

Maisons-Alfort, le 16 février 2011

LE DIRECTEUR GENERAL

AVIS

**de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail
relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché de la préparation
BIO1020 à base de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52,
de la société NOVOZYMES BIOLOGICALS FR,
dans le cadre d'une procédure de reconnaissance mutuelle**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (l'Anses qui reprend, depuis le 1^{er} juillet 2010, les missions de l'Afssa et de l'Afsset) a accusé réception d'un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché pour la préparation BIO1020 à base de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52, déposé par la société NOVOZYMES BIOLOGICALS FR, dans le cadre d'une procédure de reconnaissance mutuelle pour laquelle, conformément à l'article L.253-4 du code rural, l'avis de l'Anses relatif à l'évaluation des risques sanitaires et de l'efficacité de cette préparation est requis.

La demande de reconnaissance mutuelle porte sur la préparation BIO1020 autorisée aux Pays-Bas depuis 2004 pour le traitement insecticide de nombreuses cultures en zones agricoles. Cette préparation a fait l'objet d'une évaluation scientifique par les autorités néerlandaises sur laquelle ces autorités se sont fondées pour autoriser la préparation BIO1020. Dans le cadre de cette procédure, les Pays-Bas ont transmis à l'Anses son rapport d'évaluation.

Il est fondé sur l'examen du dossier déposé auprès des autorités des Pays-Bas et d'un dossier complémentaire déposé auprès des autorités françaises, en conformité avec les exigences de la directive 91/414/CEE¹ et de la procédure de reconnaissance mutuelle prévue par cette directive.

COMPARAISON DES USAGES ET DES PRATIQUES AGRICOLES

La préparation BIO1020 a été autorisée aux Pays-Bas pour le traitement insecticide contre l'otiorhynque pour les cultures de cassissier, groseillier, framboisier et autres rubus, fraisier, vigne, arbres et arbustes d'ornement et cultures florales.

Les usages revendiqués en France concernent le traitement insecticide des arbres et arbustes d'ornements, des cultures florales, des fraisiers, des framboisiers, des myrtilliers, des cassissiers et des groseilliers, contre l'otiorhynque (*Otiorhynchus sulcatus*). Le détail des usages et des doses d'emploi annuelles revendiqués en France pour la préparation BIO1020 est indiqué à l'annexe 1.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Produits phytosanitaires : microorganismes", réuni le 20 janvier 2011, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet l'avis suivant.

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.

CONSIDERANT L'IDENTITE DE LA PREPARATION

La préparation BIO1020 est un insecticide composé de 20 g/kg de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 (soit 9.10^8 UFC²/g), se présentant sous la forme de granulés (GR), appliqué en mélange avec le terreau sans dilution préalable. L'application de la préparation se fait extemporanément à l'utilisation du terreau. Ce terreau enrichi ne peut être destiné à la commercialisation en tant que tel.

Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* F52³ est un microorganisme inscrit à l'annexe I de la directive 91/414/CEE.

La souche *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 n'est pas génétiquement modifiée. Elle est identifiée notamment par des méthodes moléculaires. Elle est déposée dans plusieurs collections de référence de cultures de microorganismes (DSM 3884, ATCC 90448...).

La souche *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 a initialement été isolée en Autriche sur *Carpocapsa pomonella*. *M. anisopliae* est un champignon pathogène des insectes présentant une large gamme de spécificité d'hôtes. Ce champignon est cosmopolite et se retrouve principalement dans des insectes et dans le sol.

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

Les spécifications de la substance active, *Metarhizium anisopliae* var. 'BIPESCO 5/F52' entrant dans la composition de la préparation BIO1020 permettent de caractériser la substance active et sont conformes aux exigences réglementaires.

Les propriétés physiques et chimiques de la préparation BIO1020 ont été décrites dans le rapport d'évaluation européen du *Metarhizium anisopliae* var. 'BIPESCO 5/F52', et les données disponibles permettent de conclure que la préparation ne présente de propriété explosive ni comburante. La préparation n'est ni hautement inflammable, ni auto-inflammable à température ambiante. Le pH d'une dilution aqueuse de la préparation à la concentration de 1 % est de 5,95.

L'étude de stabilité au stockage fournie (8 mois à 5°C) montre que la viabilité des spores est acceptable dans ces conditions. Cette étude étant incomplète, il conviendra de fournir en post-autorisation une nouvelle étude de stabilité au stockage donnant la teneur en *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* 5/F52, les informations sur le développement des microorganismes contaminants, la viabilité des spores, la distribution granulométrique, le pH, la teneur en poussière, les caractéristiques de friabilité et d'usure des granulés avant et après stockage dans l'emballage préconisé. Il conviendra également de s'assurer que les informations sur la viabilité des spores et les organismes contaminants sont en accord avec les spécifications.

Les méthodes de détermination de la substance active, des impuretés et des contaminants dans chaque substance active technique ainsi que la méthode d'analyse de la substance active, des impuretés et des contaminants dans la préparation sont conformes aux exigences réglementaires. La préparation ne contenant pas d'impuretés déclarées pertinentes, aucune méthode d'analyse n'est nécessaire pour la détermination des impuretés dans la préparation.

CONSIDERANT LES PROPRIETES TOXICOLOGIQUES

En laboratoire *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 ne pousse pas à 37°C. *Metarhizium anisopliae* n'est pas apparenté à un pathogène de l'homme ou de l'animal. L'espèce *M. anisopliae* n'appartient pas à la liste des pathogènes pour l'homme (directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail).

² UFC : unité formant colonie

³ Directive 2008/113/CE de la Commission du 8 décembre 2008 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil en vue d'y inscrire la substance active *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52.

Les travaux du groupe de travail européen RAFBCA (Risk Assessment of Fungal Biological Control Agents) ont montré que la souche *M. anisopliae* var. *anisopliae* F52 produisait les toxines destruxines A, B et E dans les cadavres d'insectes mais également en laboratoire sur un milieu de culture enrichi. Ces travaux ont révélé que la production de ces toxines par le champignon dépendait des méthodes de culture. Toutefois, ces toxines ne sont pas produites dans le fermenteur lors d'une production à grande échelle. De plus, une recherche de destruxines et de cytochalasines réalisée sur le produit technique et la préparation s'est avérée négative.

M. anisopliae est utilisé en tant que biopesticide depuis plusieurs décennies notamment en zone tropicale sur canne à sucre. Hormis des cas d'allergie, il n'a pas été rapporté de pathologie associée à son utilisation ou à sa production (Zimmermann, 1993). Seuls 4 cas cliniques d'infections à *M. anisopliae* sont rapportés dans la littérature. Il s'agit de deux rhinites, d'une kératite et d'une infection disséminée chez un individu immunodéprimé. Aucun de ces cas n'était associé à l'usage de *M. anisopliae* comme biopesticide.

Les études de toxicité aiguë, de pathogénicité et d'infectiosité, réalisées avec le microorganisme chez le rat par voie orale, intra-trachéale et intra-péritonéale n'ont pas induit de mortalité. Les seuls effets observés sont une augmentation du poids relatif des poumons lors d'administration intra-trachéale et une augmentation du poids relatif de la rate lors d'administration intra-péritonéale. De plus, chez le lapin le microorganisme s'est avéré non toxique par voie cutanée et non irritant pour les yeux.

Les tests mis en œuvre pour tester la sensibilisation respiratoire et cutanée n'étant pas adaptés à l'analyse des microorganismes, les microorganismes sont considérés comme étant des sensibilisants potentiels. De plus, il a été montré que des individus atopiques vivant près de plantations de canne à sucre où *M. anisopliae* est utilisé comme biopesticide sont plus susceptibles de développer une réaction allergique quand ils sont exposés à un extrait brut de *M. anisopliae* que des individus atopiques vivant en milieu urbain. Aucune réaction allergique n'a été observée chez les contrôles non atopiques (Barbieri *et al.*, 2005).

Dans le cadre du groupe de travail RAFBCA, deux tests d'Ames et un essai VITOTOX ont été réalisés avec les extraits bruts et plusieurs toxines purifiées de *M. anisopliae*. Ces tests se sont avérés négatifs. Cependant, certaines destruxines ont montré une légère cytotoxicité.

La préparation BIO1020 contient 9.10^8 UFC/g de *M. anisopliae*. La préparation est constituée de grains de riz ensemencés avec le microorganisme. Considérant que les co-formulants ne sont pas de nature à modifier les propriétés toxicologiques de la substance active, il a été décidé que les études réalisées dans le cadre de l'inscription à l'annexe I du microorganisme *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 sont également applicables à la préparation contenant le microorganisme, à savoir la préparation de référence BIO1020.

La classification de la préparation, déterminée au regard de ces résultats expérimentaux, de la classification du microorganisme et des formulants ainsi que de leur teneur dans la préparation, proposée dans le rapport d'évaluation des Pays-Bas et proposée par l'Anses figure à la fin de l'avis.

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

Estimation de l'exposition des opérateurs

L'opérateur peut être exposé aux conidies de *M. anisopliae* lors de l'application de la préparation BIO1020. Cependant, au regard des résultats des tests expérimentaux de toxicité, de pathogénicité et d'un historique d'utilisation sans effet notoire du microorganisme depuis plusieurs décennies, des effets nocifs sur les personnes exposées ne sont pas attendus.

Les principaux métabolites secondaires sécrétés par *M. anisopliae* var. *anisopliae* F52 en essai au laboratoire sont les destruxines A, B and E. Aucune toxine (destruxines et cytochalasines) n'a été détectée dans la préparation.

Toutefois, considérant le potentiel sensibilisant des microorganismes, il conviendra de mettre en œuvre des mesures de protection individuelle de l'opérateur (port de gants, vêtement de protection et masque anti-poussière) lors de l'utilisation de la préparation BIO1020.

Estimation de l'exposition des personnes présentes

L'exposition par inhalation d'une personne située à plusieurs mètres étant improbable, le risque pour les personnes présentes est considéré comme acceptable.

Estimation de l'exposition des travailleurs

Du fait de la nature microbienne de la préparation, une réaction de sensibilisation cutanée ne peut être exclue notamment lors de rempotage. Compte tenu des propriétés potentiellement sensibilisantes de la préparation, il conviendra de porter des gants et des vêtements de protection.

CONSIDERANT LES DONNEES RELATIVES A LA CONSOMMATION

Définition du résidu

Aucune définition du résidu n'a été jugée nécessaire pour l'inscription de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 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

Après le traitement du sol, *Metarhizium anisopliae* se développe dans le sol et produit des toxines dans les insectes hôtes. De par son mode d'action, aucun résidu viable ou toxine n'est attendu sur la récolte des cultures traitées. De plus, aucune dose de référence aiguë (ARfD), ni dose journalière admissible (DJA) n'ayant été définie pour le *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52, 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)

Lors de la finalisation de l'inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CEE, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 pourrait être candidat à l'annexe IV du règlement (CE) n°396/2005⁴, qui regroupe les substances actives évaluées selon la directive 91/414/CEE pour lesquelles aucune LMR n'est requise.

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

Devenir et comportement dans le sol

La souche *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 est présente dans le monde entier sur des insectes et est fréquemment retrouvée dans les sols.

- **Persistance dans le sol**

Sur la base des informations fournies dans le dossier, il est attendu que le nombre d'UFC de *M. anisopliae* var. *anisopliae* 'BIPESCO 5/F52' ajouté dans le sol par l'application de la préparation BIO1020 diminue progressivement jusqu'à des niveaux présents naturellement dans l'environnement. La durée de ce processus dépendra de la présence d'hôtes potentiels permettant une multiplication des spores.

- **Mobilité**

Des expérimentations sur colonne de sol ont été réalisées sur deux types de sols, sableux et sable limoneux. Le nombre de spores est réduit de 90 à 99 % à 10 cm de profondeur. Il n'est pas attendu de transfert significatif des spores vers les eaux souterraines.

⁴ 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 règlements modifiant ses annexes II, III et IV relatives aux limites maximales applicables aux résidus des produits figurant à son annexe I.

Comportement dans l'eau

En raison du mode d'application par incorporation au sol, le potentiel de contamination des milieux aquatiques par la préparation BIO1020 est considéré comme négligeable.

Comportement dans l'air

La préparation BIO1020 est incorporée dans le sol. Le potentiel d'émission dans l'air peut être considéré comme négligeable.

CONSIDERANT LES DONNEES D'ECOTOXICITE

Les conclusions de l'évaluation réalisée par l'Anses suivent celles réalisées par les Pays-Bas (Etat Membre Rapporteur).

Effets sur les oiseaux

En raison des conditions optimales de température pour la sporulation (25 à 30 °C), du fait que les oiseaux ne sont pas des hôtes connus de ce microorganisme et qu'aucun effet n'a été observé alors que les oiseaux sont exposés naturellement, les risques aigus, à court-terme et à long-terme liés à l'application de la préparation BIO1020 sont considérés comme négligeables pour les oiseaux granivores exposés par voie directe (par ingestion de grains de riz) ou indirecte (par ingestion d'arthropodes contaminés).

En raison du mode d'application et du mode d'action, aucune étude de toxicité pour la reproduction n'a été demandée lors de l'évaluation communautaire. Dans le cas des usages revendiqués, ces données ne sont pas nécessaires et les risques peuvent être considérés comme faibles.

Les risques aigus, liés à la consommation d'eau contaminée par la préparation BIO1020, sont considérés comme négligeables.

Effets sur les mammifères

En raison des conditions optimales de température pour la sporulation (25 à 30 °C), du fait que les mammifères ne sont pas des hôtes connus de ce microorganisme et qu'aucun effet n'a été observé alors que les mammifères sont naturellement exposés, les risques aigus et à long-terme liés à l'application de la préparation BIO1020 sont considérés comme négligeables pour les mammifères granivores exposés par voie directe (par ingestion de grains de riz) ou indirecte (par ingestion d'arthropodes contaminés).

En raison du mode d'application et du mode d'action, aucune étude de toxicité pour la reproduction n'a été demandée lors de l'évaluation communautaire. Dans le cas des usages revendiqués, ces données ne sont pas nécessaires et les risques peuvent être considérés comme faibles.

Les risques aigus, liés à la consommation d'eau contaminée par la préparation BIO1020, sont considérés comme négligeables.

Effets sur les organismes aquatiques

En raison du mode d'application par incorporation au sol, il n'est pas attendu d'exposition pour les organismes aquatiques. Les risques sont acceptables sans mesure de gestion du risque.

Effets sur les abeilles

En raison de la nature du produit et du mode d'application, l'exposition des abeilles au microorganisme *Metarhizium anisopliae* est faible et les risques pour les abeilles sont considérés comme négligeables.

Effets sur les arthropodes non-cibles autres que les abeilles

Du fait de mode d'application par incorporation dans le sol, seuls les insectes du sol peuvent être exposés. Aucun test sur les insectes vivant dans le sol n'a été réalisé alors que les spores de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52 sont nocives pour la plupart des espèces de coléoptères, de lépidoptères et de diptères.

Cependant, l'application se faisant dans le terreau et en application locale, les risques à long-terme sont considérés comme faibles pour les populations d'arthropodes du sol. Il est conseillé de mettre sur l'étiquette un avertissement sur le risque potentiel pour les arthropodes du sol.

Effets sur les vers de terre et autres macro-organismes du sol

Les études de toxicité montrent qu'à la dose appliquée sur le terrain, aucune mortalité ni effet subléthal n'a été observé. De plus, le fait que la lignée F52 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* soit très courante dans la nature sur les insectes du sol et du fait de son mécanisme d'action spécifique, des risques pour les vers de terre ne sont pas attendus.

Effets sur les microorganismes non-cibles du sol

Compte tenu du mode d'application, les risques pour les microorganismes sont considérés comme acceptables.

Effets sur d'autres organismes non-cibles (flore et faune) supposés être exposés à un risque

Du fait du mode d'application par incorporation dans le sol, il n'est pas attendu de risques pour les plantes non-cibles.

CONSIDERANT LES DONNEES BIOLOGIQUES

Les essais d'efficacité ont été évalués par les autorités néerlandaises. Les résultats de ces essais ont permis de démontrer que la préparation BIO1020 appliquée à la dose de 0,5 kg/m³ de sol est efficace contre les larves de l'otiorhynque. L'efficacité maximale est obtenue à des températures comprises entre 15 et 30°C. La vitalité et la capacité infectieuse des mycéliums diminuent en dessous de 15°C et au-dessus de 30°C.

Le dossier de comparabilité entre la France et les Pays-Bas, permet de conclure que les méthodes culturales et les conditions de cultures peuvent être considérées comme similaires pour ces deux pays. Par ailleurs, les cycles biologiques du ravageur et de *Metarhizium anisopliae* dans ces deux pays sont comparables. De ce fait, aucune perte d'efficacité de la préparation BIO1020 n'est attendue lors de son utilisation en France. De même, aucun risque de phytotoxicité, de résistance ou d'effet sur les cultures suivantes et limitrophes n'est attendu suite à l'utilisation de la préparation BIO1020.

En se fondant sur les critères d'acceptabilité du risque définis dans la directive 91/414/CEE, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

- A. L'étude de stabilité au stockage fournie (8 mois à 5°C) montre que la viabilité des spores est acceptable dans ces conditions. Cette étude étant incomplète, il conviendra de fournir en post-autorisation une nouvelle étude de stabilité au stockage donnant la teneur en *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* 5/F52, les informations sur le développement des microorganismes contaminants, la viabilité des spores, la distribution granulométrique, le pH, la teneur en poussière, les caractéristiques de friabilité et d'usure des granulés avant et après stockage dans l'emballage préconisé. Il conviendra également de s'assurer que les informations sur la viabilité des spores et les organismes contaminants sont en accord avec les spécifications.

Les risques sanitaires pour l'opérateur et le travailleur, liés à l'utilisation de la préparation BIO1020, sont considérés comme acceptables dans les conditions d'emploi précisées ci-dessous. Les risques sanitaires pour les personnes présentes sont considérés comme acceptables.

Les risques pour le consommateur sont considérés comme acceptables.

Les risques pour l'environnement et pour les organismes terrestres et aquatiques, liés à l'utilisation de la préparation BIO1020, sont considérés comme acceptables.

- B.** Le niveau d'efficacité et de sélectivité de la préparation BIO1020 pour les usages revendiqués est satisfaisant.

En conséquence, considérant l'ensemble des données disponibles, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet un **avis favorable** pour l'autorisation de mise sur le marché de la préparation BIO1020, pour les usages revendiqués annexe 1).

**Classification de la préparation BIO1020, phrases de risque et conseils de prudence :
Sans classification**

Il conviendra de mentionner sur l'étiquette de la préparation BIO1020 :

"Contient du *Metarhizium anisopliae*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation."

Conditions d'emploi

- Porter des gants, un vêtement de protection et un masque anti-poussière (masque avec filtre P3) lors de l'utilisation de la préparation.
- SP1 : Ne pas polluer l'eau avec le produit ou son emballage. [Ne pas nettoyer le matériel d'application près des eaux de surface. /Éviter la contamination via les systèmes d'évacuation des eaux à partir des cours de ferme ou des routes.].

Marc MORTUREUX

Mots-clés : Reconnaissance mutuelle, BIO1020, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* F52, insecticide, GR, PMUT.

Annexe 1

**Usages revendiqués et proposés pour une autorisation de mise sur le marché
dans le cadre de la procédure de reconnaissance mutuelle
de la préparation BIO1020**

Substances	Composition de la préparation	Dose de substances actives
Metarhizium anisopliae var. anisopliae F52	500 g/m ³ 9.10 ⁸ UFC/g	4,5.10 ¹¹ UFC/m ³

Usages	Doses	Nombres maximum d'application	Délai avant récolte
17402102* Cultures florales diverses* traitement du sol* otiorhynque	500-1500 g/m ³ ou 50-150 kg/ha (4,5.10 ¹¹ UFC/m ³)	2	2
14052103* Arbres et arbustes d'ornements* traitement du sol* otiorhynque		2	
Fraisier* traitement du sol* otiorhynque		2	
Framboisier* traitement du sol* otiorhynque		2	
Myrtilier* traitement du sol* otiorhynque		3	
Cassisier* traitement du sol* otiorhynque		3	
Groseillier* traitement du sol* otiorhynque		3	