

Commentaires sur le rapport de surveillance de culture du MON 810 en 2017. Paris, le 23 décembre 2019

. 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 2017. Paris, le 23 décembre 2019. [0] Haut Conseil des Biotechnologies. 2019, 41 p. hal-02917782

HAL Id: hal-02917782
https://hal.inrae.fr/hal-02917782

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

Haut Conseil des Biotechnologies

COMITÉ SCIENTIFIQUE

COMMENTAIRES

sur le rapport de surveillance de culture du MON 810 en 2017

Paris, le 23 décembre 2019

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été sollicité le 24 octobre 2018 par les Autorités compétentes françaises (le ministère de la Transition écologique et solidaire) pour examiner le rapport de surveillance de la société Monsanto[1] relatif à la culture du MON 810 en 2017.

Ce rapport a été réalisé par la société Monsanto 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 le 19 décembre 2018, et à une adoption de ces commentaires par voie électronique le 23 décembre 2019 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès.

[1] La société Monsanto est membre du groupe Bayer depuis le 21 août 2018. Les travaux de surveillance décrits dans le rapport ayant été menés avant cette date, le nom de Monsanto a été conservé dans ce rapport. Le rapport de surveillance est toutefois propriété de Bayer Agriculture BVBA.

[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 Monsanto ne font apparaître aucun problème majeur associé à la culture de maïs MON 810 en 2017.

Cependant, le Comité scientifique (CS) du Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a identifié une erreur significative d'analyse statistique remettant en question l'analyse du suivi de la sensibilité des sésamies à la toxine Cry1Ab, et suggérant un possible développement de résistance dans les populations du nord-est de la péninsule Ibérique.

Par ailleurs, le CS du HCB identifie encore certaines faiblesses et limites méthodologiques concernant la surveillance de la résistance et la mise en œuvre des zones refuges. Le HCB estime notamment que l'utilisation d'une dose diagnostic présente certaines limites 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. Enfin, le HCB demande à obtenir les données brutes des différents essais biologiques pour évaluer la qualité des données et de leur analyse.

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 d'une sélection d'agriculteurs.

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 12

2.3 POINT SUPPLEMENTAIRE RELATIF A LA PRESENCE DE TEOSINTES EN ESPAGNE 15

3. CONCLUSIONS 16

4. BIBLIOGRAPHIE 17

ANNEXE 1 – ELABORATION DES COMMENTAIRES 19

ANNEXE 2 – TRADUCTION EN ANGLAIS 20

ANNEXE 3 – ANALYSE STATISTIQUE DE L'EVOLUTION DE LA SENSIBILITE CHEZ LES SESAMIES ... 33

MON810 MONITORING PROGRAM SUGGESTS A DEVELOPMENT OF INSECT RESISTANCE 33

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 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 2017 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 24 octobre 2018 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 2017 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 2017, la culture du maïs MON 810 dans l'Union européenne a couvert environ 131 553 ha répartis dans deux pays – l'Espagne (124 227 ha, 94,4 %) et le Portugal (7 308 ha, 5,6 %).

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

[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).

- 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 Monsanto.

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[14] en 2003, mis à jour en 2012 puis en septembre 2017 et annexé au rapport de surveillance de Monsanto (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 2017.

- **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 2017, 250 agriculteurs – 236 en Espagne et 14 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, 7,2 % des agriculteurs espagnols (17 sur 236) ont indiqué y avoir dérogé, invoquant l'une des raisons suivantes :

(i) une information insuffisante sur les directives techniques et les risque de pertes de rendement (8/17 ; 47,1 %) ;

(ii) la possession de deux ou trois parcelles de moins de 5 ha (5/17 ; 29,4 %) ;

(iii) un refuge inférieur à 20 % de la superficie de la culture de MON 810 (4/17 ; 23,5 %).

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

Ces chiffres témoignent 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 94,4 % des surfaces cultivées, se sont stabilisés (13,7 %, 5.8 % et 8,4 % des agriculteurs interrogés indiquaient ne pas respecter les exigences en matière de refuge en 2012, 2014 et 2016, 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 Monsanto, 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[15] sont légalement tenues de vérifier le respect des zones refuges et sanctionner les agriculteurs identifiés comme ne les respectant pas (EPA, 2010).

Les résultats de Camargo *et al.* sur l'évolution de la fréquence des allèles de résistance à Cry1Ab dans les populations de sésamies de la vallée de l'Èbre (Camargo *et al.*, 2018) 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 ;
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.

- **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 :

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

(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})[16] ou 90 % (MIC_{90}) des individus testés montrent une inhibition de la mue[17], 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.

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 1 111 larves collectées dans la vallée de l'Èbre en Espagne, 628 spécimens ont survécu à la période de diapause, ont atteint le stade adulte et se sont accouplés. Des 1 488 larves testées en 2017 et exposées à la dose diagnostic, seulement 12 (0,8 %) 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 2017, 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, elle présente certaines limites. D'abord, elle a été établie à partir de données de bioessais réalisés sur la période 2005-2012, avec un lot différent 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. Le calcul de la dose diagnostic devrait prendre en compte cette différence d'efficacité entre lots de toxine. Ensuite, la dose diagnostic provient de données incluant des populations déjà exposées au maïs

[16] 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.

[17] 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.

Bt et donc soumises à une pression de sélection. Enfin, la dose diagnostic 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.* sur les sésamies (Camargo *et al.*, 2018)).

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				
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		

[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 de 2009 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.

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 sésamie 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 1 452 larves collectées, 788 adultes (54 %) ont émergé et la progéniture de 95 % de ces adultes (749) a été utilisée dans les essais biologiques. Des 3 333 larves exposées à la dose diagnostic en 2017, 5,9 % 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 2,3 % des individus testés. Dans les bioessais sur feuille de maïs Bt, toutes les larves (10 650) 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, 1 000 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 firme Monsanto conclut qu'aucun signe de diminution de la sensibilité de *S. nonagroides* à Cry1Ab n'a été détecté. La diminution de la sensibilité observée dans le rapport de surveillance 2012 (*Appendix 7*, p. 11), n'est pas confirmée entre 2014 et 2015.

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 5 de toxine Cry1Ab utilisé en 2017 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.

Une observation plus problématique remet en question l'interprétation par la société Monsanto de ses propres résultats d'analyse. En effet, le rapport souligne p. 22 qu'il n'y a pas de différence significative entre les proportions de larves F1 de la population du nord-est de l'Espagne et celles de larves de la souche sensible de laboratoire pour lesquelles la dose diagnostic a provoqué une inhibition de la mue. Or, l'analyse statistique conduisant à ce résultat est incorrecte. En effet, le test portant sur la moyenne de 3 proportions (Appendix 7, p. 23, Table 9) est très discutable : il est en effet très peu puissant, étant basé sur une distribution t avec 2 degrés de libertés. Il serait plus pertinent de tester si chacune de ces proportions est bien égale au 99 % attendu au moyen d'un test classique de proportion. Les différences pour 2017 sont alors très clairement significatives, suggérant une augmentation significative de la résistance de la population de sésamies dans cette région (Voir l'analyse statistique en Annexe 3)[18].

[18] L'analyse de l'expert en statistiques du CS du HCB est détaillée sur le site Internet http://sia.webpopix.org/mon810Resistance.html.

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				
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		

[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 de 2005 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.

Conclusion

L'analyse des données fournies dans le rapport de surveillance n'indique pas de perte significative de la sensibilité à la toxine Cry1Ab des populations de pyrales échantillonnées en 2017. 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). L'analyse des données concernant les sésamies suggère toutefois un possible développement de résistance dans la population du nord-est de la péninsule Ibérique, ce qui serait cohérent avec l'étude de Camargo *et al.* (Camargo *et al.*, 2018).

De plus, le HCB identifie encore certaines limites méthodologiques concernant la surveillance de la résistance. D'une part, le HCB recommande que les efforts d'échantillonnage soient renforcés pour fournir une sensibilité de détection suffisante. En particulier, il recommande de ne pas regrouper les larves provenant de zones différentes, comme cela a été fait dans le cas des pyrales, au risque de ne pas détecter une perte de sensibilité propre à une zone donnée. En cas de suspicion de résistance pour un lot de larves provenant d'une zone donnée, cela permettrait de faire un échantillonnage renforcé ciblé dans la zone suspecte. Il recommande donc une harmonisation de la méthodologie des tests de diagnostic pour les deux ravageurs ciblés, à l'image de ce qui est fait pour les sésamies, et le test systématique de la dose diagnostic sur la souche sensible de laboratoire. D'autre part, le HCB estime que l'utilisation d'une dose diagnostic présente certaines limites 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. Enfin, le HCB demande à obtenir les données brutes des différents essais biologiques pour évaluer la qualité des données et de leur analyse.

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 Monsanto en 2017 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 Monsanto dans l'éventualité d'alertes sur le maïs MON 810. L'utilisation de réseaux de surveillance environnementale existants, envisagée dans les précédents rapports, n'a pas été développée cette année 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)[19]. La société Monsanto 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.

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 Monsanto 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, les seuls effets observés sont un meilleur rendement, une meilleure résistance à la verse, une maturité retardée (La mention d'une réduction de repousses dans la synthèse de l'analyse (*Appendix 1* p. 27) est erronée puisque l'analyse p. 63 ne montre pas d'effet significatif).

L'exemple de la sensibilité aux ravageurs (autres que la sésamie et la pyrale du maïs) montre combien les règles de décision utilisées sont arbitraires. Parmi 250 agriculteurs interrogés, 21 (8,4 %, soit une proportion inférieure à 10 %) indiquent que leur culture de maïs MON 810 est moins sensible à ces ravageurs qu'une culture de maïs conventionnel. Ici, considérant que l'intervalle de confiance à 99 % pour la proportion de *Minus* contient 10 %, la société Monsanto conclut que les plantes de maïs MON 810 sont moins sensibles aux ravageurs autres que la sésamie et la pyrale du maïs. Ce raisonnement est reproduit pour les pratiques de contrôle contre les ravageurs et pour la vigueur de germination.

L'exemple de l'analyse des performances des animaux nourris avec du maïs MON 810 montre des conclusions incorrectement justifiées : 1 agriculteur sur les 8/250 ayant utilisé le MON 810 comme aliments pour animaux a indiqué une différence dans la performance des animaux. La

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

société Monsanto conclut qu'il n'y a pas d'effet. Si la règle des 10 % est utilisée sur les 250, certes, 1 représente moins de 10 % Mais sur 8, 1 représente plus de 10 %. Cette conclusion est donc incorrectement justifiée.

Enfin, concernant les agriculteurs qui ont participé à l'enquête – 250 agriculteurs dont 236 en Espagne et 14 au Portugal – il est indiqué p. 16-17 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. 27, on comprend que ce chiffre résulte de différentes situations (erreurs, refus, absences…) à partir d'un échantillon initial de 502 agriculteurs contactés. 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 avec 2436 résultats exploitables. 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 conclusions incorrectement justifiées, et un possible biais associé au format d'enquête auprès d'une sélection d'agriculteurs.

- **Analyse bibliographique**

Une revue de la littérature scientifique a été réalisée sur la période de juin 2017 à mai 2018.

La société Monsanto 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 ? »[20].

Si le CS du HCB s'accorde avec la société Monsanto sur le fait qu'aucun des 25 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

[20] *"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?"*

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.

Dans le cadre de la recherche complémentaire d'information auprès d'organismes clefs impliqués dans l'évaluation des OGM, les organismes OGTR (*Office of the Gene Technology Regulator*) et GEAC (*Genetic Engineering Approval Committee*) ont été exclus au motif qu'ils n'ont évalué à ce jour que du coton et du colza GM. La remarque précédente relative au trait exprimé s'applique dans ce cas également : les articles qui concerneraient des PGM exprimant Cry1Ab sans pour autant concerner un maïs GM ne devraient pas être exclus de l'analyse.

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).

Il n'est jamais fait mention de la présence de téosinte dans le dossier. Pourtant les espèces « *Zea mays* » et « *Zea mays* ssp. *mexicana* » sont mentionnées chacune une fois parmi les adventices dont la présence est observée sur les 250 parcelles d'agriculteurs questionnés (*Appendix 1*, p. 117, *Table A 13*).

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 concernées 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 Ministerio Para la Trancision Ecologica[21].

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

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 d'adoption des variétés MON 810 entre 2012 et 2016 est de 60 % environ dans les trois régions d'Aragon, Catalogne et Navarre. D'autre part, la monoculture de maïs est prédominante dans ces régions (Tableau 25 de l'Appendix 1 du dossier). 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. 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 d'une introgression de gènes de maïs chez le téosinte n'est pas exclue. Aussi, il conviendrait de considérer les risques associés à une éventuelle introgression, chez le téosinte, du transgène exprimant Cry1Ab.

3. Conclusions

En conclusion générale, les analyses contenues dans le rapport de surveillance de Monsanto ne font apparaître aucun problème majeur associé à la culture de maïs MON 810 en 2017.

Cependant, le CS du HCB a identifié une erreur significative d'analyse statistique remettant en question l'analyse du suivi de la sensibilité des sésamies à la toxine Cry1Ab, et suggérant un possible développement de résistance dans les populations du nord-est de la péninsule Ibérique.

Par ailleurs, le CS du HCB identifie encore certaines faiblesses et limites méthodologiques concernant la surveillance de la résistance et la mise en œuvre des zones refuges. Le HCB estime notamment que l'utilisation d'une dose diagnostic présente certaines limites 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. Enfin, le HCB demande à obtenir les données brutes des différents essais biologiques pour évaluer la qualité des données et de leur analyse.

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 de Monsanto.

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.

Camargo, A.M., Andow, D.A., Castanera, P., and Farinos, G.P. (2018). First detection of a *Sesamia nonagrioides* resistance allele to Bt maize in Europe. Scientific Reports *8*.

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 (2011). Scientific Opinion on guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. EFSA Journal *9 (8): 2316*, 40 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 19 décembre 2018[22] sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès et 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[23].

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.

[22] Membres du CS présents et représentés lors de la discussion des rapports d'expertise en séance du 19 décembre 2018 : Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Klonjkowski, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Hubert de Verneuil, Jean-Luc Vilotte.

[23] 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 2017, MON 810 maize was planted in the European Union on approximately 131,553 ha in two countries: Spain (124,227 ha, 94.4%) and Portugal (7,308 ha, 5.6%).

Monsanto 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[24] in 2003, updated in 2012 and again in September 2017 and appended to the Monsanto 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 2017.

- **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.

In 2017, 250 farmers – 236 in Spain and 14 in Portugal – in environments typical of different MON 810 maize-growing sites were surveyed with regard to the planting of refuges, in

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

questionnaires sent out in connection with general surveillance. While the Portuguese farmers all indicated that they had complied with the refuge recommendations, 7.2% of the Spanish farmers (17 out of 236) said that they had not, for one of the following reasons:

(i) Not enough information about the technical guidelines and the risk of yield losses (8 out of 17; 47.1%);

(ii) Having two or three plots smaller than 5 ha (5 out of 17; 29.4%);

(iii) A refuge smaller than 20% of the MON 810 area (4 out of 17; 23.5%).

These figures show that farmers are properly aware of the need to manage the risk of resistance development in target pests. The findings for Spain, which represents 94.4% of the crop area, have levelled off (13.7%, 5.8% and 8.4% of the farmers surveyed stated that they had not complied with the refuge requirements in 2012, 2014 and 2016 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 Monsanto, 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[25] are required by law to verify compliance with refuge rules and penalise any growers found failing to comply (EPA, 2010).

The findings of Camargo *et al.* on evolution in the frequency of Cry1Ab resistance alleles in *S. nonagrioides* populations in the Ebro valley (Camargo *et al.*, 2018) 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.
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* 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.

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

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}[26])[27] 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%, a level allowing detection 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.

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 1,111 larvae collected in the Ebro valley in Spain in 2017, 628 specimens survived the diapause, reached the adult stage and mated. Of the 1,488 larvae tested in 2017 by exposure to the diagnostic dose, only 12 (0.8%) reached the second larval stage. These larvae died within five days after feeding on *Bt* maize. The 2017 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, it has certain limitations. Firstly, it was calculated using data from bioassays performed in the period from 2005 to 2012 with a different batch 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. The calculation of the diagnostic dose ought to take account of this difference in effectiveness between toxin batches. Secondly, the diagnostic dose is derived from data including populations already exposed to *Bt* maize and

[26] 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.

[27] 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.

therefore subject to selection pressure. Lastly, a diagnostic dose 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.* on *S. nonagrioides* (Camargo *et al.*, 2018)).

Table 1. Resistance ratios (RR) and diagnostic dose mortality (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				
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		

[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 2009 to 2018 Monsanto 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.

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.

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 1,452 larvae collected, 788 adults (54%) emerged, and the offspring of 95% of these adults (749) were used in bioassays. Of the 3,333 larvae exposed to the diagnostic dose in 2017, 5.9% reached the second larval stage. However, the same diagnostic dose applied to the laboratory strain did not cause moulting inhibition in 2.3% of the individuals tested. In the bioassays on *Bt* maize leaf tissue, all the larvae (10,650) 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, 1,000 F2 larvae siblings from the same oviposition cage were fed with MON 810 leaves and all died before reaching the second larval stage. Monsanto concluded that there was no sign of a decrease in *S. nonagrioides* susceptibility to Cry1Ab. The decreased susceptibility recorded in the 2012 monitoring report (*Appendix 7*, p. 11) was not confirmed between 2014 and 2015.

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 5 of the Cry1Ab toxin used in 2017 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.

A more problematic observation calls into question Monsanto's interpretation of its own assessment results. The report points out on p. 22 that there is no significant difference between the percentage of F1 larvae from the population in north-east Spain and that of larvae of the susceptible laboratory strain for which the diagnostic dose inhibited moulting. In fact, the statistical analysis providing this result is not correct. The test showing the averages for the three percentages (*Appendix 7*, p. 23, Table 9) is highly questionable: it lacks statistical power, being based on a *t*-distribution with two degrees of freedom. It would be more appropriate to test whether each of these percentages is actually equal to the expected 99% using a standard proportion test. The differences for 2017 are then very clearly significant, suggesting a significant increase in the resistance of the *S. nonagrioides* population in this region (see statistical analysis in Appendix 3 below).[28]

[28] The analysis of the HCB Scientific Committee's statistics expert is set out in detail on the following website: http://sia.webpopix.org/mon810Resistance.html.

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				
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		

[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 2018 Monsanto 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 indicate any significant loss of susceptibility to the Cry1Ab toxin by the *O. nubilalis* populations sampled in 2017. 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, analysis of the data on *S. nonagrioides* suggests possible development of resistance in the population in north-eastern Iberia, which would be consistent with the study by Camargo *et al.* (Camargo *et al.*, 2018).

HCB has also identified some methodological limitations with regard to resistance monitoring. Firstly, HCB recommends more sampling to provide sufficient detection sensitivity. In particular, it recommends not putting together larvae from different zones, as has been done in the case of *O. nubilalis*, since this might mean failing to detect a loss of susceptibility in a specific area. If resistance were to be suspected in a batch of larvae from a given zone, this would make it possible to carry out extra, targeted, sampling in this area. HCB therefore advises harmonising the methodology for diagnostic tests for both target pests along the lines of what is done for *S. nonagrioides*, as well as systematically testing the diagnostic dose on the susceptible laboratory strain. Secondly, HCB believes that use of a diagnostic dose has 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. Lastly, HCB would like to have the raw data for the various bioassays in order to evaluate the quality of the data and the data analysis.

2.2 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 Monsanto through three complementary activities in 2017: (1) surveys of MON 810 maize growers, (2) review of scientific literature published during the corresponding cultivation period, and (3) Monsanto support measures in the event of MON 810 maize alerts. Use of existing environmental networks, contemplated in previous reports, was not pursued this year owing to the limitations noted by EuropaBio and EFSA connected with processing of the data.

- **Analysis of farmers' responses to the surveillance questionnaire**

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). Monsanto 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 Monsanto 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, the only effects observed are a higher yield, better lodging resistance and a longer time to maturity (the reference to fewer volunteers in the summary of the analysis (*Appendix 1* p. 27) is wrong, since the analysis on p. 63 shows no significant effect).

The example of susceptibility to pests (other than *S. nonagrioides* and *O. nubilalis*) demonstrates how far the decision rules are arbitrary. Of the 250 farmers surveyed, 21 (8.4%, i.e. under 10%) stated that their MON 810 maize crop was less susceptible to these pests than a conventional maize crop. In this case, given that the 99% confidence interval for the 'minus' percentage contains 10%, Monsanto has concluded that the MON 810 maize plants are less susceptible to pests other than *S. nonagrioides* and *O. nubilalis*. The same logic is repeated for pest control practices and germination vigour.

The analysis of performance of animals fed with MON 810 maize is an example of wrongly drawn conclusions: one farmer out of the 8/250 having used MON 810 as feed indicated a difference in the performance of the animals. Monsanto has concluded that there is no effect. If the 10% rule is used for the 250, obviously one is less than 10%. But out of eight, one is over 10%. This conclusion is therefore drawn wrongly.

Lastly, with regard to the farmers participating in the survey – 250 in all, of whom 236 were in Spain and 14 in Portugal – it is indicated on pp. 16/17 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. 27 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 502 farmers contacted. 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? 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, with the results of 2436 being usable. For Monsanto, analysis of the replies to these questionnaires has not shown 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 selection of farmers.

- **Literature review**

A review of scientific literature was carried out for the period between June 2017 and May 2018.

Monsanto 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 Monsanto that none of the 25 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.

For the additional search for information from key organisations involved in GMO assessment, the Office of the Gene Technology Regulator (OGTR) and the Genetic Engineering Approval Committee (GEAC) have been excluded on the grounds that they have only assessed GM cotton and oilseed rape to date. The above comment on the expressed trait applies here as well: papers concerning GM plants expressing Cry1Ab without necessarily addressing a GM maize should not be excluded from the review.

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).

No reference is made to the presence of teosinte in the application. Yet the species *Zea mays* and *Zea mays* ssp. *mexicana* are each mentioned once among the weeds recorded on the 250 fields of the farmers surveyed (*Appendix 1*, p. 117, Table A 13).

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.[29]

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. Maize monoculture is also predominant in these regions (Table 25 in Appendix 1 of the application). 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. 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. Consequently, the risks associated with any introgression of the transgene expressing Cry1Ab ought to be taken into consideration.

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

2. Conclusions

The overall conclusion is that the assessment in the Monsanto monitoring report does not reveal any major problems associated with cultivation of MON 810 maize in 2017.

However, the HCB Scientific Committee has detected a significant error in the statistical analysis that calls into question the assessment of monitoring of *S. nonagrioides* susceptibility to the Cry1Ab toxin and suggests potential resistance development in populations in north-eastern Iberia.

The HCB Scientific Committee has also identified some methodological weaknesses and limitations concerning resistance monitoring and refuge implementation. HCB believes, for example, that the use of a diagnostic dose has certain limitations for early detection of resistance evolution 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. Lastly, HCB would like to have the raw data for the various bioassays in order to evaluate the quality of the data and the data analysis.

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 Monsanto 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.

Camargo, A.M., Andow, D.A., Castanera, P., and Farinos, G.P. (2018). First detection of a *Sesamia nonagrioides* resistance allele to Bt maize in Europe. Scientific Reports *8*.

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 (2011). Scientific Opinion on guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. EFSA Journal *9 (8): 2316*, 40 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 3 – Analyse statistique de l'évolution de la sensibilité chez les sésamies

MON810 monitoring program suggests a development of insect resistance

Abstract

According to Monsanto, one of the available weight-of-evidence continuing to support the safety of MON 810 is the absence of demonstrated field resistance for the targeted pests. This conclusion is essentially based on a comparison of 3 observed percentages (91.65%, 96.50%, 94.27%) that measure the susceptibility of insect larvae to a treatment dose that is supposed to inhibit moulting in at least 99% of these larvae. Despite the fact that these 3 values are well below the expected 99%, Monsanto's statistical analysis pretends to show that these differences are not statistically significant. Unfortunately, this analysis suffers from several flaws (choice of statistical test, choice of null hypothesis) that invalidate the Monsanto findings. This example is quite illustrative of what a more than questionable use of statistics makes it possible to make data say.

1. Introduction

Objective of the study

Maize containing event MON 810 is transgenic modified maize expressing the Cry1Ab protein and conferring protection against certain lepidopteran insect pests such as *Ostrinia nubilalis* and *Sesamia nonagrioides*.

Resistance development in targeted lepidopteran pests is a potential concern arising from the widespread cultivation of MON 810 maize varieties.

Monsanto established an insect resistance monitoring program in areas where MON 810 is cultivated. The objective is to detect the potential development of resistance that could result in inadequate protection against the target species.

The results of the monitoring plan for *S. nonagrioides* are presented in a report prepared by Monsanto and available here.

Note that this document is part of the annual monitoring report on the cultivation of MON 810 in 2017 submitted by Monsanto to the European Commission. This report was sent to European Food Safety Authority (EFSA) for an analysis of the results.

Diagnostic concentration bioassays

A diagnostic concentration (DC) of 1091 ng Cry1Ab/cm2, calculated with data from larvae collected in NE Spain over the seasons 2009, 2011, 2013 and 2015, was used for DC bioassays to measure susceptibility to the Cry1Ab protein.

This DC is intended to cause moulting inhibition between 99 and 100% to first instar larvae of *S. nonagrioides*.

The susceptibility to the protein Cry1Ab by the use of DC bioassays was tested on first filial (F1) progeny of the field populations collected from three different zones in NE Spain in 2017 and on

the reference laboratory strain of *S. nonagrioides*. Moulting inhibition, i.e. percentage of larvae that have not reached the second larval instar, was recorded after 7 days.

Results of the DC bioassays

The average percentage of moulting inhibition (MI) of neonates after treatment at the diagnostic concentration (DC) was estimated for the three three different field populations and the laboratory population:

```
D <- data.frame(N.control = c(175, 159, 160, 157),
                N.treatment   = c(1048, 1111, 1174, 654),
                MI.control = c(1.71, 15.09, 6.25, 14.01),
                MI.treatment  = c(91.79, 97.03, 94.63, 98.01))
row.names(D) <- c("zone.1", "zone.2", "zone.3", "laboratory")
print(D)

##            N.control N.treatment MI.control MI.treatment
## zone.1           175        1048       1.71        91.79
## zone.2           159        1111      15.09        97.03
## zone.3           160        1174       6.25        94.63
## laboratory       157         654      14.01        98.01
```

- N.treatment and N.control are, respectively, the numbers of larvae treated in bioassays and the numbers of control larvae
- MI.treatment and MI.control are, respectively, the moulting inhibitions in the treatment group and the control group.

Moulting inhibition values of each zone have been corrected with Abbottâ ™s formula (Abbott, 1925).

$$ MIc = \left(1 - \frac{100 - MI_{\rm treatment}}{100 - MI_{\rm control}} \right)\times 100 $$

```
D['MIc'] <- round((1 - (1-D$MI.treatment/100)/(1-D$MI.control/100))*100,
2)
print(D['MIc'])

##              MIc
## zone.1     91.65
## zone.2     96.50
## zone.3     94.27
## laboratory 97.69
```

Statistical analysis by Monsanto

Monsanto proposes to use a t-test to compare the average of the 3 (corrected) MI values (91.65%, 96.50%, 94.27%) obtained in the 3 zones with the expected value of 99%. A one-sided test is used to test if the moulting inhibition mean has decreased (H_0: $\mu \geq 99$ vs H_1: $\mu < 99$):

```
D.field <- D[c('zone.1', 'zone.2', 'zone.3'),]
MIc.field <- D.field[['MIc']]
```

```
MI.ref <- 99
t.test(MIc.field, mu=MI.ref, alternative ="less")

##
##  One Sample t-test
##
## data:  MIc.field
## t = -3.4675, df = 2, p-value = 0.03702
## alternative hypothesis: true mean is less than 99
## 95 percent confidence interval:
##     -Inf 98.2326
## sample estimates:
## mean of x
##     94.14
```

Monsanto also performed a t-test to determine if the observed percentage of moulting inhibition was significantly lower than the percentage of moulting inhibition observed in the susceptible reference strain after treatment at the same DC

```
MIc.lab <- D['laboratory','MIc']
t.test(MIc.field, mu=MIc.lab, alternative ="less")

##
##  One Sample t-test
##
## data:  MIc.field
## t = -2.5329, df = 2, p-value = 0.06344
## alternative hypothesis: true mean is less than 97.69
## 95 percent confidence interval:
##     -Inf 98.2326
## sample estimates:
## mean of x
##     94.14
```

These results are summarized and commented pp~11-12 of the Insect Resistance Monitoring Report - 2017:

Of the total F1 neonates originated from the field collected larvae, 3333 were used in the bioassays. The DC (1091 ng Cry1Ab/cm2) caused a mean (Â± S.E.) moulting inhibition of 94.14% Â± 1.4% (91.65%, 96.50% and 94.28% in larvae from zone 1, zone 2 and zone 3, respectively; Table 8). This value was significantly lower than the expected value of 99% (t = -3.4647, df = 2, p = 0.037). However, the same DC applied to neonates of the laboratory strain of S. nonagrioides caused moulting inhibition of 97.69% (Table 8). In this case, the average value obtained with field F1 neonates (94.14%) was not significantly lower from the moult inhibition value of the reference strain (t = -2.5373, df = 2, p = 0.063).

Our objective here is to explain why the conclusions formulated by Monsanto on the basis of these results are questionable.

2. Comments on the statistical analysis

Choice of the null hypothesis

We have seen that a one sided 95% confidence interval for the theoretical mean of moulting inhibition is $(-\infty, 98.23)$. In other word, the observed mean moulting inhibition of 94.14% cannot be considered as significantly lower than any value of this interval. And even then, this value is almost not significantly lower than the expected value of 99%.

But can we conclude from this that the susceptibility to the Bt toxin has not decreased? Of course no!

Indeed, to simply state that the null hypothesis ($\mu \geq 97.69$, for instance) cannot be rejected is not informative enough. In particular, the choice of the null hypothesis is critical. Monsanto takes as a reference hypothesis the fact that there is no attenuation in inhibition with respect to the reference strain:

$$ H_0 \ : ``\mu \geq 97.69\% " \quad vs \quad H_1 \ : ``\mu < 97.69\% " $$

It is then up to the data to demonstrate the opposite.

But given the very small number of data (3), it is necessary to observe a very large decrease to make it statistically significant. In our example, even if the null hypothesis is quite unlikely ($p = 0.063$), it cannot be formally rejected if we choose a significance level of 5%.

But what happens if we now choose to define as a null hypothesis the fact that resistance has increased in a biologically significant way?

Imagine for instance that an environmental organization claims that the expected percentage of moulting inhibition is less that 91%. Do the same data allow to demonstrate the contrary?

The hypotheses of the test are now:

$$ H_0 \ : ``\mu \leq 91\% " \quad {\rm vs} \quad H_1 \ : ``\mu > 91\% " $$

It can then be seen that the data collected in 2017 do not allow this hypothesis to be rejected ($p = 0.077$):

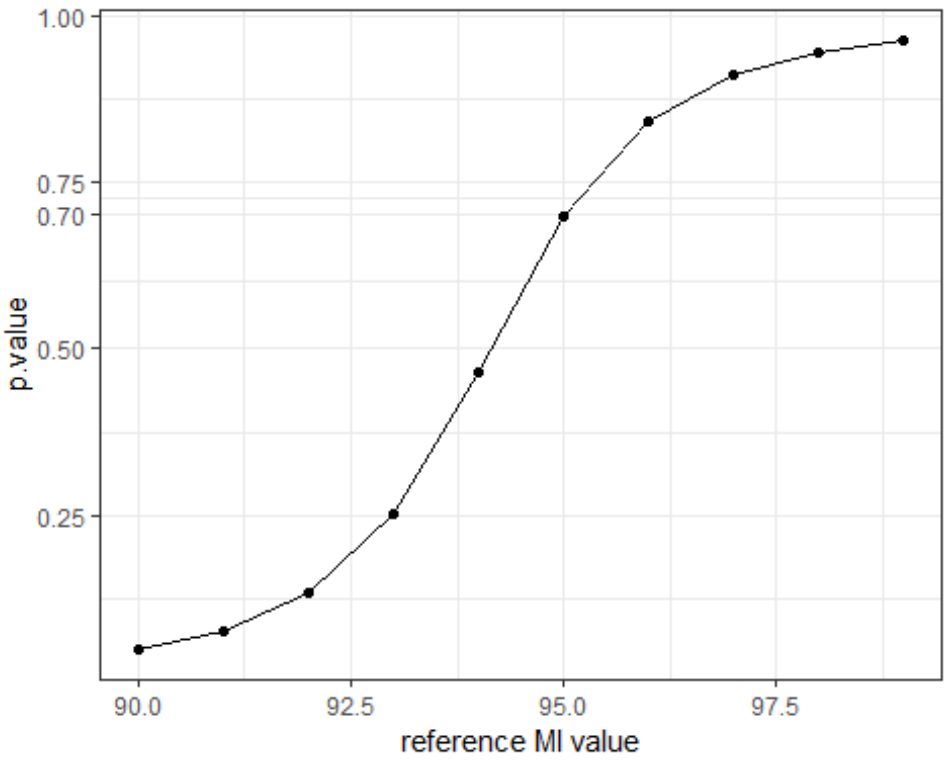
```
t.test(MIc.field, mu=91, alternative ="greater")
```

```
##
##  One Sample t-test
##
## data:  MIc.field
## t = 2.2403, df = 2, p-value = 0.07719
## alternative hypothesis: true mean is greater than 91
## 95 percent confidence interval:
##  90.0474     Inf
## sample estimates:
## mean of x
##     94.14
```

The graph below displays the p-values of the test $\mu \leq \mu_0$ vs $\mu > \mu_0$ for several values of μ_0:

```
R <- data.frame(ref=90:99)
R$p.value <- 1-pt((mean(MIc.field)- R$ref)/sd(MIc.field)*sqrt(3),2)
```

```
ggplot(R, aes(ref,p.value)) + geom_line() + geom_point() + xlab("referen
ce MI value") + scale_y_continuous(breaks=c(0.25, 0.50, 0.70, 0.75, 1))
```

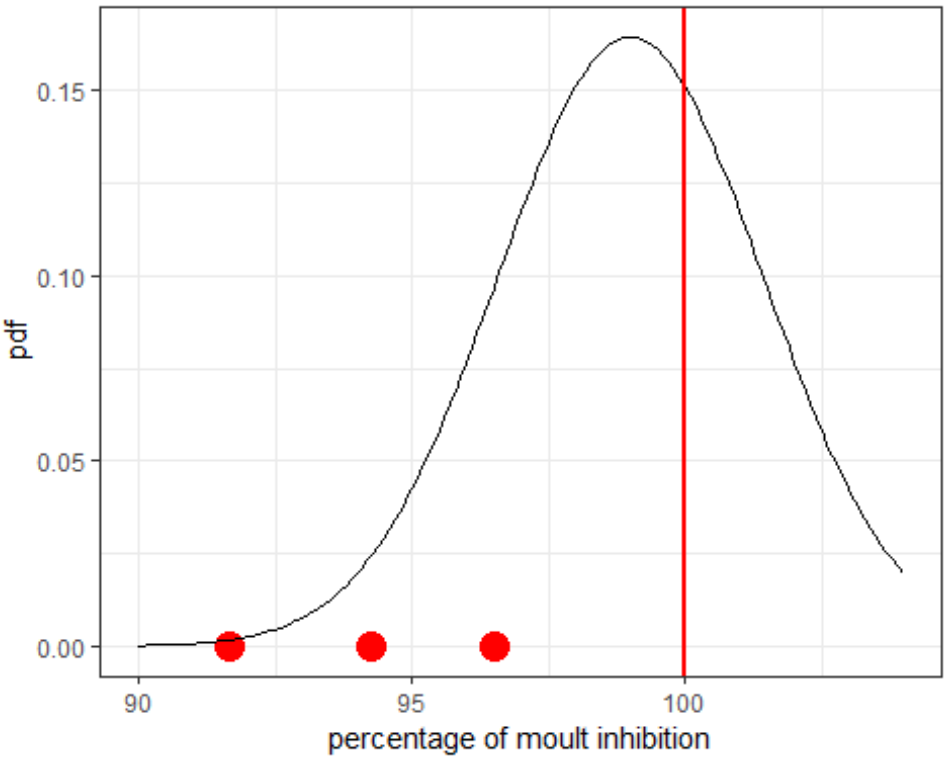


In particular, it can be seen that it is very likely that the expected percentage of moulting inhibition of neonates after treatment at the diagnostic concentration is less than 95% (p=0.70), which indicates a multiplication by at least 5 of the resistance of *S. nonagrioides* larvae to diagnostic concentration.

Choice of the statistical test

The use of a t-test assumes that the data are (roughly) normally distributed. In particular, under the null hypothesis $\mu = 99\%$, the moult inhibition values obtained in the different zones are assumed to be normally distributed around 99%:

```
x <- seq(90,104,by=0.1)
sd.MIc <- sd(MIc.field)
r <- data.frame(x=x, y=dnorm(x, MI.ref, sd.MIc))
ggplot(D.field) + geom_point(aes(x=MIc,y=0), color="red", size=5) +
  geom_line(data=r, aes(x,y)) + geom_vline(xintercept = 100, colour='red
', size=1)  + ylab('pdf') + xlab("percentage of moult inhibition")
```



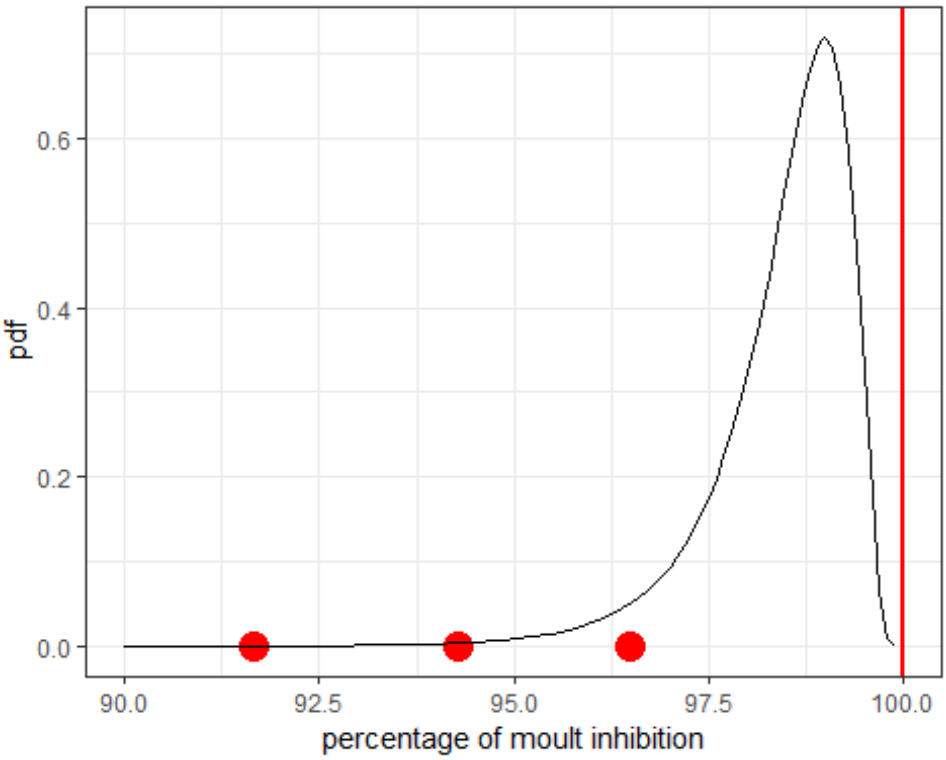
The graph shows very well that the normal distribution is not at all suitable for these data. Indeed, this normal distribution is symmetrical around 99%, which makes no sense since the values recorded are necessarily less than 100%.

One way to make data normal is by applying a well-chosen transformation to it. A logit ype transformation is well suited when the data $x_1, x_2, \ldots, x_n$ takes its values in a bounded interval such as $(0,100)$:

$$\tilde{x}_i = \log\left(\frac{x_i}{100 - x_i}\right)$$

Then, the transformed variable $\tilde{x}_i$ can take any positive or negative values. Assuming that the transformed variables $(\tilde{x}_i)$ are normally distributed is equivalent to assuming that the original variables (x_i) are logit-normally distributed:

```
x <- seq(90,99.9, by=0.1)
yt <- dnorm(log(x/(100-x)), log(MI.ref/(100-MI.ref)), sd(log(MIc.field/(
100-MIc.field)))*1.2)
r <- data.frame(x=x, y=yt)
ggplot(D.field) + geom_point(aes(x=MIc,y=0), color="red", size=5) +
  geom_line(data=r, aes(x,y)) + geom_vline(xintercept = 100, colour='red
', size=1)  + ylab('pdf') + xlab("percentage of moult inhibition")
```



The average of the transformed variables $(\tilde{x}_i, 1 \leq i \leq n)$ can now be compared to the transformed reference values $\log(99/(100-99))$ and $\log(97.69/(100-97.69))$

```
t.test(log(MIc.field/(100-MIc.field)), mu=log(MI.ref/(100-MI.ref)), alte
rnative ="less")

##
##  One Sample t-test
##
## data:  log(MIc.field/(100 - MIc.field))
## t = -6.5937, df = 2, p-value = 0.01112
## alternative hypothesis: true mean is less than 4.59512
## 95 percent confidence interval:
##      -Inf 3.615935
## sample estimates:
## mean of x
##  2.837648

t.test(log(MIc.field/(100-MIc.field)), mu=log(MIc.lab/(100-MIc.lab)), al
ternative ="less")

##
##  One Sample t-test
##
## data:  log(MIc.field/(100 - MIc.field))
## t = -3.4025, df = 2, p-value = 0.03829
## alternative hypothesis: true mean is less than 3.744552
## 95 percent confidence interval:
##      -Inf 3.615935
## sample estimates:
```

```
## mean of x
##  2.837648
```

Thus, a correct use of the t-test for these data shows that the average percentage of moulting inhibition of neonates after treatment at the diagnostic concentration is:

- significantly lower than the expected generical value of 99% ($p = 0.011$),
- significantly lower than the percentage of moulting inhibition observed in the susceptible reference strain ($p = 0.038$).

Individual comparisons

Beyond the problems raised by the choice of statistical test and the choice of hypothesis to be tested, the general approach used by Monsanto to analyze these data is highly questionable. Indeed, each percentage obtained in a zone is considered as a random variable for which only the mean value is of interest.

However, the three observed percentages of moulting inhibition (91.65%, 96.50%, 94.27%), corresponding to 3 different geographical zones, were obtained on large samples (larger than 1000) and should be analyzed individually.

Let μ_1, μ_2 and μ_3 be the three expected percentages of moulting inhibition for these 3 zones.

Exact Fisher tests show that these three expected percentages are different:

```
N.zone1 <- round(D.field$N.treatment[1]*c(MIc.field[1], 100-MIc.field[1]
)/100)
N.zone2 <- round(D.field$N.treatment[2]*c(MIc.field[2], 100-MIc.field[2]
)/100)
N.zone3 <- round(D.field$N.treatment[3]*c(MIc.field[3], 100-MIc.field[3]
)/100)
p12 <- fisher.test(matrix(c(N.zone1,N.zone2),nrow=2))$p.value
p13 <- fisher.test(matrix(c(N.zone1,N.zone3),nrow=2))$p.value
p23 <- fisher.test(matrix(c(N.zone2,N.zone3),nrow=2))$p.value
P <- data.frame(p.value=signif(c(p12,p13,p23),3), row.names=c("zone.1 vs
zone.2", "zone.1 vs zone.3","zone.2 vs zone.3") )
print(P)
```

```
##                    p.value
## zone.1 vs zone.2 1.45e-06
## zone.1 vs zone.3 1.54e-02
## zone.2 vs zone.3 1.29e-02
```

There is therefore a significant inter-zone variability in term of moulting inhibition of neonates after treatment at the diagnostic concentration.

95% confidence intervals for the three different unknwon percentages μ_1, μ_2 and μ_3 can be computed:

```
D.field$sd <- sqrt(D.field$MIc*(100-D.field$MIc)/D.field$N.treatment)
D.field$CI.lower <- D.field$MIc+qnorm(0.025)*D.field$sd
D.field$CI.upper <- D.field$MIc+qnorm(0.975)*D.field$sd
print(D.field[c('CI.lower', 'CI.upper')])
```

```
##        CI.lower CI.upper
## zone.1 89.97515 93.32485
```

```
## zone.2 95.41934 97.58066
## zone.3 92.94053 95.59947
```

Neither the theoretical value of 99% nor the value obtained from the reference stain (97.69%) belong to any of these confidence intervals. Then, the hypothesis that $\mu_1 \geq 99$ (resp. $\mu_2 \geq 99$ and $\mu_3 \geq 99$) is rejected without any hesitation:

```
sd.ref <- sqrt(MI.ref*(100-MI.ref)/D.field$N.treatment)
D.field$p.ref <- pnorm(D.field$MIc, MI.ref, sd.ref)
print(D.field['p.ref'])

##                 p.ref
## zone.1 1.097802e-126
## zone.2  2.763625e-17
## zone.3  5.968548e-60
```

We show in the same way that $\mu_1 < 97.69$, $\mu_2 < 97.69$ and $\mu_3 < 97.69$:

```
sd.lab <- sqrt(MIc.lab*(100-MIc.lab)/D.field$N.treatment)
D.field$p.lab <- pnorm(D.field$MIc, MIc.lab, sd.lab)
print(D.field['p.lab'])

##               p.lab
## zone.1 4.944250e-39
## zone.2 4.140172e-03
## zone.3 3.080193e-15
```

It can therefore be concluded that there was a significant reduction in moulting inhibition in 2017 in each of the three zones from Northeast of Spain.