosate-resistant weeds.

7. The HCB Scientific Committee regrets that there is no mention of the power of the tests used in this section which doesn't allow concluding on the pertinence of the results.

Devos, Y., Cougnon, M., Vergucht, S., Bulcke, R., Haesaert, G., Steurbaut, W., and Reheul, D. (2008). Environmental impact of herbicide regimes used with genetically modified herbicide-resistant maize. *Transgenic Research* 17, 1059–1077.

Fok, M. (2011). Gone with transgenic cotton cropping in the USA. *Biotechnologie, Agronomie, Société Et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15, 545–552.

González-Torralva, F., Gil-Humanes, J., Barro, F., Brants, I., and De Prado, R. (2012). Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiol. Biochem.* 58, 16–22.

Green, J.M., and Owen, M.D.K. (2011). Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5819–5829.

INFOAGRO (2013). *Agricultura. El cultivo del algodón. 2ª parte.*

Junta de Andalucía (2002). *Informe sobre el sector del algodón y la industria transformadora en Andalucía. (Empresa pública de desarrollo agrario y pesquero).*

Owen, M.D.K., and Zelaya, I.A. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag. Sci.* 61, 301–311.

Price, A.J., Balkcom, K.S., Culpepper, S.A., Kelton, J.A., Nichols, R.L., and Schomberg, H. (2011). Glyphosate-resistant Palmer amaranth: A threat to conservation tillage. *Journal of Soil and Water Conservation* 66, 265–275.

Robledo de Pedro, F., and Martín Vicente, L. (1981). *Aplicación de los plásticos en la agricultura (Madrid: Mundi-Prensa).*

Webster, T.M., and Nichols, R.L. (2012). Changes in the Prevalence of Weed Species in the Major Agronomic Crops of the Southern United States: 1994/1995 to 2008/2009. *Weed Science* 60, 145–157.

Heap, I. (2013). *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds.*

3.5.3 Step 3: Exposure characterization

1. The applicant offers a 'baseline' report on cotton-growing practices (page 137) that is very short on detail, particularly regarding farm-scale variations between and within member states (Rüdelsheim and Smets, 2012). The HCB Scientific Committee believes that this general information cannot be taken as a baseline.

2. The applicant does not specify which insects in Europe would be most likely to be vectors, although pollination potential varies according to insect (Van Deynze et al., 2005; Kareiva et al., 1994).

3. The HCB Scientific Committee regrets that the applicant has offered no citations for regrowth rates in the range of soil-climate conditions expected for cultivation (Spain, Greece and Bulgaria), although volunteers are a problem in the USA and Australia (Roberts et al., 2002)

4. At field level, adoption of minimum or conservation tillage (page 136) may encourage development of resistant weeds (Dinelli et al., 2008) or weed species shifts (Owen, 2008; Reddy et al., 2004). At the farm or landscape level, adoption of GHB614 may alter crop rotation if minimum or conservation tillage is introduced at the same time (Givens et al., 2009a; Price et al., 2011).

van Deynze, A.E., Sundstrom, F.J., and Bradford, K.J. (2005). Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Science* 45, 1565–1570.

Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Catizone, P., Urbano, J.M., and Barnes, J. (2008). Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed Research* 48, 257–265.

Givens, W.A., Shaw, D.R., Kruger, G.R., Johnson, W.G., Weller, S.C., Young, B.G., Wilson, R.G., Owen, M.D.K., and Jordan, D. (2009a). Survey of Tillage Trends Following The Adoption of Glyphosate-Resistant Crops. *Weed Technology* 23, 150–155.

Kareiva, P., Morris, W., and Jacobi, C.M. (1994). Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3, 15–21.

Owen, M.D.K. (2008). Weed species shifts in glyphosate-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 64, 377–387.

Price, A.J., Balkcom, K.S., Culpepper, S.A., Kelton, J.A., Nichols, R.L., and Schomberg, H. (2011). Glyphosate-resistant Palmer amaranth: A threat to conservation tillage. *Journal of Soil and Water Conservation* 66, 265–275.

Reddy, K.N., Rimando, A.M., and Duke, S.O. (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5139–5143.

Roberts, G., Kerlin, S., and Hickman, M. (2002). Controlling volunteer cotton - a guide for integrated management of weeds in cotton. In *Weed Pak*, p. 6.

3.5.4 Step 4: Risk characterization

The HCB Scientific Committee would like more in-depth discussion with regard to risk characterisation (page 137), since the possible switch to conservation tillage for cotton GHB614 will entail changes to crop rotations (and herbicide use) that are associated with prevalence of resistance development among weeds in Spain.

3.5.5 Step 5: Risk management strategies

As provided for in EFSA guidance, the applicant must propose risk management strategies (rotation plan for conservation tillage, integrated weed management plans) (page 137).

4. PMEM

1. The HCB Scientific Committee would have liked the applicant to refer to, and comment on for Europe, the monitoring of GHB614 crops in the USA and Brazil as well as monitoring of other glyphosate-tolerant cottons: (Givens et al., 2009b, 2011; Green and Owen, 2011; National Academy of Science, 2010).

2. The HCB Scientific Committee is surprised at the lack of detail in the general surveillance plan:

- No details about the number of farms monitored, other than that they will be in existing cotton-growing areas.
- No information about possible monitoring outside cotton fields (other fields on the same farm, and non-agricultural areas), in particular to assess the impact on biodiversity of changes in cropping practices. It is to be expected, in the light of the glyphosate-tolerant cotton crops in the USA and of Farm Scale Evaluation glyphosate-tolerant crop trials, that biodiversity will be affected, especially if no-tillage methods become widespread: (Bigler and Albajes, 2011; van den Brink et al., 2010; Carpenter, 2011).
- No details on the power of the planned statistical tests.
- No information on any literature monitoring.

- No details of existing networks activated within or through EuropaBio are provided by the applicant.
- No details are supplied concerning the proposed database of results from the farmers' questionnaire.

3. Lastly, the HCB Scientific Committee draws attention to a more general problem with these Farmers' questionnaires. On the one hand, the farmers do not always have all the tools to answer the questionnaire appropriately, and, on the other, their replies may show strategic bias as it is not necessarily in their interest to provide accurate answers. To solve this twofold problem, the HCB Scientific Committee proposes basing general surveillance on collection of information by trained personnel, in fields, on behalf of independent observation networks with well-defined methodologies, rather than mostly on the questionnaire method. Questions on presence of wildlife (section 3.7 of the farmer's questionnaire) are very general and do not allow to give fine and clear indications on wildlife evolution on and around the farm.

4. The HCB Scientific Committee asks the applicant to put forward a genuine environmental monitoring plan actually setting out the methodologies and resources to be used for it.

The applicant must specify the following:

- Number of plots sampled.
- Number of points sampled per plot.
- Frequency of data collection per point (once a year, once a week, etc.), which will depend on species biology – univoltine or multivoltines for example.
- Communities monitored, using various criteria: a major role in agro-ecosystems (pest control, pollinators), key groups in the broader functioning of ecosystems, or controls indicating proper operation of the ecosystem because they are at the top of the food chain. For reasons of feasibility, easily observable types of organism should be chosen. On the basis of what already exists, it is proposed that the following communities be monitored at the very least: birds, butterflies, bats, earthworms and roadside flora.
- Type of data collected.
- For monitored communities: number of species, abundance.
- Characterisation of plots in terms of soil climate and surrounding landscape.
- Data collection protocol.
- Data analysis methods: community-level analysis taking account of species' biological characteristics. The indicators chosen, i.e. the metrics used to summarise the data collected, which are necessary to transcend species idiosyncrasy, must provide adequate statistical power.

5. The HCB Scientific Committee would like the risk of glyphosate-resistant weed development to be covered by case-specific monitoring. Glyphosate-resistant weeds might develop as a result of bad farming practice for glyphosate use on cotton GHB614. This is noted not as a direct environmental impact of genetic modification but to underline the risk of losing a weed management tool; this would be detrimental to farmers, who would have to use alternative methods, some of which might have a wider impact on the environment.

6. The HCB Scientific Committee requests the applicant to extend the general surveillance plan beyond the period of consent and to provide the GPS/land-survey coordinates of audited farms in its annual reports so as to provide multi-annual crop monitoring. The applicant must also ensure that these data could be geolocated and incorporated in a European centralised database also including data from other applicants as well as data on other farming practices and other monitoring from other applicants.

7. The HCB Scientific Committee requests that analysis of collected data and statistical processing of the general surveillance plan follow EFSA's new rules on statistical analysis (EFSA, 2010a), which recommend using appropriate statistical procedures.

8. The HCB Scientific Committee recommends using biostatisticians beforehand, rather than afterwards, to define monitoring protocols jointly. It is essential to design protocols with suitable sampling and statistical tools geared to detect slight variations over time with adequate statistical power. On the basis of biologists' proposals for the species to be monitored, biostatisticians could propose a sensible number of plots and samples per plot for analysis. To estimate these numbers, it would be worth reviewing the literature on the variance of the variables to be measured or making an estimate of this variance in the absence of available information in the literature.

9. The HCB Scientific Committee reminds the applicant that it is incumbent upon it, over the period covered by the application for renewal, if granted, to provide assistance with the biomonitoring associated with use of the biotechnology that the applicant is marketing, when so requested by the national competent authorities.

10. The following additions should be made to the farmers' questionnaire: GIS coordinates of plots; direct sowing categorised into no-tillage and other methods; undersown crop or not; pesticide quantities and application times and types (pre- or post-emergence); more room for comments on cause of change in pest and disease control methods; GHB614 grown for one or more years, etc.

11. The methods used to analyse the results of these questionnaires should be specified, with power tests and therefore sampling, and an assessment of the representativeness of the farmers concerned.

12. The HCB Scientific Committee regrets that the questionnaire relies in large part on subjective judgment and offers no tools for quantification.

13. The applicant refers to old guidance for monitoring plans (EFSA, 2006) and therefore does not provide for any experimental testing. However, the new guidance (EFSA, 2011b) provides for experimental testing to determine baselines and indicators to be monitored. The applicant's general surveillance plan ought therefore to be updated to take account of new EFSA guidance on general surveillance plans and to provide details of how the applicant intends to establish baselines specific to the various soil-climate regions.

14. The applicant announces that farmers will be provided with guidance on best practice. No details of these good agricultural practices are given.

* A species (insect) capable of producing several generations in a year.

Bigler, F., and Albajes, R. (2011). Indirect effects of genetically modified herbicide tolerant crops on biodiversity and ecosystem services: the biological control example. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit* 6, 79–84.

van den Brink, L., Bus, C.B., Franke, A.C., Groten, J.A.M., Lotz, L.A.P., Trimmer, R.D., and Van de Wiel, C.C.M. (2010). Inventory of observed unexpected environmental effects of genetically modified crops (Wageningen, NL).

Carpenter, J.E. (2011). Impact of GM crops on biodiversity. *GM Crops* 2, 7–23.

EC (2009). Commission decision No 2009/770/EC of 13 October 2009 establishing standard reporting formats for presenting the monitoring results of the deliberate release into the environment of genetically modified organisms, as or in products, for the purpose of placing on the market, pursuant to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union L275, 9–27.

EFSA (2006). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the Post Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. The EFSA Journal 319, 1–27.

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

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

Givens, W.A., Shaw, D.R., Johnson, W.G., Weller, S.C., Young, B.G., Wilson, R.G., Owen, M.D.K., and Jordan, D. (2009b). A Grower Survey of Herbicide Use Patterns in Glyphosate-Resistant Cropping Systems. Weed Technology 23, 156–161.

Green, J.M., and Owen, M.D.K. (2011). Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. J. Agric. Food Chem. 59, 5819–5829.

National Academy of Science (2010). Impact of Genetically Engineered Crops on Farm Sustainability in the United States (Washington, D.C.: The National Academies Press).