

Maisons Alfort, le 1^{er} décembre 2008

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à une demande d'autorisation provisoire de mise sur le marché de la
préparation NEXY à base de *Candida oleophila* souche O, produite par la société
BIONEXT sprl**

LA DIRECTRICE GENERALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a accusé réception le 22 novembre 2006 d'un dossier, déposé par BIONEXT sprl, de demande d'autorisation de mise sur le marché pour la préparation NEXY, pour laquelle, conformément aux articles L.253, R.253 et suivants du code rural, l'avis de l'Afssa relatif à l'évaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques est requis.

Le présent avis porte sur la préparation NEXY à base de *Candida oleophila* souche O, destinée au traitement contre les maladies de conservation des produits récoltés des cultures de pommier et poirier.

Il est fondé sur l'examen du dossier déposé pour cette préparation, en conformité avec les exigences de la directive 91/414/CEE¹.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Produits phytosanitaires : microorganismes", réuni le 28 octobre 2008, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

CONSIDERANT L'IDENTITE DE LA PREPARATION

La préparation NEXY est un fongicide se présentant sous la forme de granulés dispersables dans l'eau (WG) contenant 81,4 g/kg de *Candida oleophila* souche O. La préparation est appliquée par trempage ou par aspersion des produits récoltés des cultures de pommier et poirier (les doses d'emploi sont mentionnées à l'annexe 1).

La préparation NEXY est constitué de deux éléments distincts :

- la biomasse (produit technique) qui contient *Candida oleophila* souche O sous forme d'un granulé dispersable (WG) qui contient 3×10^{10} UFC² de *Candida oleophila* souche O par gramme ;
- un additif, le gluconate de calcium (additif alimentaire autorisé, E578).

Ces deux éléments sont présentés dans des emballages individuels et réunis dans un même conditionnement. Ils doivent être utilisés conjointement pour la préparation de la bouillie NEXY.

Candida oleophila souche O est une nouvelle substance active en cours d'évaluation au niveau européen dont NEXY est la préparation représentative.

CONSIDERANT LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET LES METHODES D'ANALYSES

Les spécifications du *Candida oleophila* souche O entrant dans la composition de la préparation NEXY permettent de caractériser ce microorganisme et sont conformes aux exigences réglementaires.

¹ Directive 91/414/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 transposée en droit français par l'arrêté du 6 septembre 1994 portant application du décret 94/359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques

² UFC : Unité Formant Colonie

La préparation NEXY est une formulation de granulés dispersables dans l'eau, de couleur jaune, avec une odeur de levure. Elle ne présente pas de propriété comburante ou explosive. Elle n'est ni hautement inflammable, ni auto inflammable. Sa densité est de 0,667 kg/L après tassement. Le pH d'une dilution au 1/100^{ème} est de 6,24. La formulation (sans additif) reste stable pendant 6 mois à 20°C.

Les résultats des tests de mouillabilité, de suspensibilité, de stabilité de la suspension, de la dispersion, de la vitesse de dissolution et le test du tamis humide sont en dehors des limites acceptables. Cependant la substance technique (sous forme de "préparation biomasse") contient une proportion significative d'argile inerte et les valeurs sont par conséquent représentatives des propriétés de l'argile. De plus, étant donné que la préparation est proposée en traitement par trempage et par aspersion, les données sont acceptables dans ce cadre de cette demande. Ces données devront être revues après l'inscription de la substance active à l'annexe I.

Des données (tests de mouillabilité, de persistance de la mousse, de suspensibilité, de stabilité de la suspension, de la dispersion, de la vitesse de dissolution et le test du tamis humide réalisés en présence de la biomasse et de l'additif) démontrant que la préparation peut être utilisée en traitement par trempage ou par aspersion (homogénéité suffisante pendant l'utilisation) ont été soumises. Les résultats de ces essais sont considérés acceptables.

Concernant les caractéristiques techniques de la préparation, les données fournies permettent de s'assurer de la sécurité de son utilisation dans les conditions d'emploi préconisées. Les études ont montré que l'emballage était compatible avec la préparation.

Les méthodes d'analyses du micro-organisme dans la substance technique et la préparation sont jugées acceptables et conformes aux exigences réglementaires.

Les méthodes d'analyses pour déterminer et quantifier les résidus dans les denrées végétales traitées ne sont pas requises. Néanmoins, la méthode soumise peut être utilisée pour contrôler les concentrations en *Candida oleophila* et est considérée comme adaptée pour les études résidus.

Etant donné l'identité du microorganisme et ses propriétés toxicologiques, les méthodes pour la détermination des résidus de *Candida oleophila* dans le sol, l'eau et l'air ne sont pas requises.

Les méthodes d'analyse proposées sont des méthodes microbiologiques standards. Bien que ces méthodes n'utilisent pas de milieu de culture sélectif, une évaluation de la morphologie de la colonie avant le comptage assure la spécificité des méthodes pour la souche O.

CONSIDERANT LES PROPRIETES TOXICOLOGIQUES

Candida oleophila souche O est une levure ascomycète appartenant à la famille des *Candidaceae* Windish ex van der Walt. *Candida oleophila* souche O a été isolée en 1991 à la surface de pommes Golden Delicious. Cette souche n'est pas génétiquement modifiée. Elle est parfaitement identifiée notamment par des méthodes moléculaires.

Candida oleophila souche O appartient à un groupe physiologique différent des souches pathogènes du genre *Candida* chez l'homme : *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida krusei*. La capacité d'assimilation de l'inositol, des nitrates et de l'erythritol et la capacité à croître à des températures supérieures à 35°C permettent de différencier ces souches pathogènes pour l'homme de *Candida oleophila* souche O.

A ce jour, aucune production de composés pertinents d'un point de vue toxicologique n'a été démontrée pour *Candida oleophila* souche O. *Candida oleophila* souche O est proposée pour une utilisation comme biofongicide agissant principalement par compétition avec les phytopathogènes pour les nutriments après colonisation de la surface du fruit traité.

Les études toxicologiques réalisées sur la biomasse chez l'animal montrent que *Candida oleophila* souche O n'est ni pathogène, ni infectieuse pour les mammifères par voie orale, sous cutanée et intra-trachéale. Toutefois, des symptômes cliniques de sensibilisation respiratoire ont

été observés chez 3 travailleurs lors de la production à l'échelle pilote (sur 1 des 2 sites de production), justifiant la classification **R42** du microorganisme. Ces travailleurs ne portaient cependant pas d'équipement de protection individuel. Aucun cas de sensibilisation cutanée, ni de tout autre signe clinique n'a été observé chez ce même personnel.

Par ailleurs, selon la directive 2001/36/CE, aucune méthode n'étant validée pour tester les propriétés de sensibilisation des microorganismes, il est considéré que tous les microorganismes sont des sensibilisants potentiels, ce qui conduit à proposer la classification **Xn, R42/43** pour la préparation NEXY.

CONSIDERANT LES DONNEES RELATIVES A L'EXPOSITION DE L'OPERATEUR ET DES TRAVAILLEURS

Estimation de l'exposition de l'opérateur

Il n'est pas possible de modéliser l'exposition de l'opérateur pour les préparations à base de microorganismes.

Les méthodes d'application proposées (par trempage ou par aspersion) permettent de limiter le taux de contamination auquel est exposé l'opérateur. De plus, l'évaluation toxicologique indique que la toxicité, la pathogénicité et l'infectiosité du microorganisme est faible. Par ailleurs, *Candida oleophila* n'est pas un pathogène connu chez l'homme. Il n'est pas connu pour produire des métabolites qui seraient absorbés par la peau et il est inactivé à une température supérieure à 35°C.

Toutefois, des opérateurs ont présenté des signes de sensibilisation respiratoire pouvant être reliés à l'exposition à cet agent pendant la phase de développement du microorganisme.

Ainsi, le risque n'est considéré comme étant acceptable que si l'opérateur porte des gants, un vêtement de protection et un appareil de protection respiratoire lors du mélange/chargement du produit NEXY BIOMASSE et de l'additif et lors de l'application du produit formulé NEXY.

Exposition des travailleurs

Du fait du mode d'utilisation de la préparation pour les usages revendiqués, les travailleurs n'étant pas exposés à la préparation et manipulant les fruits secs, le risque toxicologique pour les travailleurs est acceptable.

CONSIDERANT LES DONNEES RELATIVES AUX RESIDUS ET A L'EXPOSITION DU CONSOMMATEUR

Les données résidus fournies dans le cadre de ce dossier d'examen de la préparation NEXY sont les mêmes que celles soumises pour l'inscription du *Candida oleophila* souche O à l'annexe I de la directive 91/414/CEE.

Définition du résidu

Aucune définition du résidu n'a été jugée nécessaire pour l'inscription de *Candida oleophila* souche O à l'annexe I de la directive 91/414/CEE. De ce fait, les essais résidus et les études d'alimentation animale, de rotation culturale et de transformations industrielles ne sont pas nécessaires.

Evaluation du risque pour le consommateur

Aucune dose de référence aiguë (ARfD), ni dose journalière admissible (DJA) n'ayant été définie pour le *Candida oleophila* souche O, l'évaluation des risques à court terme et à long terme n'est pas nécessaire. Par conséquent, aucun risque inacceptable n'est attendu pour le consommateur.

Limites maximales de résidus (LMR)

Candida oleophila souche O sera incluse à l'annexe IV du règlement (CE) n°396/2005³, qui regroupe les substances actives évaluées selon la directive 91/414/CEE pour lesquelles aucune LMR n'est requise, lors de la finalisation de l'inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CEE.

³ Règlement (CE) n°396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005, concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil (JOCE du 16/03/2005) et

Délais d'emploi avant récolte (DAR)

Non pertinent pour les usages revendiqués.

CONSIDERANT LES DONNEES RELATIVES AU DEVENIR ET AU COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT

Les données suivantes sont issues du dossier européen. La levure *Candida oleophila* souche O est destinée à être utilisée en traitement post-récolte des pommes et poires dans un local adapté à cet usage.

Devenir et comportement dans le sol

Du fait du mode d'utilisation de la préparation, aucun risque de contamination des eaux souterraines par *Candida oleophila* souche O n'est attendu.

Devenir et comportement dans l'eau

Les quantités résiduelles de produit à la fin d'un cycle de traitement sont désinfectées puis traitées par une société spécialisée. Le transfert de bouillie résiduelle vers les eaux de surface par rejet en rivière ou autre est donc négligeable.

Comportement dans l'air

Aucune donnée n'est disponible sur la persistance ou la mobilité de *Candida oleophila* souche O dans l'air. Cependant, comme l'usage est un traitement des produits récoltés par trempage et aspersion, la dissémination de produit ou de microorganisme dans l'air est considérée comme faible.

CONSIDERANT LES DONNEES D'ECOTOXICITE

La toxicité de *Candida oleophila* sur poisson (*Oncorhynchus mykiss*), daphnie (*Daphnia magna*) et algue (*Pseudokirchneriella subcapitata*) a été renseignée dans le dossier européen.

Du fait du mode d'utilisation de la préparation NEXY, les risques écotoxicologiques pour les oiseaux, mammifères, organismes aquatiques, abeilles et arthropodes non cibles, microorganismes du sol, macroorganismes du sol et plantes non-cibles, sont négligeables.

CONSIDERANT LES DONNEES BIOLOGIQUES

Les principales maladies de conservation des pommes et des poires en France sont :

- les gloeosporioses, dues pour la plupart au champignon *Pezicula alba*, gloeosporiose la plus fréquente en Europe. Il s'agit d'un parasite latent dont l'infection a lieu au verger, surtout durant le mois qui précède la récolte ;
- la pourriture verte à *Penicillium expansum*, parasite de blessure dont l'infection a lieu principalement en station fruitière. Elle représente l'une des principales causes de pertes en conservation après les gloeosporioses en distribution ;
- la pourriture grise (Botrytis de l'œil) due à *Botrytis cinerea*, dont la contamination peut avoir lieu dès la floraison, et peu avant la récolte. Le Botrytis de l'œil est secondaire en France, et moins important sur pomme que sur poire en conservation.

Candida oleophila souche O agit principalement par compétition pour les nutriments avec les champignons *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum* après colonisation de la surface du fruit traité. Cependant, un effet d'antagonisme⁴ est suspecté et est actuellement à l'étude. L'additif joint à la levure dans le produit constitue un apport nutritionnel pour la levure.

Essais préliminaires

Les essais préliminaires contre *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum* ne démontrent pas clairement le choix de la dose revendiquée et le choix de l'additif du fait que :

règlements modifiant ses annexes II, III et IV relatives aux limites maximales applicables aux résidus des produits figurant à son annexe I.

⁴ Une production très limitée de beta 1-3 glucanase (enzyme qui hydrolyse les parois cellulaires des champignons) pourrait à l'origine d'un phénomène antagoniste de *Candida oleophila* souche O.

- les additifs testés sont différents de celui composant la formulation finale du produit NEXY ;
- peu d'essais sont disponibles ;
- la performance du produit n'est pas stable, en particulier sur *Botrytis cinerea*.

Deux doses ont été testées : la dose revendiquée (N) et la dose N/10. Compte tenu du fait que l'efficacité à la dose N/10 est presque toujours inférieure à l'efficacité à la dose N, avec ou sans additif, en particulier les premiers jours après traitement, la dose revendiquée de 233 g/hl soit 1.10^7 UFC/ml est considérée comme acceptable.

Essais d'efficacité

Les données fournies proviennent d'essais réalisés en Belgique, en Italie et en France. L'efficacité de la préparation NEXY sur *Botrytis cinerea* a été évaluée selon un protocole de stockage court. Sur la base des résultats fournis, l'efficacité de la préparation NEXY à la dose d'application de 233 g/hl soit 1.10^7 UFC/ml est équivalente à celle de la référence (thiabendazole) avec 73 % d'efficacité, mais avec des résultats très variables. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la performance du produit sur ce pathogène.

Sur *Penicillium expansum*, l'efficacité de la préparation NEXY est moyenne avec 65 % d'efficacité et tend à être meilleure que celle de la référence à base de thiabendazole pour laquelle des cas de résistance sont suspectés. Sur la base d'études spécifiques, il apparaît que l'agitation de la bouillie avant traitement est bénéfique à la performance de la préparation NEXY. De plus, les deux types d'application, par trempage et par aspersion, sont équivalents du point de vue de l'efficacité du produit.

Les essais ayant été réalisés uniquement sur *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*, l'efficacité du produit sur les gloeosporioses (principalement dues à *Pezizula*) n'est pas démontrée. En conséquence, l'usage "maladie de conservation" est limité aux champignons *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*.

La compatibilité biologique entre *Candida oleophila* souche O et différents fongicides utilisés habituellement dans les vergers a été testée, et il apparaît qu'une sensibilité de *Candida oleophila* souche O a été détectée vis-à-vis du thirame, du captane et du tolylfuanid. De plus, des tests réalisés *in vitro* ont révélé une sensibilité de la souche à un double traitement cuivre/soufre.

Phytotoxicité

Aucun effet phytotoxique de la préparation NEXY sur les fruits traités n'a été observé dans les essais d'efficacité. Cependant, dans des essais spécifiques menés en Belgique, des rugosités sont apparues sur les pommes traitées de variétés Golden Delicious et Jonagold. D'après les résultats obtenus, le niveau de phytotoxicité est considéré comme acceptable.

Effets sur le rendement, la qualité des plantes et produits transformés

Aucun effet négatif significatif n'a été observé ou mesuré sur la qualité des fruits traités.

Aucune étude sur les procédés de transformation n'ayant été fournie, le produit ne peut donc pas être recommandé pour le traitement des fruits destinés à la production de cidre.

Effets secondaires non recherchés (cultures suivantes, cultures adjacentes, organes destinés à la reproduction, organismes non-cibles)

Non pertinent dans le cas d'un traitement post-récolte.

Résistance

Le mode d'action concerne essentiellement une compétition avec les pathogènes *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum* pour les nutriments. Aucun risque de développement de résistances n'est attendu dans ce cas.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que :

- A. Les caractéristiques physico-chimiques de la préparation NEXY ont été décrites ; elles permettent de s'assurer de la sécurité de son utilisation dans les conditions d'emploi préconisées. Les méthodes de détermination et de quantification du résidu ne sont pas requises. La méthode fournie est cependant considérée comme acceptable.

Les risques pour l'opérateur et les travailleurs sont acceptables avec port de gants, d'un vêtement de protection et d'un appareil de protection respiratoire. Les risques pour les travailleurs sont acceptables.

Les risques pour le consommateur sont considérés comme acceptables.

Les risques pour l'environnement, liés à l'utilisation de la préparation NEXY pour les usages demandés sont considérés comme acceptables. Les risques pour les organismes terrestres et aquatiques sont également acceptables.

- B. Au regard des informations fournies, la justification de la dose de 1.10^7 UFC/ml est acceptable. En revanche, le choix de l'additif n'est pas clairement justifié.

Les résultats d'essais fournis démontrent l'efficacité de NEXY contre le champignon *Penicillium expansum*. L'efficacité de la préparation sur *Botrytis cinerea* est acceptable mais très variable. L'efficacité sur les gloéosporioses n'étant pas étudiée, l'efficacité de la préparation NEXY contre les maladies de conservation des pommes et des poires est acceptable avec une restriction aux pathogènes *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* uniquement. Il conviendra de fournir des essais d'efficacité supplémentaires, menés avec la formulation définitive de la préparation NEXY, et démontrant la stabilité de l'efficacité du produit sur *Botrytis cinerea*.

Concernant la compatibilité biologique de la préparation NEXY avec d'autres fongicides couramment utilisés dans les vergers, il est à noter que la souche *Candida oleophila* souche O présente une sensibilité aux traitements à base de thirame, de captane et de tolyfluand. De plus, une sensibilité au double traitement cuivre/soufre a été détectée *in vitro* et doit être confirmée lors d'études spécifiques réalisées en conditions réelles.

En l'absence d'une étude démontrant l'innocuité de la préparation NEXY sur la production de cidre, il conviendra de ne pas appliquer NEXY sur des pommes destinées à ce mode de transformation.

Aucun risque de développement de résistance n'est attendu dans le cas d'une compétition nutritive.

Classification de la préparation NEXY, phrases de risque et conseils de prudence :
Xn, R42/43 S22 S36/37

Xn : Nocif

R42/43 : Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et contact avec la peau

S22 : Ne pas respirer les poussières

S36/37 : Porter un vêtement de protection et des gants appropriés

Conditions d'emploi

- Pour l'opérateur, porter des gants, un vêtement et des lunettes de protection ainsi qu'un appareil de protection respiratoire est recommandé lors du mélange/chargement du produit NEXY BIOMASSE et de l'additif.
- Attendre le séchage complet des fruits avant leur manipulation.

- SP1 : Ne pas polluer l'eau avec le produit ou son emballage. [Ne pas nettoyer le matériel d'application près des eaux de surface. /Eviter la contamination via les systèmes d'évacuation des eaux à partir des cours de ferme ou des routes.]

Etiquette

Il conviendra d'apporter les modifications suivantes :

- Ne pas appliquer sur des pommes destinées à la production de cidre.
- Préciser que la préparation n'est efficace que contre *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*.

En conséquence, considérant l'ensemble des données disponibles, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet un avis **favorable** (annexe 2) pour une autorisation de mise sur le marché de la préparation NEXY.

Candida oleophila souche O étant une substance active en cours d'évaluation au niveau européen, la préparation devra être réexaminée ultérieurement sur la base des critères qui seront précisés dans le rapport d'évaluation européen et dans les délais qui seront indiqués dans la directive d'inscription. De plus, il conviendra de fournir les études demandées dans le cadre de la présente évaluation.

Pascale BRIAND

Mots-clés : NEXY, *Candida oleophila* souche O, fongicide, traitement post-récolte, pommes, poires, WG

Annexe 1

Liste des usages revendiqués dans la présente demande d'homologation pour la préparation NEXY

Substance	Composition de la préparation	Dose de substance active
<i>Candida oleophila</i> souche O	81,4 g/kg	1.10^7 UFC/ml

Usage	Dose d'emploi (g/hL)	Dose en substance active (UFC/ml)	Nombre maximum d'applications	DAR (en jours)
<u>12604201</u> -Pommier*produits récoltés*maladies de conservation	233	1.10^7	1	NA
<u>12614201</u> -Poirier*produits récoltés*maladies de conservation	233	1.10^7	1	NA

Annexe 2

Liste des usages proposés pour une autorisation provisoire pour la préparation NEXY

Usages	Dose d'emploi (g/hL)	Dose en substance active (UFC/ml)	Nombre maximum d'applications	DAR (en jours)
<u>12604201</u> -Pommier*produits récoltés*maladies de conservation uniquement contre <i>Penicillium expansum</i> et <i>Botrytis cinerea</i> (*)	233	1.10^7	1	NA
<u>12614201</u> -Poirier*produits récoltés*maladies de conservation uniquement contre <i>Penicillium expansum</i> et <i>Botrytis cinerea</i>	233	1.10^7	1	NA

* Ne pas utiliser les pommes traitées pour la production de cidre.