

Commentaires sur le rapport de surveillance de culture du MON 810 en 2018. Paris, le 25 février 2020

Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno B. Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, et al.

▶ **To cite this version:**

Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, et al.. Commentaires sur le rapport de surveillance de culture du MON 810 en 2018. Paris, le 25 février 2020. [0] Haut Conseil des Biotechnologies. 2020, 35 p. hal-02917702

HAL Id: hal-02917702
https://hal.inrae.fr/hal-02917702

Submitted on 19 Aug 2020

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

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



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

COMITÉ SCIENTIFIQUE

COMMENTAIRES

sur le rapport de surveillance de culture du MON 810 en 2018

Paris, le 25 février 2020

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été sollicité le 15 janvier 2020 par les Autorités compétentes françaises (le ministère de la Transition écologique et solidaire) pour examiner le rapport de surveillance de la société Bayer Agriculture BVBA[1] relatif à la culture du MON 810 en 2018.

Ce rapport a été réalisé par la société Bayer Agriculture BVBA pour la Commission européenne suite à l'autorisation de culture du maïs MON 810 en 1998, obtenue au titre de la directive 90/220/CEE, abrogée aujourd'hui par la directive 2001/18/CE. La Commission européenne a demandé aux Etats membres de lui faire parvenir leurs commentaires sur ce document pour examen ultérieur par l'Autorité européenne de sécurité des aliments.

Le Comité scientifique (CS) [2] du HCB a procédé à l'examen du rapport et à une adoption de ces commentaires le 25 février 2020 sous la vice-présidence de Pascal Boireau et Claudine Franche.

[1] Le groupe Bayer a acquis la société Monsanto le 21 août 2018.

[2] Les modalités de l'élaboration de l'avis et la composition du CS sont indiquées en Annexe 1.

RESUME DES COMMENTAIRES[3]

Les analyses contenues dans le rapport de surveillance de Bayer Agriculture BVBA ne font apparaître aucun problème majeur associé à la culture de maïs MON 810 en 2018.

Toutefois, le CS du HCB identifie encore certaines faiblesses et limites méthodologiques concernant la surveillance de la sensibilité des ravageurs ciblés à la toxine Cry1Ab, remettant en question les conclusions du rapport. Le HCB estime notamment que l'utilisation d'une dose diagnostic présente certaines limites pour la détection précoce de l'évolution de la résistance, tant dans son principe intrinsèque que dans sa mise en œuvre par Bayer, et recommande une méthode alternative de type *F2 screen* permettant de déterminer la fréquence des allèles de résistance au sein d'une population de ravageurs cibles. Par ailleurs, le HCB formule des recommandations destinées à renforcer la mise en œuvre des zones refuges pour prévenir ou retarder le développement de résistance à la toxine Cry1Ab chez les ravageurs ciblés.

Concernant la surveillance générale, le CS du HCB relève un problème de pertinence méthodologique quant aux questions étudiées, avec des règles de décision arbitraires, des conclusions incorrectement justifiées et un possible biais associé au format d'enquête auprès du panel d'agriculteurs qui ont accepté de répondre au questionnaire.

Enfin, le CS du HCB recommande que le rapport de surveillance considère la présence de téosinte dans des zones de culture du maïs MON 810 en Espagne et les risques potentiels associés à une éventuelle introgression de gènes de maïs MON 810 chez le téosinte.

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

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION 4

2. COMMENTAIRES 5

2.1 SURVEILLANCE SPECIFIQUE ET GESTION DE LA RESISTANCE AUX INSECTES 6

2.2 SURVEILLANCE GENERALE 14

2.3 POINT SUPPLEMENTAIRE RELATIF A LA PRESENCE DE TEOSINTES EN ESPAGNE 16

3. CONCLUSIONS 18

4. BIBLIOGRAPHIE 19

ANNEXE 1 – ELABORATION DES COMMENTAIRES 21

ANNEXE 2 – TRADUCTION EN ANGLAIS 22

1. Introduction

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

La mise sur le marché du maïs MON 810[4], à des fins d'importation et de toute utilisation incluant la culture, est autorisée dans les Etats membres de l'Union européenne depuis le 3 août 1998, date à laquelle la France – en sa qualité de rapporteur du dossier pour la Commission – a ratifié la décision 98/294/CE du 22 avril 1998[5] prise sur le fondement de la directive 90/220/CEE[6]. En 2004, conformément au règlement (CE) n° 1829/2003[7], la société Monsanto a notifié les différents produits du maïs MON 810 mis sur le marché pour l'alimentation humaine et animale et pour la culture comme « produits existants »[8].

En conformité avec les exigences réglementaires, la société Monsanto a déposé plusieurs dossiers de renouvellement d'autorisation de mise sur le marché couvrant tous les usages existants du maïs MON 810, incluant la culture, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 en avril 2007, avant qu'une période de neuf ans ne se soit écoulée après l'autorisation initiale de la décision 98/294/CE. Le traitement de ces dossiers de renouvellement par la Commission européenne implique une prolongation automatique de l'autorisation de culture du maïs MON 810 selon les termes de l'autorisation initiale du 22 avril 1998, assortie des exigences en termes de détection, étiquetage et traçabilité requises pour tout produit existant au titre du règlement (CE) n° 1829/2003. Suite à l'adoption de la directive (UE) 2015/412 du 11 mars 2015, le périmètre géographique de la demande d'autorisation de culture du MON 810 dans l'Union européenne a été adapté conformément aux requêtes de dix-neuf Etats membres[9]. Enfin, le 9 mars 2016, la société Monsanto a demandé que soient séparées les demandes de renouvellement d'autorisation pour la mise en culture du MON 810 des demandes de renouvellement d'autorisation concernant les autres usages, ce qui a permis à la Commission européenne d'adopter le 4 juillet 2017, à l'issue des procédures d'évaluation et de comitologie *ad hoc*, le renouvellement d'autorisation de mise sur le marché du MON 810 pour tous les usages à l'exclusion du pollen et de la mise en culture[10].

---

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

[5] Décision 98/294/CE de la Commission du 22 avril 1998 sur la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié (*Zea mays* L. line MON 810) sur le fondement de la directive 90/220/CEE du Conseil.

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:131:0032:0033:FR:PDF

[6] Directive 90/220/CEE du Conseil, du 23 avril 1990, relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement. Cette directive a été abrogée par la directive 2001/18/CE.

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990L0220:FR:HTML

[7] 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

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

[9] Décision d'exécution (UE) 2016/321 de la Commission du 3 mars 2016 modifiant la portée géographique de l'autorisation de cultiver le maïs génétiquement modifié (*Zea mays* L.) MON 810 (MON-ØØ81Ø-6).

[10] Décision d'exécution (UE) 2017/1207 de la Commission du 4 juillet 2017 renouvelant l'autorisation de mise sur le marché de produits du maïs génétiquement modifié MON 810 (MON-ØØ81Ø-6) en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil.

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

En pratique, la société Monsanto (puis Bayer Agriculture BVBA suite à l'acquisition de la société Monsanto en août 2018) produit annuellement, depuis 2005, des rapports de surveillance de culture du MON 810, incluant non seulement les résultats de surveillance du développement de résistance chez les insectes, mais aussi, sur une base volontaire, les résultats d'une surveillance générale. Par anticipation à l'obtention d'une nouvelle autorisation de culture au titre du règlement (CE) n° 1829/2003, cette surveillance générale est réalisée conformément à ce règlement, selon les règles définies dans la directive 2001/18/CE[11] et les formulaires établis dans la décision 2009/770/CE[12].

La Commission européenne a saisi l'EFSA[13] d'une demande d'évaluation du dernier rapport de surveillance du MON 810 concernant la culture de l'année 2018 en Europe. Elle a également invité les Etats membres à envoyer leurs commentaires sur le rapport pour examen complémentaire par l'EFSA. Dans ce contexte, les Autorités compétentes françaises (le ministère de la Transition écologique et solidaire) ont sollicité le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) le 15 janvier 2020 pour une analyse de ce rapport.

Le Comité scientifique (CS) du HCB a examiné le rapport concernant la culture du maïs MON 810 dans l'Union européenne en 2018 en tenant compte des résultats de surveillance des années précédentes. Par souci de concision et d'efficacité, les commentaires du CS du HCB se concentrent sur les points du rapport de surveillance identifiés comme critiquables. La traduction de ces commentaires en anglais à destination de la Commission et de l'EFSA figure en Annexe 2 du document.

2. Commentaires

En 2018, la culture du maïs MON 810 dans l'Union européenne a couvert environ 120 979 ha répartis dans deux pays – l'Espagne (115 246 ha, 95,3 %) et le Portugal (5 733 ha, 4,7 %). Ces surfaces sont en baisse par rapport à 2017 (131 553 ha dans l'Union européenne[14]).

La société Bayer Agriculture BVBA a réalisé une surveillance de deux types :

- une surveillance spécifique, dédiée au suivi de l'évolution de la sensibilité des populations de pyrales et de sésamies à la toxine Cry1Ab produite par le maïs MON 810, dans un contexte de

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

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

[13] EFSA : *European Food Safety Authority* (Autorité européenne de sécurité des aliments).

[14] 124 227 ha (94,4 %) en Espagne et 7 308 ha (5,6 %) au Portugal.

gestion stratégique visant à prévenir/retarder le développement de résistance à la toxine chez ces insectes cibles ;

- une surveillance générale, dont l'objectif est de détecter d'éventuels effets négatifs inattendus du maïs MON 810 sur l'environnement ou la santé. Cette surveillance a été réalisée par l'intermédiaire d'enquêtes menées auprès de producteurs de maïs MON 810, par une analyse de la littérature scientifique publiée sur l'année écoulée, et lors de mesures d'accompagnement réalisées par la société Bayer Agriculture BVBA.

2.1 Surveillance spécifique et gestion de la résistance aux insectes

La toxine Cry1Ab produite par les plantes de maïs MON 810 exerce une pression de sélection qui peut conduire au développement de résistance chez les insectes ciblés par cette protéine, notamment la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) en Europe et aux Etats-Unis, et la sésamie (*Sesamia nonagrioides*), plus spécifique des pays méditerranéens. Un tel développement de résistance conduirait à la perte d'une stratégie utile à l'ensemble de la communauté agricole pour lutter contre ces lépidoptères ravageurs du maïs et au recours à des insecticides potentiellement plus dommageables pour l'environnement. Il est donc important de prendre des mesures pour minimiser ce risque, d'en contrôler la mise en œuvre et de suivre l'efficacité de la technologie par une surveillance de la sensibilité des ravageurs ciblés dans l'Union européenne.

Ces principes sont repris dans le Plan de gestion des résistances des insectes d'Europabio, élaboré par Monsanto et trois autres firmes[15] en 2003, mis à jour en 2012 puis en septembre 2017 et annexé au rapport de surveillance de Bayer Agriculture BVBA (Appendix 6). Ce plan contient des recommandations sur les éléments clés suivants : (1) la mise en place de refuges, (2) la surveillance de la résistance chez les organismes cibles, (3) le système de plainte des agriculteurs, (4) le plan correctif en cas de perte d'efficacité du maïs Bt contre les organismes cibles et (5) la communication et la formation des agriculteurs.

Le CS du HCB a effectué ci-après une analyse critique de la mise en œuvre de certaines mesures de gestion et de surveillance de la résistance et des résultats présentés dans le rapport de surveillance de la culture du maïs MON 810 dans l'Union européenne en 2018.

- **Zones refuges**

Pour prévenir ou retarder le développement de résistance à la toxine Cry1Ab chez les ravageurs cibles du maïs MON 810, le Plan de gestion des résistances des insectes d'Europabio prévoit que les agriculteurs cultivant plus de 5 ha de MON 810 réservent une zone – dite refuge – à des plantes de maïs n'exprimant pas la toxine Cry1Ab, sur une surface correspondant à au moins 20 % de la surface cultivée en maïs MON 810.

En 2018, 250 agriculteurs – 238 en Espagne et 12 au Portugal –, répartis dans des environnements représentatifs des différents sites de culture du MON 810, ont été interrogés sur la mise en place de zones refuges par l'intermédiaire de questionnaires envoyés dans le cadre de la surveillance générale. Tandis que les agriculteurs portugais ont tous indiqué avoir respecté les recommandations en matière de refuge, 9,2 % des agriculteurs espagnols (22 sur 238) ont indiqué y avoir dérogé, invoquant, selon Bayer, l'une des raisons suivantes :

(i) une complication des opérations de semis ou manque de temps (14/21; 63,3%)

(ii) un risque de pertes de rendement en maïs conventionnel (6/21; 28,6%).

[15] Syngenta Seeds, Pioneer Hi-Bred International Incorporated et Dow AgroSciences.

Le CS du HCB note que ces réponses ne concernent que 20 agriculteurs, alors que 22 sont concernés et 21 affichés. Les réponses méritent d'être complétées.

Le CS note également qu'au-delà de ces 22 agriculteurs, 12 % n'ont pas planté de refuge en Espagne sans pour autant déroger aux recommandations afférentes, du fait de la superficie inférieure à 5 ha de leur culture en maïs MON 810. Les agriculteurs possédant deux ou trois parcelles de moins de 5 ha étaient toutefois comptabilisés dans ceux dérogeant aux recommandations en 2017. Ces agriculteurs ont-ils été interrogés cette année ; ont-ils mis en place des zones refuges ? La fréquence plus importante de ces caractéristiques dans le parcellaire européen conduit le CS du HCB à des recommandations d'implémentation des refuges au niveau du territoire (voir ci-dessous).

Ces chiffres témoignent globalement d'une sensibilisation positive des agriculteurs à la gestion du risque de développement de résistance des ravageurs cibles. Les résultats de l'Espagne, qui représente 95,2 % des surfaces cultivées, se sont stabilisés (13,7 %, 5.8 %, 8,4 %, 7,2 % et 9,2 % des agriculteurs interrogés indiquaient ne pas respecter les exigences en matière de refuge en 2012, 2014, 2016, 2017 et 2018, respectivement). Toutefois, les informations données par les agriculteurs sur leur respect des zones refuges peuvent présenter un *biais stratégique* au sens économique du terme. En effet, l'incitation des agriculteurs à respecter les zones refuges repose uniquement sur une recommandation de Bayer, portée par des outils de communication. De ce point de vue, le plan de gestion des résistances est insuffisant puisque, si les agriculteurs ont un intérêt collectif à retarder le développement de la résistance, ils n'ont en théorie pas d'intérêt individuel à supporter les coûts associés à une zone refuge. Le plan de gestion des résistances est plus cadré aux Etats-Unis, où les firmes commercialisant des plantes génétiquement modifiées exprimant une toxine Bt[16] sont légalement tenues de vérifier le respect des zones refuges et sanctionner les agriculteurs identifiés comme ne les respectant pas (EPA, 2010). Nouveauté notable en 2018 : la société Bayer recommande que les refuges soient pris en compte dans les demandes de subvention de la Politique Agricole Commune (PAC) ou de réglementations nationales, et que les producteurs qui ne respectent pas les refuges voient leur exclusion ou une diminution des programmes de compensation.

Les résultats de Camargo *et al.* (2018) et l'analyse par le HCB des données de surveillance de la culture du maïs MON 810 en 2017 (HCB, 2019) concernant l'évolution de la fréquence des allèles de résistance à Cry1Ab dans les populations de sésamies de la vallée de l'Èbre soulignent l'importance de respecter les exigences en matière de zones refuges. Dans ce contexte, le CS du HCB réitère deux recommandations pour en garantir la mise en œuvre :

1. le CS du HCB propose que la Commission européenne impose le respect des zones refuges par les agriculteurs cultivant du MON 810 ou toute autre culture exprimant une toxine Bt, par l'intermédiaire d'une mention explicite dans la décision d'autorisation de cette culture. Dans ce contexte, des mécanismes incitant au respect des zones refuges pourraient être instaurés auprès des agriculteurs, tels qu'un engagement contractuel associé à un mécanisme de vérification/sanction ou comme proposé par la société Bayer au travers de la PAC ;
2. le plan de gestion des résistances chez les insectes cibles devrait être adapté aux conditions européennes, où les exploitations agricoles sont plus morcelées que sur le continent américain. Ainsi, les recommandations de mise en place de 20 % de zones refuges par surfaces cultivées de maïs Bt de plus de 5 ha devraient être considérées au niveau du territoire et non au niveau d'exploitations individuelles et faire l'objet d'une concertation entre agriculteurs de la zone considérée.

[16] Toxine insecticide dérivée d'une bactérie *Bacillus thuringiensis.*

- **Surveillance de la sensibilité des ravageurs cibles**

Objectif :

L'objectif de la surveillance de la sensibilité des ravageurs cibles à la toxine Cry1Ab exprimée par le MON 810 est de permettre la détection rapide de toute baisse de sensibilité de ces populations. Une telle baisse de sensibilité des ravageurs cibles, résultant de la sélection et de la multiplication de ravageurs résistants à la toxine Cry1Ab, pourrait entraîner une protection insuffisante des variétés de maïs MON 810, et plus globalement, la perte d'une stratégie utile de lutte contre ces ravageurs. La détection d'une baisse de sensibilité des populations de ravageurs cibles à la toxine Cry1Ab doit être suffisamment rapide pour permettre la mise en œuvre de mesures pour freiner voire stopper le développement de la résistance dans ces populations.

Méthodologie suivie par le pétitionnaire :

Depuis 2016, deux changements majeurs sont intervenus dans la méthodologie appliquée par le pétitionnaire :

(i) suite à des recommandations et avis du Panel OGM de l'EFSA (EFSA, 2015, 2016a; EFSA *et al.*, 2017b), le plan de gestion de résistance des insectes a été révisé : l'échantillonnage est désormais annuel, et uniquement dans les zones où le taux d'adoption de maïs Bt dépasse 60 %. En conséquence, les efforts de surveillance sont désormais concentrés dans le nord-est de la péninsule Ibérique (vallée de l'Ebre) ;

(ii) la sensibilité des ravageurs cibles à la toxine Cry1Ab est évaluée non plus par le calcul de la concentration à laquelle 50 % (MIC_{50})[17] ou 90 % (MIC_{90}) des individus testés montrent une inhibition de la mue[18], mais par la méthode de la dose diagnostic. Cette dose diagnostic est supposée provoquer une inhibition de la mue chez au moins 99 % des larves de premier stade d'une population sensible du ravageur cible. Elle offre, selon EuropaBio, une sensibilité accrue par rapport à la méthode dose-réponse pour détecter les changements de sensibilité aux protéines Cry (Sims *et al.*, 1996). A la demande du Panel OGM de l'EFSA (EFSA, 2015, 2016a; EFSA *et al.*, 2017b), l'échantillonnage des ravageurs cibles doit atteindre au moins 1 000 larves pour détecter une fréquence des allèles de résistance de 3 %, fréquence permettant une détection suffisamment précoce pour prévoir la mise en œuvre de mesures de gestion appropriées pour en freiner le développement. En outre, un contrôle « négatif » a été appliqué pour évaluer la survie des larves de pyrale se développant au-delà du premier stade larvaire à la dose diagnostic, sur des morceaux de feuille de maïs MON 810. Dans le cas de la sésamie, 200 larves de chaque cage non utilisées dans les bioessais de dose diagnostic sont exposées à des feuilles fraîches de MON 810. Les larves qui sont passées au deuxième stade larvaire ont été maintenues sur du maïs Bt, tandis que leurs congénères issues de la même cage sont élevées pour tester de la même façon la descendance F2 sur des feuilles de maïs Bt.

[17] MIC : *molting inhibition concentrations*, concentrations conduisant à l'inhibition de la mue. Ex : MIC_{50} et MIC_{90}, concentrations conduisant à l'inhibition de la mue de 50 % et 90 % des larves testées.

[18] Méthodologie expliquée dans les commentaires du CS du HCB du 8 novembre 2013 sur le rapport de culture du MON 810 en 2012 : la sensibilité à la toxine Cry1Ab des populations de pyrales et de sésamies présentes dans les champs de maïs MON 810 était précédemment évaluée par la détermination, en laboratoire, des concentrations en toxine conduisant à l'inhibition de la mue (MIC) des insectes récoltés. L'évolution de cette sensibilité à la toxine était déduite de la comparaison des valeurs obtenues pour des insectes échantillonnés à une année n à celles d'insectes échantillonnés dans les mêmes régions de culture du MON 810 les années précédentes (HCB, 2013). Pour faciliter la comparaison des résultats annuels de sensibilité des populations de pyrales entre eux, et prendre en compte les variations dues aux conditions expérimentales et à l'utilisation de différents lots de toxine, le HCB avait proposé de calculer des "*resistance ratios*" ou rapports entre les sensibilités à un même lot de toxine Cry1Ab des insectes échantillonnés et celles de la souche sensible de laboratoire dont Monsanto disposait des données.

Cas des pyrales du maïs :

Une dose diagnostic (MIC_{99}) a été établie sur la base de la moyenne de tous les bioessais réalisés de 2005 à 2012 (total de 11 502 larves) sur des populations échantillonnées en Europe. La dose diagnostic obtenue est de 28,2 ng/cm^2. Sur les 1 144 larves collectées dans la vallée de l'Èbre en Espagne, 534 spécimens (46,7 %) ont survécu à la période de diapause, ont atteint le stade adulte et se sont accouplés. Des 1 768 larves testées en 2018 et exposées à la dose diagnostic, seulement 3 (0,15 %) ont atteint le deuxième stade larvaire. Ces larves sont mortes dans les cinq jours après avoir été nourries avec du maïs Bt. Selon les conclusions du rapport, aucune preuve d'une diminution de la sensibilité des pyrales du maïs à Cry1Ab n'a pu être détectée.

S'il est certain que la méthode de la dose diagnostic est plus simple à mettre en œuvre que le calcul de la MIC_{50}, qui demande de tester 6 à 8 doses, la méthode en elle-même et son application par Bayer présentent des limites certaines :

- la dose diagnostic a été établie à partir de données de bioessais réalisés sur la période 2005-2012 avec des lots différents de toxine Cry1Ab, dont l'efficacité (calculée à partir de la MIC_{50} obtenue sur la souche de laboratoire, Tableau 1) était 2 à 4 fois supérieure à celle du lot utilisé en 2017 et 2018. Le calcul de la dose diagnostic devrait prendre en compte cette différence d'efficacité entre lots de toxine. La Figure 6 (Annexe 8) montre clairement que pour le lot de toxine utilisé pour tester les larves collectées en 2018, la dose entraînant l'inhibition de la mue de 99% de larves semble bien inférieure à la dose de 28,22 ng/cm² utilisée comme dose diagnostic (le graphe permet d'estimer cette dose autour de 12 ng/cm^2 pour la souche de référence RefG)[19]. La dose diagnostic utilisée est donc clairement surévaluée ;
- la dose diagnostic provient de données de terrain établies sur des populations dont certaines avaient déjà été exposées au maïs Bt et donc soumises à une pression de sélection ;
- la méthode de la dose diagnostic en elle-même ne permet pas de détecter une évolution faible de la fréquence des allèles de résistance, en particulier lorsque cette résistance est récessive. Pour améliorer la sensibilité et la précision de la stratégie de surveillance actuelle, un test de surveillance du type « *F2 screen* » (Andow and Alstad, 1998) devrait être conduit pour estimer la fréquence initiale des allèles de résistance dans une population donnée (voir l'étude de Camargo *et al.* (2018) sur les sésamies).

[19] Par ailleurs, l'étude présentée dans cette Figure 6 (Annexe 8, Rapport de surveillance de 2018), comparant les réponses de deux lignées de référence au même lot de toxine avait conduit à des résultats très différents dans le Rapport de 2017 (Figure 6, Annexe 8), pour chacune des souches ainsi que pour leur relation entre elles. Il est donc d'autant plus légitime de s'interroger sur la pertinence de cette méthode pour estimer une éventuelle augmentation de la sensibilité des pyrales à la toxine Cry1Ab.

Tableau 1. Resistance ratios (RR) et mortalité à la dose diagnostic (RDC) des populations de pyrales échantillonnées en 2017 en comparaison aux prélèvements antérieurs dans la même région.

Echantillons testés	Année du test	Lot de toxine	RDC [a]	MIC_{50} [b]	MIC_{90} [b]	RR MIC_{50} [c]	RR MIC_{90} [c]
Sud-ouest de la péninsule Ibérique							
2008 (ES 01, ES 02, ES 03)	2009	1		3,39	6,90	0,93	0,72
2010 (ES 02, ES 10)	2011	1		5,76	11,85	0,95	0,68
2012 (ES 01, ES 03)	2013	2		4,08	8,69	11,03	7,69
2014 (ES01, ES02, P01)	2015	2a		1,32	3,80	4,71	8,26
Centre de la péninsule Ibérique							
2015 (ES07, ES15, ES08)	2016	2a		1,88	3,38	1,03	1,15
Nord-est de la péninsule Ibérique							
2015 (ES13, ES05, ES14)	2016	2a		2,12	5,43	1,16	1,84
2016 (ES13, ES11, ES14)	2017	2b	99,23				
2017 (ES13, ES05, ES14)	2018	2b	99,19				
2018 (Lanaja 1)	2019	2b	100				
2018 (Lanaja 3)	2019	2b	100				
2018 (Cantalobos)	2019	2b	99,43				
2018 (San Juan de Fulmen)	2019	2b	100				
2018 (Penalba)	2019	2b	100				
2018 (Candasnos 1)	2019	2b	99,31				
2018 (Candasnos 3)	2019	2b	100				
2018 (Aibar 1+2)	2019	2b	100				
2018 (Sanguesa 1)	2019	2b	100				
2018 (Sanguesa 2)	2019	2b	100				
Souche sensible de référence RefG							
(maintenue en laboratoire)	2009	1		3,65	9,56		
	2011	1		6,08	17,43		
	2013	2		0,37	1,13		
	2015	2a		0,28	0,46		
	2017	2b		13,63	17,67		
	2018	2b		3,93	7,23		

[a] RDC (*Response to Diagnostic Dose (or Concentration)*) correspond au pourcentage de larves mortes ou qui ne sont pas passées au deuxième stade larvaire à la dose diagnostic ; [b] Les données de MIC_{50} et MIC_{90} (exprimées en ng Cry1Ab/cm^2) proviennent des rapports de surveillance de Monsanto puis Bayer de 2008 à 2018 ; [c] Les rapports entre les MIC annuels des échantillons collectés dans les champs de maïs MON 810 et ceux de la souche de référence ont été calculés par le CS du HCB.

Les recommandations du HCB suite à l'expertise du rapport de surveillance de la culture du MON 810 en 2012 sur (i) l'utilisation des « resistance ratios » – qui mettaient en évidence une possible évolution de la résistance en 2012 dans les populations du sud-ouest de la péninsule Ibérique – ou sur (ii) l'importance de ré-échantillonner dès 2013 les populations de pyrales dans cette zone – pour statuer sur une éventuelle augmentation de leur niveau de résistance à la toxine Cry1Ab – n'ont pas été prises en compte. Au lieu de cela, le suivi de la sensibilité des populations a été réduit à la zone nord-est de la péninsule Ibérique (selon les recommandations de l'EFSA de cibler l'échantillonnage dans les régions où le taux d'adoption dépasse les 60 %) et au test d'une dose diagnostic (MIC_{99}) dont le mode d'établissement reste critiquable.

Le CS du HCB se satisfait que ses recommandations formulées suite à l'expertise du rapport de surveillance de la culture du MON 810 en 2017 concernant l'importance (i) de ne pas regrouper les larves provenant de zones différentes, (ii) de fournir les données brutes des différents essais ont été suivies. En revanche, le CS du HCB réitère ses critiques de la méthode de la dose diagnostic pour suivre l'évolution de la sensibilité des ravageurs et sa recommandation en faveur d'un test de type *F2 screen*.

Cas des sésamies :

A partir de 2016, une dose diagnostic de 1 091 ng Cry1Ab/cm^2, calculée à partir des données recueillies de populations de sésamies du nord-est de l'Espagne au cours des saisons 2009, 2011, 2013 et 2015, a été utilisée pour évaluer la sensibilité à la protéine Cry1Ab. Sur les 1 490 larves collectées, 637 adultes (43 %) ont émergé et la progéniture de 95 % de ces adultes (554) a été utilisée dans les essais biologiques. Des 3 449 larves exposées à la dose diagnostic en 2018, 1,35 % ont atteint le deuxième stade larvaire. Cependant, la même dose diagnostic appliquée à la souche de laboratoire n'a pas provoqué d'inhibition de la mue pour 2,25 % des individus testés. Dans les bioessais sur feuille de maïs Bt, toutes les larves (10 294) sont mortes après une alimentation continue sur des feuilles de maïs Bt (99,9 % sont mortes avant d'atteindre le deuxième stade larvaire et 0,1 % avant d'atteindre le troisième stade larvaire). Pour confirmer que les larves ayant atteint le deuxième stade ne sont pas résistantes au MON 810, 128 larves F2 de congénères provenant de la même cage de ponte ont été nourries avec des feuilles de MON 810 et sont toutes mortes avant d'atteindre le deuxième stade larvaire. La société Bayer conclut qu'aucun signe de diminution de la sensibilité de *S. nonagroides* à Cry1Ab n'a été détecté.

En 2018, comme en 2017, une inhibition de la mue chez moins de 98 % des larves de premier stade de la souche dite sensible de laboratoire a été observée. Au vu de ces résultats, on peut s'interroger sur la robustesse de la dose diagnostic, qui devrait provoquer une inhibition de la mue chez au moins 99 % des larves de premier stade de la souche dite sensible de laboratoire. Deux hypothèses permettant d'expliquer la faible sensibilité de la souche de laboratoire peuvent être formulées : (i) une toxicité moindre du lot B2-6 de toxine Cry1Ab utilisé en 2018 par rapport aux lots utilisés de 2009 à 2015, hypothèse la plus probable au regard de la sensibilité de la souche de laboratoire à différents lots de toxine, présentée dans le Tableau 2, ou (ii) l'introduction d'individus sauvages non sensibles dans la souche sensible de laboratoire (introduction annuelle). Cette observation montre l'importance de maintenir une souche de laboratoire sensible à laquelle les populations du terrain peuvent être comparées, et de prendre en compte la variabilité de la toxicité des différents lots de toxine dans le calcul de la dose diagnostic pour une interprétation correcte des résultats.

Tableau 2. Resistance ratios (RR) et mortalité à la dose diagnostic (RDC) des populations de sésamies échantillonnées en 2017 en comparaison aux prélèvements antérieurs dans la même région.

Echantillons testés	Année du test	Lot de toxine	RDC [a]	MIC_{50} [b]	MIC_{90} [b]	RR MIC_{50} [c]	RR MIC_{90} [c]
Sud-ouest de la péninsule Ibérique							
Collectés en 2005	2005	B1		16	30		
Collectés en 2007	2007	B1		17	226	1,06	2,40
Collectés en 2010	2010	B1		16	86	2,00	1,16
Collectés en 2012	2012	B2-1		29	158	4,14	2,55
Collectés en 2014	2014	B2-2		31	236	1,82	2,59
Centre de la péninsule Ibérique							
Collectés en 2004	2004	B1		12	248	0,67	2,51
Collectés en 2006	2006	B1		7	321		
Collectés en 2008	2008	B1		28	170		
Collectés en 2010	2010	B1		10	119	1,25	1,61
Collectés en 2012	2012	B2-1		15	160	2,14	2,58
Collectés en 2014	2014	B2-2		15	138	0,88	1,52
Nord-est de la péninsule Ibérique							
Collectés en 2005	2005	B1		9	76		
Collectés en 2007	2007	B1		14	99	0,88	1,05
Collectés en 2009	2009	B1		22	188	1,16	1,57
Collectés en 2011	2011	B2-1		20	135	2,22	1,99
Collectés en 2013	2013	B2-2		19	163	2,71	3,40
Collectés en 2015	2015	B2-2		17	84	0,61	1,25
Collectés en 2016 Zone 1	2017	B2-3	98,86				
Collectés en 2016 Zone 2	2017	B2-3	98,47				
Collectés en 2016 Zone 3	2017	B2-3	96,56				
Collectés en 2017 Zone 1	2018	B2-4	91,75				
Collectés en 2017 Zone 2	2018	B2-4	96,50				
Collectés en 2017 Zone 3	2018	B2-4	94,28				
Collectés en 2018 Zone 1	2019	B2-6	97,85				
Collectés en 2018 Zone 2	2019	B2-6	99,06				
Collectés en 2018 Zone 3	2019	B2-6	99,05				
Souche sensible de référence							
(maintenue en laboratoire)	2004	B1		18	99		
	2007	B1		16	94		
	2008-9	B1		19	120		
	2010	B1		8	74		
	2011	B2-1		9	68		
	2012	B2-1		7	62		
	2013	B2-1		7	48		
	2014	B2-2		17	91		
	2015	B2-2		28	67		
	2016	B2-3		30	83		
	2017	B2-4	97,69	24	162		
	2018	B2-6	97,75	19	116		

[a] RDC (*Response to Diagnostic Dose (or Concentration)*) correspond au pourcentage de larves mortes ou qui ne sont pas passées au deuxième stade larvaire à la dose diagnostic ; [b] Les données de MIC_{50} et MIC_{90} (exprimées en ng Cry1Ab/cm^2) proviennent des rapports de surveillance de Monsanto puis Bayer de 2005 à 2019 ; [c] Les rapports entre les MIC annuels des échantillons collectés dans les champs de maïs MON 810 et ceux de la souche de référence ont été calculés par le CS du HCB.

Par ailleurs, la méthodologie statistique utilisée pour analyser ces résultats – synthétisés dans le Tableau 9 (Annexe 7, p. 24) – est discutable et interroge la conclusion selon laquelle aucune réduction de sensibilité des sésamies à la toxine Cry1Ab n'aurait été détectée. En effet, le test mis en œuvre porte sur la moyenne de trois proportions moyennes, obtenues dans trois zones géographiques différentes. La statistique de test suit alors une distribution *t* avec 2 degrés de libertés, ce qui rend le test très peu puissant. Plutôt que de calculer des moyennes de trois proportions et introduire artificiellement une grande variabilité, il serait plus pertinent de considérer chacune de ces proportions comme une proportion calculée sur un grand nombre d'individus (supérieur à 1000 ici) et de tester si elles sont égales au 99 % attendu au moyen d'un test classique de proportion. Une telle analyse statistique a permis de montrer que les différences pour 2017 étaient très clairement significatives, révélant une réduction de sensibilité des sésamies à la toxine Cry1Ab, contrairement aux conclusions alors énoncées[20] (HCB, 2019).

Conclusion

L'analyse des données fournies dans le rapport de surveillance ne met pas en évidence de perte significative de la sensibilité à la toxine Cry1Ab des populations de pyrales ou de sésamies échantillonnées en 2018. Ces résultats sont conformes aux récentes publications démontrant l'absence de développement de résistance chez le deux ravageurs cibles, *O. nubilalis* et *S. nonagroides*, après plus de dix années de culture de MON 810 dans l'UE (Castanera *et al.*, 2016; Farinos *et al.*, 2018; Thieme *et al.*, 2018).

Le CS du HCB identifie toutefois une série de limites méthodologiques qui ne permettent pas de s'appuyer sur le résultat des analyses de Bayer pour conclure quant à une évolution de résistance chez les ravageurs ciblés.

Le HCB estime que la méthode de la dose diagnostic présente des limites intrinsèques pour la détection précoce de l'évolution de la résistance et recommande une méthode alternative de type *F2 screen* permettant de déterminer la fréquence des allèles de résistance au sein d'une population de ravageurs cibles.

Au-delà des limites intrinsèques de la méthode de la dose diagnostic, le CS du HCB est critique des conditions de son application par Bayer. En effet, les doses diagnostic utilisées ont été établies de manière inappropriée. Les données sur la souche de référence montrent clairement une surévaluation de la dose diagnostic utilisée pour les sésamies. Enfin, l'analyse statistique mise en œuvre pour détecter une éventuelle perte de sensibilité chez ces ravageurs n'est pas adaptée – une ré-analyse des données de 2017 avec une méthodologie plus adaptée avait mis en évidence une perte significative de sensibilité chez les sésamies échantillonnées dans le nord-est de la péninsule Ibérique (HCB, 2019), en cohérence avec l'étude de Camargo *et al.* (2018).

[20] p=0,00026 pour les 99 % attendus (différence de 3,5 écart-types) ; p=0,0056 pour la comparaison aux données de laboratoire (différence de 2,5 écart-types).

2.2 Surveillance générale

Destinée à détecter d'éventuels effets négatifs du maïs MON 810 sur l'environnement ou la santé qui n'auraient pas été anticipés par l'évaluation des risques réalisée lors de la demande d'autorisation de mise sur le marché à des fins de culture, la surveillance générale a été menée par la société Bayer en 2018 par l'intermédiaire de trois activités complémentaires : (1) des enquêtes menées auprès de producteurs de maïs MON 810, (2) une analyse de la littérature scientifique publiée pendant la période de culture correspondante, et (3) des mesures d'accompagnement réalisées par la société dans l'éventualité d'alertes sur le maïs MON 810. Comme en 2017, l'utilisation de réseaux de surveillance environnementale existants, envisagée dans les précédents rapports, n'a pas été développée suite aux limitations soulignées par Europabio et l'EFSA associées à l'exploitation de ces données.

- **<u>Analyse des réponses des agriculteurs au questionnaire de surveillance</u>**

Un questionnaire de surveillance a été conçu pour faciliter le rapport et l'évaluation d'observations des agriculteurs concernant d'éventuels effets non anticipés du maïs MON 810 dans les régions où il est cultivé. Initialement élaboré par le Centre allemand de recherche pour l'agriculture et la forêt (*German Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry* (BBA, now JKI)), des sélectionneurs et des statisticiens (Wilhelm *et al.*, 2004), le questionnaire a régulièrement été révisé et amélioré, notamment pour en améliorer l'analyse statistique.

Le questionnaire concerne quatre types de données :

- des données de base relatives à la culture du maïs (superficie, maladies et ravageurs locaux indépendamment de la nature des variétés cultivées, GM ou non…) ;
- les pratiques agronomiques standard pour la culture du maïs (permettant d'établir une ligne de référence) ;
- les observations relatives au maïs MON 810 ;
- la mise en œuvre des mesures spécifiques visant à prévenir le développement de résistance à la toxine Bt chez les insectes cibles du maïs MON 810 (Ces données visent notamment à s'assurer du respect des zones refuges, qui est un objectif traité dans le cadre de la surveillance spécifique (voir 2.1)).

L'objectif du questionnaire étant notamment d'identifier d'éventuels effets inattendus du maïs MON 810, les questions sont formulées de telle sorte que toute déviation par rapport au maïs conventionnel puisse être identifiée. Dans cet objectif, trois types de réponses sont proposées aux agriculteurs pour chaque question : *Comme d'habitude, Plus* (par ex. plus tard, plus haut, davantage) et *Moins* (par ex. plus tôt, plus bas ou moins)[21]. La société Bayer Agriculture BVBA définit la ligne de référence comme 90 % de réponses *Comme d'habitude* et 10 % de réponses autres, réparties de manière équilibrée entre des valeurs proches de 5 % de *Plus* et 5 % de *Minus*. Sur cette base, elle indique qu'une fréquence relativement élevée (définie comme supérieure à 10 %) de réponses *Plus* – ou *Moins* – signalerait de possibles effets associés à la culture du MON 810. En d'autres termes, si moins de 10 % d'agriculteurs déclaraient un effet donné, la société conclurait qu'il n'y a pas d'effet, et si plus de 10 % d'agriculteurs déclaraient cet effet, la société conclurait à la possibilité de cet effet. Pour décider si ce seuil de 10 % est franchi, un intervalle de confiance de la probabilité de répondre *Plus* (ou *Moins*) à partir des données recueillies auprès d'un échantillon d'agriculteurs est construit. La borne inférieure de cet intervalle de confiance est 0. Si la borne supérieure est inférieure à 10 %, il est admis qu'il n'y a pas d'effet ; si elle est supérieure à 10 %, il est admis qu'un effet est possible.

[21] Formulation originale en anglais: *As usual*, *Plus (e.g. later, higher, more)* and *Minus (e.g. earlier, lower* or *less)*.

Si la méthodologie proposée est correctement mise en œuvre en termes statistiques, le CS du HCB questionne sa pertinence par rapport à l'objectif de surveillance générale. En effet, pour chaque aspect examiné, les effets observés en lien avec la culture du maïs MON 810 ne sont considérés par la société Bayer Agriculture BVBA que s'ils sont rapportés par plus de 10 % des agriculteurs questionnés. L'hypothèse testée porte donc sur un nombre d'agriculteurs observant un effet. On ne teste ni la présence d'un effet, ni la taille de cet effet. Autrement dit, si moins de 10 % des agriculteurs rapportent un effet néfaste particulier, cet effet ne sera pas pris en compte dans les résultats du questionnaire, et ce quelle que soit la taille de l'effet observé.

En appliquant cette règle, aucun effet adverse statistiquement significatif n'a été détecté en 2018. Les effets significatifs incluent une meilleure résistance à la verse et un meilleur rendement.

Toutefois, comme les années précédentes, le CS du HCB est critique de la nature arbitraire des règles de décision appliquées ainsi que de la formulation discutable des conclusions. Prenons l'exemple de la sensibilité aux ravageurs (*pest susceptibility*) (Annexe 1, pp 61-65). Le test mis en œuvre ne permet pas de conclure que la proportion de *As usual* est inférieure à 90 %. La société Bayer conclut alors ainsi « *No effect on susceptibility to other pests is indicated*». Or, ce n'est pas parce que au moins 90 % d'agriculteurs considèrent qu'il n'y a pas d'effet que l'on peut conclure à l'absence d'effet (les 5 % d'agriculteurs qui ont « vu » un effet ne peuvent pas être ignorés sur la base de ce test)[22].

Enfin, concernant les agriculteurs qui ont participé à l'enquête – 250 agriculteurs dont 238 en Espagne et 12 au Portugal – il est indiqué p. 14-16 de l'*Appendix 1* que le nombre d'agriculteurs sondés en Espagne et par région est calculé selon les besoins statistiques et en proportion des cultures, alors que p. 23, on comprend que ce chiffre résulte de différentes situations (erreurs, refus, absences…) à partir d'un échantillon initial de 491 agriculteurs contactés (479 en Espagne et 12 au Portugal). Comment était-il possible d'anticiper que les agriculteurs qui accepteraient de répondre à l'enquête allaient satisfaire ces contraintes de répartition ? Ne devrait-on juste pas considérer plutôt que les agriculteurs ont été contactés en nombre suffisant, avec des ajustements au fil de l'eau, de telle sorte que les proportions calculées soient respectées *in fine* ? On peut également se demander si les motifs de refus/acceptation n'introduisent pas un biais dans l'enquête. Pour remédier à ce problème, le CS du HCB propose de faire reposer la surveillance générale non plus majoritairement sur l'outil du questionnaire mais également 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, depuis le début de la démarche de surveillance générale, plus de 3000 questionnaires et/ou interviews ont été distribués et/ou réalisés. Pour la société Monsanto, l'analyse des réponses à ces questionnaires ne met en évidence aucun effet néfaste inattendu de la culture du maïs MON 810. Il n'est toutefois pas fourni d'analyse statistique sur l'ensemble de ces questionnaires, qui permettrait d'obtenir une puissance statistique plus appropriée concernant l'analyse de la survenue d'effets inattendus associés à la culture du maïs MON 810.

En conclusion, si le questionnaire de surveillance et son analyse n'ont pas mis en évidence d'effets inattendus associés à un risque du maïs MON 810, ils posent un problème de pertinence méthodologique quant aux questions étudiées, avec des règles de décision arbitraires, des

[22] Signalons d'autre part que le questionnaire de 2017 avait conduit à une conclusion inverse (Rapport 2017, Annexe 1, pp 67-68). Sur la base des réponses des agriculteurs, le test mis en œuvre permettait de conclure que la proportion de *As usual* était inférieure à 90 %. La société concluait alors *"Taken together, 2017 data indicate that in comparison to conventional maize, MON 810 plants were less susceptible to pests other than corn borers, especially lepidopteran pests"*. Cette règle est totalement arbitraire et provient de la fixation d'un seuil de 10 % et d'un intervalle de confiance à 99 %. Sans aucune information sur la taille de l'effet observé par les 8 % d'agriculteurs qui en ont détecté un, le fait que plus de 90 % considèrent l'impact comme *As usual* ne devait pas autoriser à une telle conclusion.

conclusions incorrectement justifiées, et un possible biais associé au format d'enquête auprès du panel d'agriculteurs qui ont accepté de répondre au questionnaire de Bayer.

- **Analyse bibliographique**

Une revue de la littérature scientifique a été réalisée sur la période de juin 2018 à mai 2019.

La société Bayer indique avoir suivi la méthodologie d'analyse bibliographique recommandée par l'EFSA (EFSA, 2010; EFSA *et al.*, 2017a). La revue de littérature vise à répondre à la question : « Les aliments dérivés du maïs MON 810 destinés à la consommation humaine ou animale, ou le caractère associé de protection contre les insectes, entraînent-ils des effets négatifs sur la santé humaine ou animale ou sur l'environnement ? »[23].

Si le CS du HCB s'accorde avec la société Bayer sur le fait qu'aucun des 21 articles analysés n'invalide les conclusions de l'évaluation initiale des risques du maïs MON 810, il rappelle que l'absence de preuve d'effets négatifs ne permet pas de conclure à une absence d'effets négatifs, et émet les remarques suivantes quant à la méthodologie de sélection des articles considérés :

Si les critères d'inclusion d'articles ont été correctement définis, les critères d'exclusion après évaluation n'ont pas été listés *a priori*. La liste des articles exclus après évaluation est assortie de motifs d'exclusion. Certains articles ont été exclus de l'analyse au motif qu'ils ne concernaient pas l'événement MON 810. Les articles ayant été sélectionnés sur la base d'une question concernant le trait à l'origine de la résistance vis-à-vis de certains insectes (c'est-à-dire l'expression de Cry1Ab), les articles qui comporteraient le mot-clef Cry1Ab sans pour autant concerner l'événement MON 810 ne devraient pas être exclus.

2.3 Point supplémentaire relatif à la présence de téosintes en Espagne

Il n'existe pas en Europe d'espèce sauvage apparentée au maïs qui soit indigène. Par contre, plusieurs publications scientifiques récentes décrivent la présence de populations de téosinte dans des parcelles cultivées en maïs en Espagne (Devos *et al.*, 2018; EFSA, 2016b; Trtikova *et al.*, 2017). Les téosintes sont des sous-espèces sauvages du genre Zea, originaires du Mexique et d'Amérique centrale. Il existe deux sous-espèces annuelles de téosinte : *Zea mays* ssp *parviglumis*, qui est l'ancêtre du maïs domestique, et *Zea mays* ssp. *mexicana* (Hufford *et al.*, 2012; Sanchez Gonzalez *et al.*, 2018). Cependant, comme en 2017, il n'est jamais fait mention de la présence de téosinte dans le dossier de surveillance 2018.

Surveillance générale :

En 2018, dans le cadre de la surveillance générale, un questionnaire d'enquête a été envoyé, comme en 2017, à 250 agriculteurs, 12 au Portugal et 238 en Espagne. Seulement 7 agriculteurs sur 250 évaluent la pression des plantes adventices comme étant élevée dans leurs parcelles. La totalité des agriculteurs interrogés jugent que la pression des plantes adventices est identique entre les parcelles cultivées en MON 810 et les parcelles cultivées en maïs conventionnel. Vingt-huit espèces de plantes adventices sont citées par les agriculteurs en 2018. Le téosinte ne figure pas dans la liste, contrairement à 2017 où il y avait 2 mentions.

Analyse bibliographique :

L'analyse de la littérature scientifique effectuée sur la période de juin 2018 à mai 2019 a permis d'obtenir la référence suivante (Annexe 5 du rapport) :

[23] *"Does MON 810 maize derived food/feed products and the introduced insect protection trait have adverse effects on human and animal health and the environment?"*

Devos et al. (2018) Teosinte and maize x teosinte hybrid plants in Europe -Environmental risk assessment and management implications for genetically modified maize. Agriculture Ecosystems & Environment, 19-27.

Cette référence n'a pas été retenue car il a été considéré qu'il ne s'agissait pas d'une étude de risque concernant spécifiquement le maïs MON 810. Or, dans le résumé de l'article, il est précisé explicitement que le but des auteurs est d'évaluer les risques environnementaux pour différents événements dont le MON 810 :

« *Concern has been expressed that GM maize may hybridise with teosinte or maize×teosinte hybrids, leading to the development of invasive weeds that pose unconsidered risks to the environment. In order to assess these risks, we hypothesised plausible pathways to harm from the cultivation and import of GM maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21 for situations where GM maize plants and teosinte/maize×teosinte hybrids are Sympatric* »

Et également, dans l'introduction, les auteurs précisent :

« *We focus on maize MON810, Bt11, 1507 and GA21, because these events are currently in the authorisation pipeline for cultivation in Europe (in the case of maize MON810, the market application covers the renewal of authorisation).* »

De toute évidence, cet article aurait donc dû être inclus dans l'analyse bibliographique.

La présence de téosinte en Espagne : historique et distribution géographique

La présence de téosinte en Espagne a été officiellement établie en 2014 par le Centro de Sanidad y Certificacion Vegetal – Gobierno de Aragon (CSCV, 2014), mais les premières observations remonteraient à 2009. Des campagnes de prospection annuelles ont ensuite été menées. En 2014, le foyer d'infestation principal se situe sur la commune de Candasnos, au sud de la province de Huesca en Aragon, avec 200 à 300 ha touchés. D'autres foyers sont détectés dans la même région au nord de la province de Zaragoza, soit au total 46 parcelles pour environ 400 ha. Dans la région voisine de Catalogne (province de Lleida), 3 parcelles sont identifiées. En 2015, une cinquantaine de parcelles sont touchées en Aragon, et 20 nouvelles parcelles (soit 62 ha) sont identifiées en Catalogne. La superficie totale touchée en 2015 est estimée à 685 ha (Cirujeda *et al.*, 2017; Pardo *et al.*, 2016). En 2016, 14 nouvelles parcelles sont détectées, portant la superficie totale à 797 ha (Cirujeda *et al.*, 2017).

Dès 2015, des mesures de contrôle ont été prises en Aragon, rendant obligatoire l'arrêt de la culture de maïs ou sorgho pendant 3 ans sur les parcelles les plus sévèrement infestées. Ces mesures ont permis de réduire fortement la densité de téosinte à l'intérieur des parcelles, mais des plantes restent observées dans les bordures de champ (Cirujeda *et al.*, 2017).

Coïncidence des zones de présence de téosinte et de culture du maïs MON 810

Des estimations des surfaces cultivées en maïs MON 810 par région, par province et par année, sont disponibles sur le site du ministère espagnol en charge de l'environnement (Ministerio Para la Transición Ecológica)[24].

Les surfaces sont relativement stables depuis 2014, les deux principales régions de culture étant l'Aragon et la Catalogne. Parmi les provinces, les trois les plus concernées par la culture du MON 810 sont, par ordre décroissant, la province de Huesca (33 000 ha en moyenne sur 2014-2018), la province de Lleida (29 900 ha en moyenne sur 2014-2018) et la province de Zaragoza (13 800 ha en moyenne sur 2014-2018). Selon l'EFSA ((EFSA *et al.*, 2018), Appendix B), le taux

[24] https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-/consejo-interministerial-de-ogms/superficie.aspx

d'adoption des variétés MON 810 entre 2012 et 2016 est de 60 % environ dans les trois régions d'Aragon, Catalogne et Navarre. Il y a donc une nette coïncidence entre les principales zones de culture du maïs MON 810 et les zones de présence de populations de téosinte ; la probabilité de co-occurrence des deux espèces à des distances rendant possible l'échange de pollen semble élevée.

Possibilité d'hybridation entre le maïs et le téosinte

Des analyses génétiques suggèrent que les téosintes espagnoles sont génétiquement plus proches de la sous-espèce *Zea mays* ssp. *mexicana*, bien que non identiques à celle-ci (Trtikova *et al.*, 2017). Il existe chez *Z. mays* ssp. *mexicana* un système génétique d'incompatibilité qui rend plus difficile sa fécondation par du pollen de maïs que l'inverse. Trtikova *et al.* (2017) ont pu produire facilement des hybrides F1 à partir de croisement entre des téosintes espagnoles comme donneur de pollen et des variétés commerciales espagnoles de maïs MON 810 comme récepteurs femelles. Des premiers essais de croisement en sens inverse (pollinisation manuelle du téosinte avec du pollen de maïs) n'ont abouti que rarement à des semences viables selon ces mêmes auteurs, qui n'excluent pas cependant la production au champ de de tels hybrides, même à faible fréquence. Si les premiers rares hybrides ainsi formés sont davantage compatibles avec le maïs, l'existence actuelle d'une introgression de gènes de maïs chez le téosinte n'est pas exclue.

Ainsi, au vu de la littérature existante concernant (i) la présence de populations de téosintes adventices dans la zone de culture du maïs MON 810 en Espagne et (ii) la possibilité d'échanges génétiques entre ces populations de téosinte et le maïs cultivé, le HCB recommande que le rapport de surveillance considère la présence de téosinte dans des zones de culture du maïs MON 810 en Espagne et les risques potentiels associés à une éventuelle introgression de gènes de maïs MON 810 chez le téosinte.

3. Conclusions

En conclusion générale, les analyses contenues dans le rapport de surveillance de Bayer Agriculture BVBA ne font apparaître aucun problème majeur associé à la culture de maïs MON 810 en 2018.

Toutefois, le CS du HCB identifie encore certaines faiblesses et limites méthodologiques concernant la surveillance de la sensibilité des ravageurs ciblés à la toxine Cry1Ab, remettant en question les conclusions du rapport. Le HCB estime notamment que l'utilisation d'une dose diagnostic présente certaines limites pour la détection précoce de l'évolution de la résistance, tant dans son principe intrinsèque que dans sa mise en œuvre par Bayer, et recommande une méthode alternative de type *F2 screen* permettant de déterminer la fréquence des allèles de résistance au sein d'une population de ravageurs cibles. Par ailleurs, le HCB formule des recommandations destinées à renforcer la mise en œuvre des zones refuges pour prévenir ou retarder le développement de résistance à la toxine Cry1Ab chez les ravageurs ciblés.

Concernant la surveillance générale, le CS du HCB relève un problème de pertinence méthodologique quant aux questions étudiées, avec des règles de décision arbitraires, des conclusions incorrectement justifiées et un possible biais associé au format d'enquête auprès du panel d'agriculteurs qui ont accepté de répondre au questionnaire.

Enfin, le CS du HCB recommande que le rapport de surveillance considère la présence de téosinte dans des zones de culture du maïs MON 810 en Espagne et les risques potentiels associés à une éventuelle introgression de gènes de maïs MON 810 chez le téosinte.

4. Bibliographie

Andow, D., and Alstad, D. (1998). F2 screen for rare resistance alleles. Journal of Economic Entomology *91*, 572-578.

Castanera, P., Farinos, G.P., Ortego, F., and Andow, D.A. (2016). Sixteen years of Bt maize in the EU hotspot: Why has resistance not evolved? Plos One *11*, e0154200.

Cirujeda, A., Pardo, G., Mari, A.I., Fuertes, S., and Aibar, J. (2017). Emergencia de teosinte en cultivos diferentes a maiz. Paper presented at: XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología (Pamplona-Iruña).

CSCV (2014). Informaciones technicas - El teosinte (*Zea mays*, spp.). wwwaragones.

Devos, Y., Ortiz-Garcia, S., Hokanson, K.E., and Raybould, A. (2018). Teosinte and maize x teosinte hybrid plants in Europe — Environmental risk assessment and management implications for genetically modified maize. Agric Ecosyst Environ *259*, 19-27.

EFSA (2010). Application of systematic review methodology to food and feed safety assessments to support decision making. EFSA Journal *8(6):1637*, 90 pp.

EFSA (2015). Clarifications on EFSA GMO Panel recommendations on the Insect Resistance Management plan for genetically modified maize MON 810. EFSA supporting publication *2015:EN-842*, 14 pp.

EFSA (2016a). EFSA GMO Panel. Scientific opinion on the annual post-market environmental monitoring (PMEM) report on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in 2014 from Monsanto Europe S.A. EFSA Journal *14*, 4446.

EFSA (2016b). Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. EFSA supporting publication *2016:EN-1094*.

EFSA, Alvarez, F., Devos, Y., Georgiadis, M., Messéan, A., and Waigmann, E. (2018). Statement on annual post-market environmental monitoring report on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in 2016. EFSA Journal *16*, 5287.

EFSA, Devos, Y., Guajardo, I.M., Glanville, J., and Waigmann, E. (2017a). Explanatory note on literature searching conducted in the context of GMO applications for (renewed) market authorisation and annual post-market environmental monitoring reports on GMOs authorised in the EU market. EFSA supporting publications, 48 pp.

EFSA, Naegeli, H., Birch, A.N., Casacuberta, J., De Schrijver, A., Gralak, M.A., Guerche, P., Jones, H., Manachini, B., Messe an, A.*, et al.* (2017b). Scientific Opinion on the annual post-market environmental monitoring (PMEM) report on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in 2015 from Monsanto Europe S.A. . EFSA Journal *15*, 4805.

EPA, U.S. (2010). Terms and Conditions for Bt Corn Registrations. Office of Pesticide Programs (U.S. Environmental Protection Agency).

Farinos, G.P., Hernandez-Crespo, P., Ortego, F., and Castanera, P. (2018). Monitoring of *Sesamia nonagrioides* resistance to MON 810 maize in the European Union: lessons from a long-term harmonized plan. Pest Manage Sci *74*, 557-568.

HCB (2013). Avis du Comité scientifique du Haut Conseil des biotechnologies sur le rapport de surveillance de culture du MON 810 en 2012 sous forme de commentaires à destination de la Commission européenne (Réf. HCB-2013.11.08). Disponible sur http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr. (Paris), pp. 21.

Hufford, M.B., Bilinski, P., Pyhaejaervi, T., and Ross-Ibarra, J. (2012). Teosinte as a model system for population and ecological genomics. Trends in Genetics *28*, 606-615.

Pardo, G., Cirujeda, A., Mari, A.I., Fuertes, S., and Taberner, A. (2016). El teosinte: descripción, situación actual en el valle del Ebro y resultados de los primeros ensayos. Vida Rural, 42-48.

Sanchez Gonzalez, J.d.J., Ruiz Corral, J.A., Medina Garcia, G., Ramirez Ojeda, G., De la Cruz Larios, L., Holland, J.B., Miranda Medrano, R., and Garcia Romero, G.E. (2018). Ecogeography of teosinte. Plos One *13*.

Sims, S.B., Greenplate, J.T., Stone, T.B., Caprio, M.A., and Gould, F.L. (1996). Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance, T.M. Brown, ed., pp. 229-242.

Thieme, T.G.M., Buuk, C., Gloyna, K., Ortego, F., and Farinos, G.P. (2018). Ten years of MON 810 resistance monitoring of field populations of *Ostrinia nubilalis* in Europe. J Appl Entomol *142*, 192-200.

Trtikova, M., Lohn, A., Binimelis, R., Chapela, I., Oehen, B., Zemp, N., Widmer, A., and Hilbeck, A. (2017). Teosinte in Europe — Searching for the origin of a novel weed. Scientific Reports *7*.

Wilhelm, R., Belssner, L., Schmidt, K., Schmidtke, J., and Schiemann, J. (2004). Monitoring des Anbaus gentechnisch veränderter Pflanzen - Fragebögen zur Datenerhebung bei Landwirten. Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutzd *56*, 184-188.

Annexe 1 – Elaboration des commentaires

Ces commentaires ont été élaborés par le CS du HCB à partir de la discussion de rapports d'expertise en séance du 25 février 2020[25] sous la vice-présidence du Dr Pascal Boireau et du Dr Claudine Franche.

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

Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, Elie Dassa, Barbara Demeneix (démissionnaire), Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer (démissionnaire), Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Tristan Renault, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Hubert de Verneuil, Jean-Luc Vilotte[26].

Le dossier a été examiné par cinq experts rapporteurs du CS du HCB, sélectionnés pour leurs compétences dans les disciplines requises.

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

[25] Membres du CS présents et représentés lors de la discussion des rapports d'expertise en séance du 25 février 2020 : Frédérique Angevin, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Cécile Collonnier, Elie Dassa, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Klonjkowski, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Hubert de Verneuil, Jean-Luc Vilotte.

[26] Composition du CS en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014, à la loi du 2 décembre 2015, et à l'arrêté du 10 avril 2017 portant nomination des membres du HCB.

Annexe 2 – Traduction en anglais

1. Comments

In 2018, MON 810 maize was planted in the European Union on approximately 120,979 ha in two countries: Spain (115,246 ha, 95.3%) and Portugal (5,733 ha, 4.7%). This area was down from 2017 (131,533 ha in the European Union).[27]

Bayer Agriculture BVBA conducted two types of surveillance:

- Case-specific monitoring to track evolution of susceptibility of populations of European corn borers (*Ostrinia nubilalis*) and Mediterranean corn stalk borers (*Sesamia nonagrioides*) to the Cry1Ab toxin produced by MON 810 maize, in a context of strategic management aimed at preventing/delaying development of target pest resistance to the toxin;
- General surveillance to identify any unexpected adverse effects of MON 810 maize on health or the environment. This surveillance was conducted through surveys of MON 810 maize growers, a review of scientific literature published over the past year, and company stewardship measures.

1.1 Case-specific monitoring and insect resistance management

The Cry1Ab toxin produced by MON 810 maize plants exercises a selection pressure that can lead to development of resistance in the pests targeted by this protein, such as the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) in Europe and the United States and the Mediterranean corn borer (*Sesamia nonagrioides*) more specific to the Mediterranean countries. Such resistance development would lead to the loss of a strategy useful to the entire farming community for controlling these corn borers and to recourse to insecticides potentially more damaging to the environment. It is therefore important to take measures mitigating this risk, to supervise their implementation and to track the effectiveness of the technology by monitoring target pest susceptibility in the European Union.

These principles are included in the EuropaBio insect resistance management plan produced by Monsanto and three other firms[28] in 2003, updated in 2012 and again in September 2017 and appended to the Bayer Agriculture BVBA monitoring report (*Appendix 6*). This plan contains recommendations on the following key elements: (1) refuge planting, (2) resistance monitoring for target organisms, (3) growers complaint system, (4) remedial plan in case of *Bt* maize failure to protect against target pests and (5) grower information and education.

The HCB Scientific Committee has produced below a critical assessment of implementation of some of the resistance management and monitoring measures and the findings presented in the monitoring report on cultivation of MON 810 maize in the European Union in 2018.

- **Refuges**

To prevent or delay development of resistance to the Cry1Ab toxin in MON 810 target pests, the EuropaBio insect resistance management plan specifies that growers planting more than 5 ha of MON 810 should set aside a zone – known as a refuge – for maize plants not expressing the Cry1Ab toxin and that this should cover an area equivalent to at least 20% of that planted with MON 810 maize.

[27] 124,227 ha (94.4%) in Spain and 7,308 ha (5.6%) in Portugal.

[28] Syngenta Seeds, Pioneer Hi-Bred International Incorporated and Dow AgroSciences.

In 2018, 250 farmers – 238 in Spain and 12 in Portugal – in environments typical of different MON 810 maize-growing sites were surveyed with regard to the planting of refuges, in questionnaires sent out in connection with general surveillance. While the Portuguese farmers all indicated that they had complied with the refuge recommendations, 9.2% of the Spanish farmers (22 out of 238) said that they had not, for one of the following reasons, according to Bayer:

(i) It complicated planting or there was not enough time (14 out of 21; 63.3%);

(ii) Risk of yield loss in conventional maize (6 out of 21; 28.6%);

The HCB Scientific Committee notes that these replies cover only 20 farmers, although 22 were surveyed and 21 are recorded as replying. The replies ought to be completed.

The Scientific Committee also notes that in addition to these 22 farmers, 12% in Spain did not plant refuges but did not actually contravene the relevant recommendations as they had planted less than 5 ha with MON 810. However, farmers with two or three fields of under 5 ha were counted among those not complying with the recommendations in 2017. Were these farmers surveyed this year, and did they establish refuges? The fact that smaller fields are more frequent in European field patterns has led the HCB Scientific Committee to recommend refuge implementation on a local scale (see below).

These figures show by and large that farmers are properly aware of the need to manage the risk of resistance development in target pests. The findings for Spain, which represents 95.2% of the crop area, have levelled off (13.7%, 5.8%, 8.4%, 7.2% and 9.2% of the farmers surveyed stated that they had not complied with the refuge requirements in 2012, 2014, 2016, 2017 and 2018 respectively). However, the refuge compliance information supplied by farmers may show *strategic bias* in economic terms. The incentive for farmers to plant refuges consists solely in a recommendation by Bayer, supported by communication tools. In this respect the resistance management plan is wanting, since, while it is in farmers' collective interest to delay development of resistance, it is theoretically not in their individual interests to bear the costs associated with refuges. The resistance management plan is more prescriptive in the United States, where firms marketing genetically modified plants expressing a *Bt* toxin[29] are required by law to verify compliance with refuge rules and penalise any growers found failing to comply (EPA, 2010). One new feature in 2018: Bayer recommends that refuges be included as a requirement for payments under the Common Agricultural Policy (CAP) or other national rules and that non-compliant growers should be excluded or receive less aid from direct support schemes.

The findings of Camargo *et al.* (2018) and HCB's analysis of monitoring data for MON 810 maize cultivation in 2017 (HCB, 2019) concerning evolution in the frequency of Cry1Ab resistance alleles in *S. nonagrioides* populations in the Ebro valley underline the importance of complying with refuge requirements. In this connection, the HCB Scientific Committee here reiterates two recommendations for securing implementation:

1. The HCB Scientific Committee proposes that the European Commission make refuge implementation mandatory for farmers growing MON 810 or any other *Bt* crop through specific reference to it in the decision to authorise the crop. In this connection, refuge compliance mechanisms might be introduced for farmers, such as a contractual requirement combined with a verification/penalty system or as proposed by Bayer through the CAP;
2. The resistance management plan for target insects should be adapted to European conditions, where the agricultural landscape is more fragmented than in the United States. Thus the recommendation for a non-*Bt* refuge amounting to 20% of the area planted with *Bt*

[29] Pesticide derived from *Bacillus thuringiensis* bacteria.

maize when this area is over 5 ha should be considered in terms of the landscape rather than individual farms and be based on consultation between local farmers.

- **Monitoring of target pest susceptibility**

Purpose

The purpose of monitoring target pest susceptibility to the Cry1Ab toxin expressed by MON 810 is to allow prompt detection of any drop in the susceptibility of these populations. Such a drop, resulting from selection and reproduction of pests resistant to the Cry1Ab toxin, could lead to insufficient protection of MON 810 maize varieties and, more generally, the loss of a valuable strategy for controlling these pests. A drop in the susceptibility of target pest populations to the Cry1Ab toxin must be detected soon enough to take measures to slow or even halt resistance development in these populations.

Applicant's methodology

Since 2016 two major changes have taken place in the applicant's methodology:

(i) Further to the recommendations and opinions of EFSA's GMO Panel (EFSA, 2015, 2016a; EFSA *et al.*, 2017b), the insect resistance management plan has been revised: sampling is now annual and only in areas where the *Bt* maize adoption rate is higher than 60%. As a result, monitoring is now concentrated in north-eastern Iberia (Ebro valley).

(ii) Target pest susceptibility to the Cry1Ab toxin is now assessed not by calculating the concentration at which 50% or 90% of the individuals tested show moulting inhibition (MIC_{50} or MIC_{90}[30])[31] but by the diagnostic dose assay method. The diagnostic dose is supposed to cause moulting inhibition in at least 99% of first-stage larvae of a susceptible target pest population. According to EuropaBio, it offers greater sensitivity than the dose-response method for detecting changes in susceptibility to Cry proteins (Sims *et al.*, 1996). As advocated by EFSA's GMO Panel (EFSA, 2015, 2016a; EFSA *et al.*, 2017b), at least 1,000 target pest larvae should be sampled to be able to detect a resistance allele frequency of 3% and sufficiently early for implementation of appropriate management measures to delay resistance development. In addition, a 'negative' control has been employed to assess survival of *O. nubilalis* larvae beyond the first larval stage using a diagnostic dose assay on MON 810 maize leaf tissue. In the case of *S. nonagrioides*, 200 larvae from each cage, not used in the diagnostic dose bioassays, are exposed to fresh MON 810 leaves. The larvae that reach the second larval stage are maintained on *Bt* maize, while their siblings from the same cage are reared in order similarly to test the F2 offspring on *Bt* maize leaves.

[30] MIC: Moulting inhibition concentrations. MIC_{50} and MIC_{90} are the concentrations at which moulting is inhibited in 50% or 90% of the larvae tested, for example.

[31] Methodology explained in the HCB Scientific Committee's comments of 8 November 2013 on the report on MON 810 cultivation in 2012: susceptibility to the Cry1Ab toxin in MON 810 maize field populations of *O. nubilalis* and *S. nonagrioides* was previously assessed by laboratory determination of the toxin's moulting inhibition concentration (MIC) for the insects collected. Evolution in this susceptibility to the toxin was inferred from comparison of values obtained for insects sampled in one year with those of insects sampled in the same MON 810 crop regions in previous years (HCB, 2013). To facilitate comparison between annual susceptibility results for *O. nubilalis* populations and take account of variations due to experimental conditions and the use of different toxin batches, HCB suggested calculating resistance ratios between susceptibility values, tested with the same batch of Cry1Ab toxin, for the insects sampled and for the susceptible laboratory strain for which Monsanto had the data.

Ostrinia nubilalis

A diagnostic dose (MIC_{99}) was calculated from the average of all bioassays between 2005 and 2012 (total of 11,502 larvae) on populations sampled in Europe. This dose was determined to be 28.2 ng/cm^2. Of the 1,144 larvae collected in the Ebro valley in Spain in 2017, 534 specimens (46.7%) survived the diapause, reached the adult stage and mated. Of the 1,768 larvae tested in 2018 by exposure to the diagnostic dose, only 3 (0.15%) reached the second larval stage. These larvae died within five days after feeding on *Bt* maize. The report concluded that no evidence of decreased *O. nubilalis* susceptibility to Cry1Ab could be detected.

While the diagnostic dose method is undoubtedly simpler to use than calculation of MIC_{50}, which requires testing of 6 to 8 doses, the method in itself and its application by Bayer has definite limitations:

- The diagnostic dose was calculated using data from bioassays performed in the period from 2005 to 2012 with different batches of Cry1Ab toxin whose effectiveness (calculated using the MIC_{50} for the laboratory strain, Table 1) was two to four times greater than that of the batch used in 2017 and 2018. The calculation of the diagnostic dose ought to take account of this difference in effectiveness between toxin batches. Figure 6 (*Appendix 8*) clearly shows that, for the toxin batch used to test larvae collected in 2018, the dose causing moulting inhibition in 99% of larvae seemed well below the diagnostic dose of 28.22 ng/cm² used (from the graph, this does is estimated to be approximately 12 ng/cm^2 for the RefG reference strain).[32] The diagnostic dose used is therefore clearly overestimated;
- The diagnostic dose is derived from field data recorded for populations some of which had already been exposed to *Bt* maize and therefore subject to selection pressure;
- The diagnostic dose in itself cannot be used to detect a small change in resistance allele frequency, particularly when this resistance is recessive. To improve the sensitivity and accuracy of the current monitoring strategy, F2 screening (Andow and Alstad, 1998) should be carried out to estimate initial resistance allele frequency in a given population (see study by Camargo *et al.* (2018) on *S. nonagrioides*).

The HCB recommendations further to its assessment of the 2012 monitoring report on MON 810 cultivation – concerning (i) use of resistance ratios, showing a possible evolution in resistance in populations in south-western Iberia in 2012, and (ii) the importance of resampling *O. nubilalis* populations in this area in 2013 to determine whether there was any increase in their level of resistance to the Cry1Ab toxin – have not been taken into account. Instead, monitoring of population susceptibility has been confined to north-eastern Iberia (in line with EFSA's recommendations to focus sampling on regions with an adoption rate over 60%) and to the diagnostic dose method (MIC_{99}), whose method of calculation is open to criticism.

The HCB Scientific Committee is satisfied that its recommendations made subsequent to expert appraisal of the 2017 monitoring report for MON 810 cultivation concerning the importance of (i) not grouping together larvae from different areas, (ii) providing raw data from the various bioassays, have been followed. On the other hand, it reiterates its criticism of the diagnostic dose method for monitoring evolution of pest susceptibility and again recommends F2 screening.

[32] The study shown in this Figure 6 (Appendix 8, 2017 monitoring report), comparing the responses of two reference lines to the same batch of toxin, led to very different results in the 2017 report (Figure 6, Appendix 8) for each of the strains and the relationship between them. It is therefore all the more legitimate to question the relevance of this method for estimating any increase in *O. nubilalis* susceptibility to the Cry1Ab toxin.

Table 1. Resistance ratios (RR) and dose mortality response (RDC) of *O. nubilalis* populations sampled in 2017 in comparison with previous samples from the same region.

Tested populations	Test year	Toxin batch	RDC [a]	MIC_{50} [b]	MIC_{90} [b]	RR MIC_{50} [c]	RR MIC_{90} [c]
South-western Iberia							
2008 (ES 01, ES 02, ES 03)	2009	1		3.39	6.90	0.93	0.72
2010 (ES 02, ES 10)	2011	1		5.76	11.85	0.95	0.68
2012 (ES 01, ES 03)	2013	2		4.08	8.69	11.03	7.69
2014 (ES01, ES02, P01)	2015	2a		1.32	3.80	4.71	8.26
Central Iberia							
2015 (ES07, ES15, ES08)	2016	2a		1.88	3.38	1.03	1.15
North-eastern Iberia							
2015 (ES13, ES05, ES14)	2016	2a		2.12	5.43	1.16	1.84
2016 (ES13, ES11, ES14)	2017	2b	99.23				
2017 (ES13, ES05, ES14)	2018	2b	99.19				
2018 (Lanaja 1)	2019	2b	100				
2018 (Lanaja 3)	2019	2b	100				
2018 (Cantalobos)	2019	2b	99.43				
2018 (San Juan de Fulmen)	2019	2b	100				
2018 (Penalba)	2019	2b	100				
2018 (Candasnos 1)	2019	2b	99.31				
2018 (Candasnos 3)	2019	2b	100				
2018 (Aibar 1+2)	2019	2b	100				
2018 (Sanguesa 1)	2019	2b	100				
2018 (Sanguesa 2)	2019	2b	100				
RefG reference susceptible strain							
(Laboratory-bred)	2009	1		3.65	9.56		
	2011	1		6.08	17.43		
	2013	2		0.37	1.13		
	2015	2a		0.28	0.46		
	2017	2b		13.63	17.67		
	2018	2b		3.93	7.23		

[a] RDC (response to discriminating concentration) is the percentage of larvae dying or failing to reach the second larval stage with the diagnostic dose; [b] The MIC_{50} and MIC_{90} data (expressed in ng Cry1Ab/cm^2) are taken from the 2008 to 2018 Monsanto and then Bayer monitoring reports; [c] The ratio between annual MIC values for samples collected in MON 810 maize fields and for reference strain samples has been calculated by the HCB Scientific Committee.

Sesamia nonagrioides

Since 2016, a diagnostic dose of 1,091 ng Cry1Ab/cm^2, calculated on the basis of data from *S. nonagrioides* populations in north-eastern Spain over the 2009, 2011, 2013 and 2015 seasons, has been used to assess susceptibility to the Cry1Ab protein. Of the 1,490 larvae collected, 637 adults (43%) emerged, and the offspring of 95% of these adults (554) were used in bioassays. Of the 3,449 larvae exposed to the diagnostic dose in 2018, 1.35% reached the second larval stage. However, the same diagnostic dose applied to the laboratory strain did not cause moulting inhibition in 2.25% of the individuals tested. In the bioassays on *Bt* maize leaf tissue, all the larvae (10,294) died after being forced to feed continuously on *Bt* maize leaves (99.9% died before reaching the second larval stage and 0.1% before reaching the third larval stage). To confirm that larvae having reached the second stage were not resistant to MON 810, 128 F2 larvae siblings from the same oviposition cage were fed with MON 810 leaves and all died before reaching the second larval stage. Bayer concluded that there was no sign of a decrease in *S. nonagrioides* susceptibility to Cry1Ab.

In 2018, as in 2017, moulting inhibition in less than 98% of first-stage larvae of the "susceptible" laboratory strain was recorded. In the light of these findings, doubts may be entertained as to the robustness of the diagnostic dose, which ought to cause moulting inhibition in at least 99% of first-stage larvae of the susceptible laboratory strain. There are two possible explanations for the low susceptibility of the laboratory strain: (i) lower toxicity of Batch B2-6 of the Cry1Ab toxin used in 2018 by comparison with the batches used from 2009 to 2015, the most likely explanation given the laboratory strain's susceptibility to the different toxin batches, as shown in Table 2, or (ii) (annual) introduction of non-susceptible wild individuals into the susceptible laboratory strain. This shows the importance of maintaining a susceptible laboratory strain against which field populations can be compared and of taking into account variations in the toxicity of different toxin batches for calculation of the diagnostic dose if findings are to be properly interpreted.

Moreover, the statistical methodology used to analyse these results – summarised in Table 9 (*Appendix* 7, p. 24) – is debatable and calls into question the conclusion that no reduction in *S. nonagrioides* susceptibility to the Cry1Ab toxin has been detected. The test used concerns the mean for three percentages obtained in three different geographical areas. The test statistics thus have a *t*-distribution with two degrees of freedom, meaning that the test lacks statistical power. Rather than calculating the mean for three percentages and artificially introducing a considerable range of variation, it would be more appropriate to consider each of these percentages as being calculated on the basis of a large number of individuals (over 1000 in this case) and to test whether they are equal to the expected 99% using a standard proportion test. Such a statistical analysis has shown that the differences for 2017 were clearly significant, revealing a reduction in *S. nonagrioides* susceptibility to Cry1Ab, contrary to the conclusions set out at the time (HCB, 2019).[33]

[33] p=0,00026 for the expected 99% (difference of 3.5 standard deviations); p=0,0056 for the comparison with laboratory data (difference of 2.5 standard deviations).

Table 2. Resistance ratios (RR) and diagnostic dose mortality (RDC) of *S. nonagrioides* populations sampled in 2017 in comparison with previous samples from the same region.

Samples tested	Test year	Toxin batch	RDC [a]	MIC_{50} [b]	MIC_{90} [b]	RR MIC_{50} [c]	RR MIC_{90} [c]
South-western Iberia							
Collected in 2005	2005	B1		16	30		
Collected in 2007	2007	B1		17	226	1.06	2.40
Collected in 2010	2010	B1		16	86	2.00	1.16
Collected in 2012	2012	B2-1		29	158	4.14	2.55
Collected in 2014	2014	B2-2		31	236	1.82	2.59
Central Iberia							
Collected in 2004	2004	B1		12	248	0.67	2.51
Collected in 2006	2006	B1		7	321		
Collected in 2008	2008	B1		28	170		
Collected in 2010	2010	B1		10	119	1.25	1.61
Collected in 2012	2012	B2-1		15	160	2.14	2.58
Collected in 2014	2014	B2-2		15	138	0.88	1.52
North-eastern Iberia							
Collected in 2005	2005	B1		9	76		
Collected in 2007	2007	B1		14	99	0.88	1.05
Collected in 2009	2009	B1		22	188	1.16	1.57
Collected in 2011	2011	B2-1		20	135	2.22	1.99
Collected in 2013	2013	B2-2		19	163	2.71	3.40
Collected in 2015	2015	B2-2		17	84	0.61	1.25
Collected in 2016 Zone 1	2017	B2-3	98.86				
Collected in 2016 Zone 2	2017	B2-3	98.47				
Collected in 2016 Zone 3	2017	B2-3	96.56				
Collected in 2017 Zone 1	2018	B2-4	91.75				
Collected in 2017 Zone 2	2018	B2-4	96.50				
Collected in 2017 Zone 3	2018	B2-4	94.28				
Collected in 2018 Zone 1	2019	B2-6	97.85				
Collected in 2018 Zone 2	2019	B2-6	99.06				
Collected in 2018 Zone 3	2019	B2-6	99.05				
Reference susceptible strain							
(Laboratory-bred)	2004	B1		18	99		
	2007	B1		16	94		
	2008-9	B1		19	120		
	2010	B1		8	74		
	2011	B2-1		9	68		
	2012	B2-1		7	62		
	2013	B2-1		7	48		
	2014	B2-2		17	91		
	2015	B2-2		28	67		
	2016	B2-3		30	83		
	2017	B2-4	97.69	24	162		
	2018	B2-6	97.75	19	116		

[a] RDC (response to diagnostic concentration) is the percentage of larvae dying or failing to reach the second larval stage with the diagnostic dose; [b] The MIC_{50} and MIC_{90} data (expressed in ng Cry1Ab/cm^2) are taken from the 2005 to 2019 Monsanto and the Bayer monitoring reports; [c] The ratio between annual MIC values for samples collected in MON 810 maize fields and for reference strain samples has been calculated by the HCB Scientific Committee.

Conclusion

The data supplied in the monitoring report do not highlight any significant loss of susceptibility to the Cry1Ab toxin by the *O. nubilalis* and *S. nonagrioides* populations sampled in 2018. These findings are consonant with recent papers showing no resistance development in the two target pests, *O. nubilalis* and *S. nonagrioides*, after more than ten years of MON 810 cultivation in the EU (Castanera *et al.*, 2016; Farinos *et al.*, 2018; Thieme *et al.*, 2018).

However, the HCB Scientific Committee has identified a number of methodological limitations that preclude relying on Bayer's assessment results to draw conclusions regarding resistance evolution in target pests.

HCB believes that the diagnostic dose methods has intrinsic limitations for early detection of resistance evolution and recommends an alternative method such as F2 screening to determine resistance allele frequency in a target pest population.

In addition to the intrinsic limitations of the diagnostic dose method, the HCB Scientific Committee is critical of the way in which it has been applied by Bayer, since the diagnostic doses used were not determined appropriately. The data on the reference strain clearly show an overestimation of the diagnostic dose used for *S. nonagrioides*. Lastly, the statistical analysis used to detect any loss of susceptibility in these pests is not appropriate – reanalysis of the 2017 data with a more suitable methodology has shown a significant loss of susceptibility in the *S. nonagrioides* sampled in north-eastern Iberia (HCB, 2019), consistent with the study by Camargo *et al.* (2018).

1.2 General surveillance

Intended to identify any adverse effects of MON 810 maize on health or the environment that had not been anticipated in the environmental risk assessment provided for the application for placing on the market for the purposes of cultivation, general surveillance was carried out by Bayer through three complementary activities in 2018: (1) surveys of MON 810 maize growers, (2) review of scientific literature published during the corresponding cultivation period, and (3) company stewardship measures for MON 810 maize alerts. As in 2017, use of existing environmental networks, contemplated in previous reports, was not pursued owing to the limitations noted by EuropaBio and EFSA connected with processing of the data.

- **<u>Analysis of farmers' responses to the surveillance questionnaire</u>**

A surveillance questionnaire has been designed to help collect and evaluate farmers' observations of any unexpected effects of MON 810 in the regions where it is grown. Originally developed by the German Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA, now JKI), maize breeders and statisticians (Wilhelm *et al.*, 2004), the questionnaire has been regularly revised and developed, particularly to improve statistical analysis.

The questionnaire covers four types of data:

- Baseline data on maize growing (area, local pests and diseases regardless of varieties grown (GM or not), etc.);
- Standard agronomic practices for maize-growing (to establish a baseline);
- Observations concerning MON 810;

- Implementation of specific measures to prevent development of resistance to the *Bt* toxin in MON 810 target insects (these data are intended in particular to ensure compliance with refuge requirements, which is a goal addressed under case-specific monitoring (see 2.1)).

Since the purpose of the questionnaire is principally to identify any unexpected effects of MON 810 maize, the questions are worded so that any deviation in relation to conventional maize can be detected. To this end, farmers are given three possible types of answer to each question: 'as usual', 'plus' (e.g. later, higher, more) and 'minus' (e.g. earlier, lower, less). Bayer Agriculture BVBA defines the baseline as 90% for 'as usual' replies and 10% for the other replies, where 'plus' and 'minus' answers are balanced and both about 5%. On this basis, it explains that a relatively high frequency (defined as over 10%) of 'plus' or 'minus' answers would indicate possible effects associated with MON 810 cultivation. In other words, if under 10% of farmers declared a given effect, the company would conclude that there was no effect, and if over 10% of farmers declared this effect, the company would conclude that there might be an effect. To decide whether this 10% threshold has been crossed, a confidence interval for the probability of 'plus' (or 'minus') answers is calculated on the basis of data gathered from a sample of farmers. The lower limit of this confidence interval is 0. If the upper limit is under 10%, it is accepted that there is no effect; if the upper limit is over 10%, it is accepted that there may be an effect.

While the proposed methodology is being used correctly in statistical terms, the HCB Scientific Committee questions its relevance for the purpose of general surveillance, since, for each aspect examined, the effects observed in connection with MON 810 maize cultivation are considered by Bayer Agriculture BVBA only if reported by over 10% of the farmers surveyed. The hypothesis being tested is therefore the number of growers observing an effect. Neither the presence of an effect nor the size of this effect is being tested. In other words, if under 10% of farmers report a specific adverse effect, this effect will not be taken into account in the questionnaire results, whatever its extent.

Taking this rule, no statistically significant adverse effects were detected in 2018. The significant effects included higher yield and better lodging resistance.

However, as in previous years, the HCB Scientific Committee is critical of the arbitrary nature of the decision rules used and of the debatable wording of the conclusions. If we take the example of pest susceptibility (Appendix 1, pp 61-65), the test used cannot lead to the conclusion that the "as usual" percentage is under 90%. Bayer thus concludes, "No effect on susceptibility to other pests is indicated." Yet it is not because at least 90% of farmers consider that there are no effects that it can be concluded that no effects exist (the 5% of farmers who "saw" an effect cannot be overlooked on the basis of this test).[34]

Lastly, with regard to the farmers participating in the survey – 250 in all, of whom 238 were in Spain and 12 in Portugal – it is indicated on pp. 14-16 of *Appendix 1* that the number of farmers surveyed in Spain and by region was determined on the basis of statistical needs and in proportion to crop area, whereas on p. 23 we are given to understand that this figure is the result of a variety of circumstances (errors, refusals, absences, etc.) starting from an original sample of 491 farmers contacted (479 in Spain and 12 in Portugal). How was it possible to anticipate that the farmers who would agree to be surveyed were going to meet these distribution requirements? Is it not simply the case that the farmers were contacted in sufficient numbers, with adjustments as the need arose, so that the proportions required were ultimately respected?

[34] It should also be noted that the 2017 questionnaire led to the opposite conclusion (2017 report, Appendix 1, pp 67-68). On the basis of the farmers' replies, the test used led to the conclusion that the "as usual" percentage was under 90%. The company therefore concluded as follows: "Taken together, 2017 data indicate that in comparison to conventional maize, MON 810 plants were less susceptible to pests other than corn borers, especially lepidopteran pests." This rule is entirely arbitrary and is the result of setting a 10% limit and a 99% confidence interval. Without any information on the scale of the effects observed by the 8% of farmers who detected them, the fact that over 90% considered the impact to be "as usual" should not permit such a conclusion.

It might also be asked whether the grounds for refusal or acceptance have introduced bias into the survey. To solve this problem, the HCB Scientific Committee proposes basing general surveillance also 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.

Since the start of general surveillance, over 3000 questionnaires and/or interviews have been distributed and/or conducted. For Bayer, analysis of the replies to these questionnaires did not show any unexpected adverse effects from cultivation of MON 810 maize. However, there is no statistical analysis of these questionnaires as a whole, which would provide more appropriate statistical power for analysing the occurrence of any unexpected effects associated with cultivation of MON 810 maize.

In conclusion, while the surveillance questionnaire and its analysis have not revealed any unexpected effects associated with a risk from MON 810 maize, they do pose a problem in terms of methodological relevance with regard to the matters studied, with arbitrary decision rules, wrongly drawn conclusions and a possible bias associated with the survey format of a sample group of farmers who agreed to reply to the Bayer questionnaire.

- **<u>Literature review</u>**

A review of scientific literature was carried out for the period between June 2018 and May 2019.

Bayer states that it has followed the literature search methodology recommended by EFSA (EFSA, 2010; EFSA *et al.*, 2017a). The literature review is intended to answer the question: 'Does MON 810 maize derived food/feed products and the introduced insect protection trait have adverse effects on human and animal health and the environment?'

While the HCB Scientific Committee agrees with Bayer that none of the 21 papers studied invalidates the initial conclusions of the MON 810 risk assessment, it stresses that lack of evidence of adverse effects cannot be taken to indicate the absence of such effects, and it makes the following comments about the methodology for selecting the papers considered.

While the criteria for inclusion of papers have been properly established, the criteria for exclusion after assessment are not listed as such. The list of papers excluded after assessment is accompanied by the reasons for exclusion. Some papers have been excluded because they did not address the MON 810 event. Papers selected on the basis of a question concerning the introduced insect protection trait (i.e. expression of Cry1Ab) and papers containing the Cry1Ab keyword without necessarily concerning the MON 810 event ought not to be excluded.

1.3 Additional point relating to presence of teosinte in Spain

Maize has no native wild relatives in Europe. On the other hand, a number of recent scientific papers have described the presence of teosinte populations in maize fields in Spain (Devos *et al.*, 2018; EFSA, 2016b; Trtikova *et al.*, 2017). Teosinte is a wild subspecies of the genus *Zea* and is native to Mexico and Central America. There are two annual subspecies of teosinte: *Zea mays* ssp. *parviglumis*, which is the ancestor of domestic maize, and *Zea mays* ssp. *mexicana* (Hufford *et al.*, 2012; Sanchez Gonzalez *et al.*, 2018). However, as in 2017, no reference is made to the presence of teosinte in the 2018 monitoring report.

General surveillance:

For the purposes of general surveillance, in 2018 a farmer questionnaire was sent, as in 2017, to 250 farmers: 12 in Portugal and 238 in Spain. Only 7 out of the 250 assessed weed pressure as high in their fields. All the farmers surveyed thought that weed pressure was the same in the

fields where they grew MON 810 as in the fields where they grew conventional maize. Twenty-eight species of weeds were cited by the farmers in 2018. Teosinte did not appear in the list, unlike in 2017, when it was mentioned twice.

Literature review:

The review of scientific literature carried out for the period from June 2018 to May 2019 provided the following reference (Appendix 5 of the report):

> Devos *et al*. (2018) Teosinte and maize x teosinte hybrid plants in Europe -Environmental risk assessment and management implications for genetically modified maize. Agriculture Ecosystems & Environment, 19-27.

This reference was not included, since it was thought that it was not a risk study specifically concerning MON 810 maize. Yet in the abstract of the paper, it is expressly stated that the authors' purpose is to assess the environmental risks of a variety of events including MON 810:

> '*Concern has been expressed that GM maize may hybridise with teosinte or maize×teosinte hybrids, leading to the development of invasive weeds that pose unconsidered risks to the environment. In order to assess these risks, we hypothesised plausible pathways to harm from the cultivation and import of GM maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21 for situations where GM maize plants and teosinte/maize×teosinte hybrids are Sympatric.'*

In addition, in the introduction the authors write:

> '*We focus on maize MON810, Bt11, 1507 and GA21, because these events are currently in the authorisation pipeline for cultivation in Europe (in the case of maize MON810, the market application covers the renewal of authorisation).'*

Quite obviously this paper should thus have been included in the literature review.

Presence of teosinte in Spain: background and geographical distribution

The presence of teosinte in Spain was officially established in 2014 by the Centro de Sanidad y Certificacion Vegetal – Gobierno de Aragon (CSCV, 2014), but the first reports seem to date back to 2009. Annual monitoring campaigns have been carried out subsequently. In 2014 the principal source of infestation was the municipality of Candasnos, in the south of the province of Huesca in Aragon, with 200-300 ha affected. Other sources have been detected in the same region in the north of the province of Zaragoza, with a total of 46 fields covering approximately 400 ha. In the neighbouring region of Catalonia (province of Lleida), infestation has been detected in 3 fields. In 2015 some fifty fields were affected in Aragon, and 20 new fields (62 ha) were identified as infested in Catalonia. The total area affected in 2015 was estimated to be 685 ha (Cirujeda *et al.*, 2017; Pardo *et al.*, 2016). In 2016, infestation in 14 new fields was found, bringing the total area to 797 ha (Cirujeda *et al.*, 2017).

Since 2015, control measures have been taken in Aragon, making it mandatory to halt cultivation of maize or sorghum for three years on the most heavily infested fields. These measures have considerably reduced the density of teosinte within the fields, but some plants have still been observed on the edges (Cirujeda *et al.*, 2017).

Overlap of areas of teosinte and areas of MON 810 maize cultivation

Estimates of MON 810 crop areas by region, province and year are available on the website of the Spanish Ministry for the Ecological Transition (Ministerio para la Transición Ecológica).[35]

[35] https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-/consejo-interministerial-de-ogms/superficie.aspx

The area cultivated has remained much the same since 2014, with the two main regions being Aragon and Catalonia. Of the provinces, the three most important for MON 810 cultivation are, in descending order, Huesca (33,000 ha on average over 2014-2018), Lleida (29,900 ha on average over 2014-2018) and Zaragoza (13,800 ha on average over 2014-2018). According to EFSA ((EFSA *et al.*, 2018), Appendix B), the adoption rate for MON 810 varieties between 2012 and 2016 was roughly 60% in the three regions of Aragon, Catalonia and Navarre. There is consequently a clear overlap between the main areas of cultivation of MON 810 maize and the areas where teosinte populations are present; the likelihood of co-occurrence of the two species at distances allowing pollen exchange seems high.

Possibility of hybridisation between maize and teosinte

DNA analysis suggests that Spanish teosinte plants are genetically closer, although not identical, to the *Zea mays* ssp. *mexicana* subspecies (Trtikova *et al.*, 2017). In *Z. mays* ssp. *mexicana* there is a genetic incompatibility system that makes its pollination by maize pollen more difficult than in the other direction. Trtikova *et al.* (2017) were able to produce F1 hybrids easily by crossing Spanish teosinte plants acting as pollen donors with Spanish commercial varieties of MON 810 maize as female recipients. Initial experiments with crossing in the other direction (hand pollination of teosinte with maize pollen) resulted only rarely in viable seeds according to these authors, who do not, however, rule out formation of such hybrids in the field, even at low frequencies. If the first rare hybrids formed in this way are more compatible with maize, the existence of maize gene introgression in teosinte cannot be ruled out.

Thus in the light of the existing literature on (i) the presence of adventive populations of teosinte in the area of MON 810 maize cultivation in Spain and (ii) the possibility of genetic exchange between these populations of teosinte and cultivated maize, HCB recommends that the monitoring report consider the presence of teosinte in MON 810 maize cultivation areas in Spain and the potential risks of MON 810 maize gene introgression in teosinte.

2. Conclusions

The overall conclusion is that the assessment in the Bayer Agriculture BVBA monitoring report does not reveal any major problems associated with cultivation of MON 810 maize in 2018.

However, the HCB Scientific Committee has still identified some methodological weaknesses and limitations concerning monitoring of target pest susceptibility to the Cry1Ab toxin that call into question the report's conclusion. HCB believes, in particular, that use of the diagnostic dose method has certain limitations for early detection of resistance evolution, both intrinsically and as applied by Bayer, and recommends an alternative method such as F2 screening, which would make it possible to determine the frequency of resistance alleles in a target pest population. Moreover, HCB has made recommendations aimed at improving implementation of refuges to delay or prevent development of resistance to the Cry1Ab toxin in target pests.

Regarding general surveillance, the HCB Scientific Committee notes a problem of methodological relevance in terms of the matters studied, with arbitrary decision rules, wrongly drawn conclusions and possible bias associated with the survey format of a sample group of farmers who have agreed to reply to the questionnaire.

Lastly, the HCB Scientific Committee recommends that the monitoring report take into consideration the presence of teosinte in MON 810 maize cultivation areas in Spain and the potential risks of MON 810 maize gene introgression in teosinte.

3. References

Andow, D., and Alstad, D. (1998). F2 screen for rare resistance alleles. Journal of Economic Entomology *91*, 572-578.

Castanera, P., Farinos, G.P., Ortego, F., and Andow, D.A. (2016). Sixteen years of Bt maize in the EU hotspot: Why has resistance not evolved? Plos One *11*, e0154200.

Cirujeda, A., Pardo, G., Mari, A.I., Fuertes, S., and Aibar, J. (2017). Emergencia de teosinte en cultivos diferentes a maiz. Paper presented at: XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología (Pamplona-Iruña).

CSCV (2014). Informaciones technicas - El teosinte (*Zea mays*, spp.). wwwaragones.

Devos, Y., Ortiz-Garcia, S., Hokanson, K.E., and Raybould, A. (2018). Teosinte and maize x teosinte hybrid plants in Europe — Environmental risk assessment and management implications for genetically modified maize. Agric Ecosyst Environ *259*, 19-27.

EFSA (2010). Application of systematic review methodology to food and feed safety assessments to support decision making. EFSA Journal *8(6):1637*, 90 pp.

EFSA (2015). Clarifications on EFSA GMO Panel recommendations on the Insect Resistance Management plan for genetically modified maize MON 810. EFSA supporting publication *2015:EN-842*, 14 pp.

EFSA (2016a). EFSA GMO Panel. Scientific opinion on the annual post-market environmental monitoring (PMEM) report on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in 2014 from Monsanto Europe S.A. EFSA Journal *14*, 4446.

EFSA (2016b). Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. EFSA supporting publication *2016:EN-1094*.

EFSA, Alvarez, F., Devos, Y., Georgiadis, M., Messéan, A., and Waigmann, E. (2018). Statement on annual post-market environmental monitoring report on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in 2016. EFSA Journal *16*, 5287.

EFSA, Devos, Y., Guajardo, I.M., Glanville, J., and Waigmann, E. (2017a). Explanatory note on literature searching conducted in the context of GMO applications for (renewed) market authorisation and annual post-market environmental monitoring reports on GMOs authorised in the EU market. EFSA supporting publications, 48 pp.

EFSA, Naegeli, H., Birch, A.N., Casacuberta, J., De Schrijver, A., Gralak, M.A., Guerche, P., Jones, H., Manachini, B., Messe an, A*., et al.* (2017b). Scientific Opinion on the annual post-market environmental monitoring (PMEM) report on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in 2015 from Monsanto Europe S.A. . EFSA Journal *15*, 4805.

EPA, U.S. (2010). Terms and Conditions for Bt Corn Registrations. Office of Pesticide Programs (U.S. Environmental Protection Agency).

Farinos, G.P., Hernandez-Crespo, P., Ortego, F., and Castanera, P. (2018). Monitoring of *Sesamia nonagrioides* resistance to MON 810 maize in the European Union: lessons from a long-term harmonized plan. Pest Manage Sci *74*, 557-568.

HCB (2013). Avis du Comité scientifique du Haut Conseil des biotechnologies sur le rapport de surveillance de culture du MON 810 en 2012 sous forme de commentaires à destination de la Commission européenne (Réf. HCB-2013.11.08). Disponible sur http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr. (Paris), pp. 21.

Hufford, M.B., Bilinski, P., Pyhaejaervi, T., and Ross-Ibarra, J. (2012). Teosinte as a model system for population and ecological genomics. Trends in Genetics *28*, 606-615.

Pardo, G., Cirujeda, A., Mari, A.I., Fuertes, S., and Taberner, A. (2016). El teosinte: descripción, situación actual en el valle del Ebro y resultados de los primeros ensayos. Vida Rural, 42-48.

Sanchez Gonzalez, J.d.J., Ruiz Corral, J.A., Medina Garcia, G., Ramirez Ojeda, G., De la Cruz Larios, L., Holland, J.B., Miranda Medrano, R., and Garcia Romero, G.E. (2018). Ecogeography of teosinte. Plos One *13*.

Sims, S.B., Greenplate, J.T., Stone, T.B., Caprio, M.A., and Gould, F.L. (1996). Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance, T.M. Brown, ed., pp. 229-242.

Thieme, T.G.M., Buuk, C., Gloyna, K., Ortego, F., and Farinos, G.P. (2018). Ten years of MON 810 resistance monitoring of field populations of *Ostrinia nubilalis* in Europe. J Appl Entomol *142*, 192-200.

Trtikova, M., Lohn, A., Binimelis, R., Chapela, I., Oehen, B., Zemp, N., Widmer, A., and Hilbeck, A. (2017). Teosinte in Europe — Searching for the origin of a novel weed. Scientific Reports *7*.

Wilhelm, R., Belssner, L., Schmidt, K., Schmidtke, J., and Schiemann, J. (2004). Monitoring des Anbaus gentechnisch veränderter Pflanzen - Fragebögen zur Datenerhebung bei Landwirten. Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutzd *56*, 184-188.