

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 01/10/2015

Avis
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à la demande d'autorisation de mise sur le marché du produit biocide AQUABAC DF3000 à base de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* souche BMP144 (*Bti* –BMP144), destiné à la lutte contre les moustiques par les professionnels de la désinsectisation, de la société CERA SAS.

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a notamment pour mission l'évaluation des dossiers de produits biocides.

Les avis formulés par l'agence pour ces dossiers comprennent :

- *l'évaluation des risques que l'utilisation de ces produits peut présenter pour l'homme, l'animal ou l'environnement ;*
- *l'évaluation de leur efficacité ainsi que celle de leurs autres bénéfices éventuels ;*
- *une synthèse de ces évaluations assortie de recommandations portant notamment sur leurs conditions d'emploi.*

1. PRESENTATION DE LA DEMANDE ET CONDITIONS DE REALISATION DE L'EVALUATION

L'Anses a accusé réception d'un dossier déposé par la société CERA SAS concernant une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un produit à base de *Bacillus thuringiensis sous-espèce israelensis*, sérotype H14, souche BMP144 (*Bti*-BMP144), pour laquelle, conformément à l'article R.522-14 du code de l'environnement, l'avis de l'Anses relatif à l'évaluation des risques sanitaires et de l'efficacité du produit est requis.

Le présent avis porte sur le produit AQUABAC DF3000 à base de *Bti*, (substance active inscrite¹ à l'annexe I de la directive 98/8/CE²), destiné à la lutte contre les moustiques (type de produit 18). Les usages et doses d'emploi revendiqués sont mentionnés dans l'annexe 1.

Il est fondé sur l'examen du dossier déposé pour ce produit, en conformité avec les exigences du règlement (UE) n° 528/2012³.

¹ Directive 2011/78/UE de la Commission du 20 septembre 2011 modifiant la directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil aux fins de l'inscription de *Bacillus thuringiensis sous-espèce israelensis*, sérotype H14, souche AM65-52, en tant que substance active à l'annexe I de ladite directive.

² Directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides, transposée par l'ordonnance n° 2001-321 du 11 avril 2001.

³ Règlement (UE) N° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

Le produit est destiné à être appliqué, après dilution dans l'eau, par les professionnels de la désinsectisation dans des gîtes larvaires des moustiques par voie terrestre (pulvérisation avec pulvérisateur manuel) et voie aérienne.

L'expertise collective a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) » par l'Anses en collaboration avec les membres du Comité d'experts spécialisé « substances et produits biocides ».

2. SYNTHÈSE DE L'ÉVALUATION

Les données prises en compte sont celles qui ont été jugées valides, soit au niveau communautaire, soit par l'Anses. L'avis présente une synthèse des éléments scientifiques essentiels qui conduisent aux recommandations émises par l'Anses et n'a pas pour objet de retracer de façon exhaustive les travaux d'évaluation menés par l'Anses.

Les conclusions relatives à l'acceptabilité du risque dans cet avis se réfèrent aux critères indiqués dans l'annexe VI du règlement (UE) n° 528/2012. Elles sont formulées en termes d'« acceptable » ou « inacceptable » en référence à ces critères.

Après consultation du comité d'experts spécialisé " substances et produits biocides", réuni le 9 juillet 2015, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet l'avis suivant.

2.1. CONSIDÉRANT L'IDENTITÉ, LES CONDITIONNEMENTS ET L'APPLICATION DU PRODUIT BIOCIIDE

Le produit AQUABAC DF3000 est un insecticide sous forme de granulés dispersables brun clair contenant 43,0 % m/m (3000 ITU⁴/mg) de substance active technique microbienne. Le produit est destiné à être appliqué, après dilution dans l'eau, par les professionnels de la désinsectisation, dans des gîtes larvaires de moustiques par voies terrestre et aérienne.

Le produit AQUABAC DF3000 est conditionné dans un pot en PEHD⁵ (1,3 L) ou un fût en fibre (25 kg).

L'origine de la substance active microbienne *Bacillus thuringiensis israelensis* souche BMP144 entrant dans la composition du produit AQUABAC DF3000 a été jugée équivalente à la source de substance active ayant servi à l'inscription de celle-ci aux annexes I de la directive 98/8/CE, suite à l'évaluation de l'équivalence technique de la source utilisée dans le cadre de cette demande d'autorisation de mise sur le marché. Un dossier de compensation a par ailleurs été soumis en parallèle du dossier d'équivalence technique et a fait l'objet d'une évaluation de l'Anses.

Il conviendra néanmoins de certifier la bioactivité minimale et maximale du produit AQUABAC DF3000 en ITU/g, de certifier les teneurs minimale, maximale et nominale de *Bacillus thuringiensis israelensis* souche BMP144 dans le produit biocide AQUABAC DF3000 en CFU⁴/g, et de déterminer la bioactivité et les contaminants microbiens dans 5 lots de du produit AQUABAC DF3000 en utilisant des méthodes validées ou des méthodes standards internationales conformément au document OCDE 65 (2011).

La formulation du produit AQUABAC DF3000 est différente de celle du produit représentatif présenté dans le dossier d'inclusion de la substance active. Le pétitionnaire a fourni des études réalisées sur le produit AQUABAC DF3000.

⁴ International Toxicity Unit, définie par rapport à un organisme cible de référence. On notera qu'il n'y a pas de relation directe entre les deux unités (CFU (Colony forming Unit, unité formant une colonie) et ITU).

⁵ PEHD: Polyéthylène haute densité.

2.2. CONSIDERANT LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET LES METHODES D'ANALYSE DU PRODUIT BIOCIDÉ

Les propriétés physiques et chimiques du produit AQUABAC DF3000 ont été décrites, et les données disponibles permettent de conclure que le produit ne présente ni propriété explosive, ni propriété comburante. Le produit n'est ni inflammable, ni auto-inflammable à température ambiante. Le pH du produit AQUABAC DF3000 à 1 % dans l'eau est de 5,0 à température ambiante.

Les études montrent que la mousse formée lors de la dilution à la concentration maximale d'utilisation 10 %(m/v) reste dans les limites acceptables.

Les données fournies concernant la suspensibilité et la spontanéité de la dispersion sont en dehors des limites acceptables, il conviendra d'agiter énergiquement la préparation pendant l'application.

Les granules de la préparation sont mouillables et contiennent très peu de poussières.

Les résultats du test sur tamis humide et du test d'attrition étant en dehors des limites acceptables, il conviendra de démontrer que la préparation peut être appliquée sans obstruction de l'appareillage d'application.

Les caractéristiques techniques du produit permettent de s'assurer de la sécurité de son utilisation dans la gamme de concentrations de 1% m/v à 10 % m/v.

L'étude de stabilité au stockage du produit biocide AQUABAC DF3000 dans son emballage commercial à température ambiante débutée par le notifiant est en cours. Les résultats à 6 mois de l'étude de stabilité au stockage à température ambiante devront être soumis en post-autorisation, dans un délai de 6 mois. Dans cette attente, une durée de conservation de 6 mois à 25°C est proposée pour le produit AQUABAC DF3000. Cette étude devra inclure avant et après stockage la détermination de la bioactivité (avec une variation de la bioactivité n'excédant pas 10 % et une bioactivité en accord avec les valeurs certifiées pour le produit AQUABAC DF3000), la détermination des contaminants microbiens conformément au guide OECD 65 (oct. 2011)⁶ en utilisant des méthodes validées ou des méthodes standards internationales, la persistance de la mousse conformément au manuel FAO (2010) et au GIFAP n°17 (2009) et la stabilité de l'emballage commercial.

Le produit AQUABAC DF3000 est compatible avec l'emballage PEHD. Le matériau de l'emballage en fibre revendiqué doit être fourni en post-autorisation.

Aucune étude de stabilité à la lumière n'a été fournie. Il conviendra ainsi de stocker le produit AQUABAC DF3000 à l'abri de la lumière. Si le pétitionnaire souhaite lever cette préconisation, une demande de modification de conditions d'emploi devra être soumise.

Les méthodes d'identification et de caractérisation du micro-organisme sont conformes aux exigences réglementaires. Les méthodes de quantification du micro-organisme et des contaminants microbiologiques dans la préparation sont conformes aux exigences réglementaires. En l'absence de définition de résidus de *BTi-BMP144* dans les denrées d'origine végétale, les denrées d'origine animale et dans les différents milieux (sol, eau et air), aucune méthode d'analyse n'est nécessaire.

Conditions d'emploi et préconisations devant figurer sur l'étiquetage	Contexte / Remarque
Stocker à l'abri de la lumière.	Pas d'étude acceptable fournie.
La préparation diluée devra être appliquée sous agitation continue.	Résultats des études fournies en dehors des limites acceptables.

⁶ OCDE issue paper on microbial contaminant limits for microbial pest control products n°65 (oct. 2011).

2.3. CONSIDERANT L'EFFICACITE DU PRODUIT BIOCIDÉ

Bacillus thuringiensis sous espèce *israelensis*, sérotype H14, souche BMP144 (*Bti*-BMP144) est une bactérie Gram positive qui produit un cristal protéique toxique lors de sa sporulation. Ce cristal est composé principalement de quatre endotoxines en mélange (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1A). Une fois ingéré, le cristal se dissout dans l'intestin des larves et les toxines sont activées par les enzymes digestives de la larve. Elles provoquent alors une destruction de l'épithélium intestinal, suivie de la mort de la larve.

Les usages et les doses revendiqués par le pétitionnaire sont présentés en annexe 1.

Les études soumises permettant de démontrer l'efficacité du produit AQUABAC DF3000 en fonction des usages et des doses revendiqués sont décrites ci-dessous. Ces études ont été réalisées avec le produit AQUABAC DF3000 (43 % m/m de *Bti*-BMP144) :

- une étude de laboratoire selon une adaptation d'une méthode WHO⁷ avec le produit AQUABAC DF3000, sur les espèces *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* et *Anopheles gambiae* (stades larvaires L3 à début L4), appliqué dans de l'eau à la dose de 0,10 g/m², démontrant une efficacité de 100 %, 24 heures après le traitement et une efficacité résiduelle de 15 jours ;
- une étude de terrain (en France) selon une méthode interne avec le produit AQUABAC DF3000, appliqué par application terrestre manuelle (pulvérisateur à dos) sur l'espèce *Ochlerotatus (Aedes) caspius* (stade larvaire L2 uniquement), démontrant une efficacité de 98,1 % à la dose de 1,15 kg/ha, 24 heures après le traitement.

Une étude semi-terrain réalisée sur *Cx. quinquefasciatus* et *Oc. taeniorhynchus* a été jugée non recevable pour des raisons méthodologiques.

Le pétitionnaire a également soumis des données issues de la littérature. Cependant ces données ont été jugées non recevables puisque les produits testés différaient par leur composition, et/ou leur forme, et/ou leur mode d'application et/ou leur dose d'application. En effet, même dans le cas d'une formulation comparable et à une dose équivalente, on ne peut pas exclure des différences de procédé de fabrication qui impacteraient l'activité toxique des cristaux de *Bti* après application.

Les études présentées permettent de considérer que le produit AQUABAC DF3000 est efficace par application terrestre manuelle vis-à-vis des moustiques du genre *Aedes (Ochlerotatus)* (stade larvaire L1 à L4), à la dose minimale d'application de 1,15 kg/ha, alors que l'intervalle de doses revendiqué par le pétitionnaire est de 0,125 à 1 kg/ha. Néanmoins les conditions expérimentales (variabilité de la vitesse d'avancement du fait de la nature hétérogène du terrain) permettent de justifier une quantité épandue plus importante avec en conséquence une concentration de produit AQUABAC DF3000 supérieure à celle revendiquée (+15 %). Ainsi l'Anses considère que la dose maximale revendiquée de 1 kg/ha est acceptable. Toutefois, dans le mesure où un seul essai a été soumis, des données confirmatoires de terrain ou de semi-terrain (dans des conditions expérimentales proches de l'utilisation réelle du produit) sont attendues sur le genre *Aedes* dans un délai de deux ans suivant l'obtention de l'autorisation pour confirmer l'efficacité du produit à la dose de 1 kg/ha et en respectant les conditions d'emploi revendiquées (stades larvaires, mode d'application, etc.).

Aucune étude de terrain réalisée avec le produit AQUABAC DF3000 n'a été soumise pour soutenir l'efficacité de l'application aérienne sur le genre *Aedes*.

Aucune étude de terrain ou de semi-terrain réalisée avec le produit AQUABAC DF3000, en application terrestre et aérienne, n'a été soumise pour le genre *Culex*. Or, le guide technique TNsG TP18/19⁸ requiert des essais sur le genre *Culex* pour toute revendication d'efficacité contre les moustiques. Le pétitionnaire devra donc soumettre dans un délai de 6 mois suivant l'obtention de l'autorisation des essais de terrain ou de semi-terrain (dans des conditions expérimentales proches de l'utilisation réelle du produit) sur le genre *Culex* en respectant les conditions d'emploi revendiquées (doses, stades larvaires, modes d'application).

⁷ WHO: World Health Organization

⁸ TNsG *Technical Notes for Guidance* TP18/19, relatif à l'évaluation de l'efficacité des produits insecticides, acaricides, autres arthropodes et des produits répulsifs et attractants (25/07/2013).

De plus, le pétitionnaire n'a pas soumis de données de terrain ou de semi-terrain pour le genre *Anopheles*. L'efficacité du produit n'est donc pas prouvée sur cette espèce.

Enfin, les essais de terrain soumis ne permettent pas de valider les revendications d'efficacité résiduelle (jusqu'à 15 jours) et d'efficacité dans des milieux excessivement pollués par de la matière organique.

Les essais soumis permettent de valider un délai d'action de 24 heures pour le genre *Aedes*.

Les usages et les doses pour lesquels l'efficacité est considérée comme démontrée sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Organismes cibles	Doses et usages validés	Mode d'application	Délai d'action du produit biocide
Moustiques Genre : <i>Aedes (Ochlerotatus) spp</i> <i>Culex spp.</i> * Stades larvaires L1 à début L4	1 kg/ha** Eaux modérément polluées en matière organique	Application par épandage terrestre manuel (pulvérisateur). Le produit est dilué dans de l'eau avant l'application. Le volume d'eau varie en fonction du type d'équipement utilisé et de la surface à traiter.	A partir de 24 heures

*Sous réserve de la soumission d'essais de terrain ou de semi-terrain sur le genre *Culex* dans un délai de 6 mois après autorisation.

**Sous réserve de la soumission d'essais de terrain ou de semi-terrain sur le genre *Aedes* dans un délai de 2 ans après autorisation.

2.4. CONSIDERANT LA RESISTANCE A LA SUBSTANCE

L'état des connaissances sur la résistance des moustiques au *Bti* a été récemment revu par Tetreau (2012)⁹ et dans un rapport du Centre National d'Expertise sur les Vecteurs (CNEV, 2014)¹⁰.

Concernant *Bacillus thuringiensis* sous espèce *israelensis*, il a été fait état d'une résistance détectée dans une population naturelle de *Culex pipiens* de New York. Cependant aucune autre étude n'a confirmé cette résistance et les mécanismes n'ont pas été caractérisés. A ce jour, aucun autre cas de résistance n'a été trouvé en populations naturelles.

En laboratoire, des équipes de recherches ont sélectionné des souches de moustiques *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* et *Culex quinquefasciatus* en contact continu avec du *Bti* pendant 20 à 30 générations et n'ont obtenu que de faibles niveaux de résistance au *Bti* (entre 2 et 3 fois). Ces chercheurs ont observé une augmentation de la DL₅₀¹¹. Toutefois, cette résistance disparaît en quelques générations (3 à 4), lorsque les insectes ne sont plus exposés au *Bti* et en permettant la reproduction avec des individus provenant d'autres lignées. Cette perte rapide de résistance indique l'instabilité génétique de celle-ci.

L'absence de résistance des moustiques (et également des simules) malgré l'emploi massif et depuis plusieurs décennies du *Bti* est souvent expliquée par le fait que plusieurs toxines agissent en mélange, voire en synergie, la sélection de populations résistantes à plusieurs toxines étant moins probable qu'à une seule. En effet, des toxines Cry, même très proches, peuvent avoir des récepteurs membranaires différents, rendant difficile une résistance forte à une combinaison de ces toxines. De plus, la toxine Cyt est un élément clé du *Bti*, connue pour ralentir l'apparition de résistance aux toxines Cry.

⁹ Tetreau, 2012, Devenir du bioinsecticide *Bti* dans l'environnement et impact sur le développement de résistances chez le moustique. Thèse de doctorat de l'université de Grenoble. Spécialité Biodiversité, Écologie, Environnement,

¹⁰ CNEV. Utilisation des insecticides et gestion de la résistance, février 2014.

¹¹ DL₅₀ : la dose létale 50 est une valeur statistique de la dose d'une substance/préparation dont l'administration unique par voie orale provoque la mort de 50 % des animaux traités.

Enfin, le *Bti* présente une faible activité résiduelle (quelques jours). Cependant, on retrouve des spores de *Bti*, pendant plusieurs semaines à plusieurs mois après un traitement. La bactérie étant qualifiée de peu compétitive par rapport aux autres bactéries du sol, le recyclage du *Bti* était considéré comme peu probable.

Néanmoins, un nombre grandissant de travaux montrent qu'une activité résiduelle du *Bti* peut être trouvée dans certaines conditions et que cette activité pourrait même, dans certains cas, être la conséquence d'un recyclage des spores de *Bti*, c'est-à-dire la germination et la multiplication de la bactérie. Cela a été le cas en région Rhône-Alpes (France), où des litières végétales en décomposition, prélevées plusieurs mois après un traitement insecticide, ont montré une forte activité insecticide contre les larves de moustiques. Cette toxicité est principalement due à la présence de *Bti*, mise en évidence par des étalements bactériens et par la présence de gènes codants pour les toxines du *Bti*.

Une souche de moustiques de laboratoire *Aedes aegypti* sélectionnée pendant plusieurs générations avec cette « litière toxique » a permis d'obtenir une résistance modérée au *Bti* mais bien plus élevée aux toxines Cry considérées séparément. Cette souche est la preuve que le *Bti* peut, sous une forme persistante environnementale, entraîner un phénomène de résistance au *Bti*.

Ainsi, bien qu'aucun phénomène de résistance n'ait été observé sur les populations naturelles à ce jour, les études de laboratoire montrent que l'exposition au *Bti* peut, dans certaines conditions, entraîner une résistance au *Bti* chez le moustique. La compréhension des mécanismes d'activité résiduelle / recyclage du *Bti* ainsi que la manière dont les moustiques résistent est à suivre.

Conditions d'emploi et préconisations devant figurer sur l'étiquetage	Contexte / Remarque
Toujours lire l'étiquette ou la notice avant utilisation, et respecter toutes les instructions qui y sont indiquées.	Recommandations générales destinées aux professionnels de la désinsectisation.
Adopter des méthodes de gestion intégrée telle que la combinaison de méthodes de lutte chimique, physique et autres mesures d'hygiène publique, en tenant compte des spécificités locales (conditions climatiques, espèces cibles, conditions d'usage, etc).	
L'équipement utilisé pour les traitements doit être adapté, correctement entretenu et calibré.	
Tenir compte du cycle de vie et des caractéristiques des insectes cibles pour adapter les traitements. En particulier, cibler le stade de développement le plus sensible de l'organisme cible, le moment des applications et les zones à traiter.	
Informers le détenteur de l'autorisation de mise sur le marché en cas d'inefficacité d'un traitement.	
Avant le traitement, déterminer précisément [les zones à traiter/les routes à suivre] (sur une carte ou un plan).	
Pour optimiser l'efficacité du traitement, ne pas appliquer par temps de pluie (prévue pour les 24 heures à venir) ou de vent (supérieur à 15 km/h).	
Ne pas utiliser dans des eaux contenant des niveaux excessifs de matières organiques.	
Ne pas pulvériser dans les endroits où les courants d'air sont montants, où lors d'inversion de température qui empêchent le nuage pulvérisé de se redéposer dans la zone traitée.	

2.5. CONSIDERANT LES PROPRIETES TOXICOLOGIQUES

Aucune étude n'a été réalisée avec le produit AQUABAC DF3000. Les études réalisées sur le microorganisme technique approuvé *Bacillus thuringiensis israelensis* souche AM65-52 donnent les résultats suivants :

- DL₅₀ par voie orale chez le rat, supérieure à 5 000 mg/kg de poids corporel ;
- DL₅₀ par voie cutanée chez le rat, supérieure à 5 000 mg/kg de poids corporel ;

- CL₅₀¹² par inhalation chez le rat, supérieure à 2,84 mg/L (concentration maximale atteignable) ;
- Non irritant pour la peau chez le lapin ;
- Non irritant pour les yeux chez le lapin ;
- Non sensibilisant cutané chez le cobaye (tests Buehler et Magnusson & Kligman). Il est à noter que les études permettant d'évaluer le potentiel sensibilisant d'un produit n'étant pas adaptées à l'analyse des microorganismes.

Le produit AQUABAC DF3000 contient le coformulant Sodium Dibutyl-naphtalène sulfonate, classé H332, H302, H319, H335 selon le règlement 1272/2008/CE, entraînant des dangers supplémentaires.

Au regard des résultats expérimentaux sur le microorganisme technique, de la teneur en co-formulants et selon les règles de classification, le produit est classé Irritant oculaire. Cat 2 H319 selon le règlement 1272/2008/CE. Par ailleurs, les microorganismes doivent être considérés comme des sensibilisants potentiels. Il conviendra donc de mentionner sur l'étiquette "*Contient du Bacillus thuringiensis israelensis. Peut provoquer des réactions de sensibilisation.*"

Aucune étude d'absorption n'est nécessaire pour les micro-organismes.

L'espèce *Bacillus thuringiensis israelensis* n'est pas inscrite à l'annexe III de la 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.

Au regard de l'absence d'infectiosité et de pathogénicité du microorganisme, la fixation de valeurs toxicologiques de référence n'est pas nécessaire.

2.6. CONSIDERANT LES DONNEES RELATIVES A L'EXPOSITION DES UTILISATEURS

Etant donné l'absence de valeurs toxicologiques de référence, aucune estimation quantitative de l'exposition n'est requise.

Le produit AQUABAC DF3000 est un produit sous forme de granulés solubles pour lutter contre les moustiques. Il est utilisé uniquement par des professionnels sur des surfaces d'eau par épandage aérien (hélicoptère) et épandage terrestre manuel (pulvérisateur).

Les voies d'exposition potentielles sont la voie cutanée, l'ingestion et l'inhalation. Considérant que le micro-organisme ne traverse pas la barrière cutanée non lésée, l'exposition systémique par voie cutanée est jugée non pertinente. L'ingestion du produit, secondaire à l'inhalation, est considérée négligeable. Par conséquent, l'exposition au produit se fait de façon majoritaire par inhalation.

Pour l'application terrestre à l'aide d'un pulvérisateur portable, le professionnel peut être exposé pendant la phase de mélange / chargement et pendant l'application.

Pour l'application aérienne, l'exposition pendant l'application peut être considérée négligeable si l'appareil est muni d'une cabine fermée.

Les micro-organismes étant considérés comme potentiellement sensibilisants, il est recommandé d'utiliser les équipements de protection individuelle suivants pendant toutes les phases exposantes :

- gants accordant une protection conforme à la norme NF EN 374¹³ parties 1, 2 et 3 contre le produit et la substance active qu'il contient ;

¹² CL₅₀ (concentration létale) est une valeur statistique de la concentration d'une substance/préparation dont l'administration unique provoque la mort de 50 % des animaux traités.

¹³ NF EN 374-1 Avril 2004 - Gants de protection contre les produits chimiques et les micro-organismes - Partie 1 : terminologie et exigences de performance

NF EN 374-2 Avril 2004 - Gants de protection contre les produits chimiques et les micro-organismes - Partie 2 : détermination de la résistance à la pénétration

NF EN 374-3 Avril 2004 - Gants de protection contre les produits chimiques et les micro-organismes - Partie 3 : détermination de la résistance à la perméation des produits chimiques

- combinaison de protection catégorie III de type 4 (étanche aux pulvérisations) ;
- lunettes de protection ;
- masque respiratoire de type EN FFP3.

Dans ces conditions, l'exposition des professionnels peut être considérée comme négligeable. De plus, le microorganisme n'est ni toxique, ni infectieux ni pathogène chez les mammifères, il n'est donc pas attendu de risque inacceptable pour les professionnels.

Enfin, *Bacillus thuringiensis* pouvant être responsable d'infections opportunistes, le produit AQUABAC DF3000 ne devrait pas être utilisé par des personnes fortement immunodéprimées ou sous traitement immunosupresseur.

2.7. CONSIDERANT LES DONNEES RELATIVES A L'EXPOSITION SECONDAIRE

En règle générale, il est recommandé de mettre en place une zone non accessible à la population générale lors du traitement et ce jusqu'à ce que la pulvérisation soit finie afin d'éviter l'exposition des passants.

Afin de limiter l'exposition des résidents lors de l'application par épandage, l'Anses recommande une distance minimale de sécurité de 50 mètres vis-à-vis des zones traitées, comme préconisée lors de dérogation pour les traitements phytopharmaceutiques par voie aérienne et conformément à l'arrêté du 15 septembre 2014 relatif aux conditions d'épandage par voie aérienne des produits mentionnés à l'article L. 253-8 du code rural et de la pêche maritime.

Ainsi, une autre méthode d'application devra être envisagée dans les zones proches des habitations.

Dans le cas où un travailleur entrerait après épandage sur une zone traitée, il est recommandé qu'il porte une combinaison et des gants de protection. Dans ces conditions, les risques sanitaires pour les travailleurs sont considérés comme acceptables.

2.8. CONSIDERANT LES DONNEES RELATIVES AUX RESIDUS DANS LES ALIMENTS

Le produit AQUABAC DF3000 est destiné à l'usage professionnel dans les habitats naturels des larves de moustiques, incluant, d'après les usages revendiqués les rizières et les eaux stagnantes des champs de cultures (alfalfa, amandiers, asperges, maïs, coton, dattiers, vignes, pêchers, noyers).

L'utilisation de ce produit dans les eaux d'irrigation des cultures peut conduire à une exposition indirecte du consommateur aux résidus de *Bacillus thuringiensis israelensis* via les denrées alimentaires. L'utilisation de *Bti* dans les rizières est revendiqué uniquement en présence d'eau et donc bien avant la récolte. Par ailleurs, le riz lorsqu'il est récolté est appelé riz paddy, protégé par une enveloppe qui est enlevée lors d'une étape de décorticage afin de le rendre comestible. Compte-tenu de ces considérations et avec un délai avant récolte d'un mois, l'usage du produit AQUABAC DF3000 dans les rizières est considéré comme acceptable.

Concernant les eaux d'irrigation des cultures à l'exception du riz, il n'est pas possible de prévoir leur devenir après traitement. Le délai entre l'application du *Bti* et l'irrigation des cultures peut être variable et ces eaux peuvent servir à des applications au sol (légumes racines par exemple), et à des applications foliaires que ce soit par aspersion et brumisation (maïs, légumes fruits). Toutes les cultures peuvent donc être concernées et à tout stade de développement (présence ou non des parties consommables). Par conséquent, le produit ne doit pas être appliqué lorsque les eaux d'irrigation sont destinées à des cultures alimentaires.

Par ailleurs, concernant l'utilisation dans l'eau stagnante des champs, aucune information n'ayant été soumise par le notifiant, il est impossible d'exclure une éventuelle contamination des denrées à la récolte. Par conséquent, le produit ne doit pas être appliqué dans les eaux stagnantes lorsque les parties consommables des plantes sont présentes.

Lors de l'utilisation du produit AQUABAC DF3000, il est donc nécessaire de suivre les instructions d'utilisation présentées dans le tableau ci-dessous :

Conditions d'emploi et préconisations devant figurer sur l'étiquetage	Contexte / Remarque
Porter des gants de protection (accordant une protection conforme à la norme NF EN 374 parties 1, 2 et 3 contre le produit et la substance active qu'il contient), une combinaison de protection catégorie III de type 4 (étanche aux pulvérisations), des lunettes de protection et un masque respiratoire EN FFP3 pendant toutes les phases exposantes.	Indispensable pour protéger la santé des utilisateurs.
Ne pas utiliser par des personnes fortement immunodéprimées ou sous traitement immunosuppresseur.	Indispensable pour protéger la santé des utilisateurs.
Pour les travailleurs entrant après épandage sur une zone traitée, porter une combinaison de travail et des gants de protection.	Indispensable pour protéger la santé des travailleurs.
Mettre en place une zone non accessible à la population générale pendant le traitement.	Indispensable pour limiter l'exposition des passants.
Respecter une distance minimale de sécurité de 50 mètres vis-à-vis des zones traitées par épandage aérien.	Indispensable pour limiter l'exposition des résidents.
Ne pas utiliser dans les eaux d'irrigation des cultures à l'exception des rizières, pour lesquelles un délai avant récolte de 1 mois doit être respecté.	Indispensable pour limiter la contamination des aliments.
Ne pas appliquer dans les eaux stagnantes des champs lorsque les parties consommables des plantes sont présentes.	Indispensable pour limiter la contamination des aliments.

2.9. CONSIDERANT LE DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT

Aucune étude du devenir dans l'environnement du produit n'a été fournie par le pétitionnaire. Considérant que la substance active *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Serotype H14 souche BMP144 (*Bti*-BMP144) est techniquement équivalente à la substance active *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Serotype H14 souche AM65-52 (*Bti*-AM65-52), l'évaluation des risques pour l'environnement a été réalisée sur la base des données générées dans le cadre de l'examen communautaire de la substance active *Bti*-AM65-52, ce qui est conforme aux exigences du règlement (UE) n°528/2012 étant donné qu'aucune autre substance préoccupante pour l'environnement n'est utilisée dans le produit AQUABAC DF3000.

Les *Bacillus thuringiensis* sont présents naturellement dans les sols avec une densité variant de 2×10^5 à 5×10^7 CFU/kg de sol. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* représenterait 20 % de cette densité. Des données de laboratoires montrent que *Bacillus thuringiensis* se développe essentiellement sur milieu riche en nutriment ou préalablement stérilisé, indiquant que cette espèce de bactérie est peu compétitrice.

Plusieurs études de suivi dans l'eau et les sols ont permis de déterminer des demi-vies pour les spores et la toxine dans ces compartiments. Les demi-vies dans l'eau des spores et de la toxine sont de respectivement 50 et 14 jours. Pour le compartiment terrestre, des lectures croisées avec *Bacillus thuringiensis* *kurstaki* (*Btk*) et *Bacillus thuringiensis* *aizawai* ont permis de définir des demi-vies dans le sol des spores et de la toxine de respectivement 120 et 5,2 jours. Des données de la littérature montrent également que les spores de *Bti* sont rapidement détruites par le rayonnement solaire. Des résultats similaires ont été obtenus avec les spores et les toxines de *Btk*, indiquant la dégradation rapide de ces espèces lorsqu'elles sont soumises aux rayonnements solaires.

L'adsorption importante et la faible mobilité des spores et des toxines de *Bacillus thuringiensis* ont été reportées dans la littérature. En l'absence de données expérimentales obtenues selon les lignes directrices habituelles, une valeur par défaut de K_{oc}^{14} de 1000 L/kg a été statuée au niveau communautaire.

Les critères de persistance, bioaccumulation et toxicité ne sont pas adaptés aux micro-organismes.

¹⁴ K_{oc} : Coefficient de partition carbone organique-eau

2.10. CONSIDERANT LES DONNEES D'ECOTOXICITE

Les effets écotoxicologiques du produit biocide AQUABAC DF3000 ont été extrapolés à partir des données des études conduites avec la substance active dans le cadre de son examen communautaire, ce qui est conforme aux exigences du règlement (UE) n°528/2012 étant donné qu'aucune autre substance préoccupante pour ses propriétés d'écotoxicité n'est utilisée dans le produit. La substance active étant un micro-organisme, les données de toxicités sont exprimées en mg/L mais aussi en CFU/L, unité qui permet de quantifier la densité des microorganismes dans les tests. Cependant, la toxicité de la bactérie émane d'une toxine qui n'a pas fait l'objet d'une évaluation de risque. La toxicité de la bactérie peut être indirectement évaluée par l'expression des données en ITU¹⁵/L. Bien que cette unité soit essentiellement utilisée pour évaluer l'efficacité de la substance active, cette unité apparaît comme un bon indicateur de toxicité de la toxine dans l'environnement. On notera d'une part qu'il n'y a pas de relation directe entre les deux unités (CFU et ITU) et que, d'autre part, l'évaluation au niveau européen de la substance active était essentiellement basée sur la densité microbienne (CFU).

Les PNEC¹⁶_{eau de surface} et PNED¹⁷_{eau de surface} du *Bti*-AM65-52 sont dérivées de la plus faible valeur de NOEC¹⁸ issue d'une étude de toxicité sur les daphnies et affectées d'un facteur de sécurité de 10. Elles sont égales à 0,05 mg/L, correspondant à $3,3 \times 10^2$ ITU/L (PNEC) et 1×10^7 CFU/L (PNED).

Ni le dossier européen, ni le dossier AQUABAC DF3000 ne comportent d'étude de toxicité de la substance active sur les micro-organismes de la station d'épuration. Cependant, une étude sur *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus* et *Staphylococcus faecalis* *S. aureus* n'a montré aucun effet délétère de la toxine de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* sur ces bactéries. De plus, les toxines de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ont été testées sur une variété de bactérie Gram-positif et n'ont montré aucun effet antibiotique. Enfin, l'espèce *Bacillus thuringiensis* a été identifiée dans des boues de station d'épuration. En conséquence, aucune PNEC_{STP microorganismes} n'a été déterminée.

Aucune donnée de toxicité sur organismes du sédiment n'est disponible dans le dossier européen ou le dossier AQUABAC DF3000. Les données de la littérature montrent des résultats contradictoires sur la toxicité de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* sur des prédateurs des organismes cibles.

Les PNEC_{sol} et PNED_{sol} du *Bti*-AM65-52 sont dérivées de l'EC₅₀¹⁹ issue d'une étude de toxicité sur vers de terre et affectée d'un facteur de sécurité de 1000. Elles sont égales à 1 mg/kg, correspondant à 8×10^3 ITU/kg et $4,8 \times 10^7$ CFU/kg respectivement pour la PNEC et la PNED.

Les PNEC_{orale} pour les oiseaux et les mammifères n'ont pas été dérivées compte tenu du mode d'action très spécifique de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. De plus, des tests sur canard et colin de virginie ne montrent pas d'effet lorsque les oiseaux sont exposés à une dose journalière de 3077 mg/kg (correspondant à $6,2 \times 10^{11}$ CFU/kg et $2,03 \times 10^7$ ITU/kg).

Concernant la toxicité de *Bti*-AM65-52 sur les abeilles, la DL₅₀ orale est supérieure à 124 µg/j/abeille (correspondant à $2,5 \times 10^7$ CFU/j/abeille et $8,2 \times 10^2$ ITU/j/abeille) et la DL₅₀ contact est supérieure à 100 µg/j/abeille (correspondant à $1,8 \times 10^6$ CFU/j/abeille et $3,0 \times 10^2$ ITU/j/abeille).

Au regard des propriétés de la substance active, de la teneur en co-formulants et selon les règles de classification du règlement (UE) n°1272/2008, le produit AQUABAC DF3000 ne nécessite aucune classification pour l'environnement.

2.11. CONSIDERANT L'IMPACT ENVIRONNEMENTAL

Etant donné qu'aucune autre substance préoccupante pour l'environnement n'est utilisée dans le produit biocide AQUABAC DF3000, il a été considéré que l'évaluation du risque pour la substance active *Bti*-AM65-52 couvrirait l'évaluation du produit, conformément aux exigences du règlement (UE) n°528/2012. Les données relatives au devenir et au comportement dans l'environnement utilisées dans l'évaluation des risques concernent donc la substance active uniquement.

¹⁵ International Toxicity Unit, définie par rapport à un organisme cible de référence.

¹⁶ PNEC : Predictive No Effect Concentration (concentration prévisible sans effet) exprimée en mg/L ou mg/kg, ou en ITU/L ou ITU/kg.

¹⁷ PNED : Predictive No Effect Density (densité prévisible sans effet), exprimée en CFU/L ou CFU/kg.

¹⁸ NOEC: No observed effect concentration.

¹⁹ EC₅₀: median effective concentration.

L'estimation de l'exposition environnementale consécutive à l'utilisation du produit AQUABAC DF3000 a été réalisée avec une approche par taux de consommation et en adaptant les approches développées pour les produits phytosanitaires (FOCUS, 2006)²⁰.

L'exposition de l'environnement a été évaluée en déterminant des densités prédites (EED²¹, CFU/L ou CFU/kg) et des unités de toxicité estimées (PEC²², ITU/L ou ITU/kg).

Le produit AQUABAC DF3000 est appliqué par des professionnels sur des plans d'eaux stagnantes. Des applications espacées d'au minimum 5 jours sont préconisées, avec des concentrations entre 0,125 et 1 kg de produit AQUABAC DF3000 par hectare. Le pétitionnaire n'ayant pas revendiqué de nombre d'application maximum, l'évaluation s'est faite sur la base du nombre maximum d'application utilisée dans le cadre de l'évaluation du risque pour la substance active dans le cadre de son examen communautaire, soit 8 applications. Le produit AQUABAC DF3000 peut être appliqué par application terrestre ou aérienne.

Pour le compartiment aquatique, un scénario d'émission dans une eau stagnante peu profonde (30 cm) a été considéré comme pire cas comparé aux eaux stagnantes de plus grand volume où la dilution est plus importante. Le scénario d'exposition prend en compte à la fois la dissipation de la substance entre deux applications et l'adsorption à la phase sédimentaire du plan d'eau. Le mode d'application (terrestre ou aérien) n'a aucune incidence sur l'exposition du compartiment aquatique.

Pour le compartiment terrestre une dérive de 22,24 % a été prise en compte dans le cas d'application terrestre. Ce taux de dérive est issu d'une publication (Rautmann *et al.*, 1999²³) sur laquelle se basent les guides techniques d'application de produits phytosanitaires. La valeur choisie est la valeur pire cas retenue pour 8 applications en arboriculture. Aucun facteur d'interception par la végétation n'a été pris en compte.

Pour l'application aérienne, une dérive de 100 % sur le sol a été prise en compte en absence de valeurs de référence pour cette application. Les densités et unités de toxicité prédites dans le sol ont ensuite été déterminées considérant une profondeur de sol de 5 cm et une dissipation des spores et des toxines entre 2 applications.

Les ratios PEC/PNEC consécutifs à 1 à 8 applications, espacées chacune de 5 jours, de 0,125 et 1 kg de produit AQUABAC DF3000 /ha, sur les plans d'eau pour les différents compartiments pertinents d'expositions sont reportés dans le tableau suivant :

Nombre d'application	Densité		Unité de Toxicité	
	Eaux de surface: applications terrestre et aérienne			
	EED (CFU/L)	EED/PNEC	PEC (ITU/L)	PEC/PNEC
0,125 kg de AQUABAC DF3000 /ha				
1	1,93x10 ⁵	1,93x10 ⁻²	9,26	2,81x10 ⁻²
8	1,23x10 ⁶	0,12	3,64x10 ¹	0,11
1 kg de AQUABAC DF3000 /ha				
1	1,55x10 ⁶	0,155	7,41x10 ¹	0,22
8	9,82x10 ⁶	0,98	2,91x10 ²	0,88
Sol: application terrestre (22,24% de dérive)				
	EED (CFU/kg dwt)	EED/PNEC	PEC (ITU/kg dwt)	PEC/PNEC
0,125 kg de AQUABAC DF3000 /ha				
1	2,32x10 ⁶	4,83x10 ⁻²	1,11x10 ²	1,39x10 ⁻²
8	1,68x10 ⁷	0,35	2,27x10 ²	2,84x10 ⁻²

²⁰ FOCUS (2006) "Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration" Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version 2.0, 434 pp

²¹ EED : Expected Environmental Density (densité prévisible dans l'environnement)

²² PEC : Predicted Environmental Concentration (concentration prévisible dans l'environnement)

²³ Rautmann D., Streloke M., Winkler R., 1999. New basic drift values in the authorization procedure for plant protection products. Workshop on risk assessment and risk mitigation measures (WORMM), 27-29 September 1999.

Nombre d'application	Densité		Unité de Toxicité	
1 kg de AQUABAC DF3000 /ha				
1	1,86x10 ⁷	0,39	8,90x10 ²	0,11
2	3,66x10 ⁷	0,76	1,35x10 ³	0,17
3	5,41x10 ⁷	1,13	1,58x10 ³	0,20
8	1,35x10 ⁸	2,80	1,82x10 ³	0,23
Sol: application aérienne (100% de dérive)				
	EED (CFU/kg dwt)	EED/PNEC	PEC (ITU/kg dwt)	PEC/PNEC
0,125 kg de AQUABAC DF3000 /ha				
1	1,04x10 ⁷	0,22	5,00x10 ²	6,25x10 ⁻²
2	2,06x10 ⁷	0,43	7,57x10 ²	9,46x10 ⁻²
3	3,04x10 ⁷	0,63	8,89x10 ²	0,11
4	4,00x10 ⁷	0,83	9,56x10 ²	0,12
5	4,93x10 ⁷	1,03	9,91x10 ²	0,12
8	7,56x10 ⁷	1,58	1,02x10 ³	0,13
1 kg de AQUABAC DF3000 /ha				
1	8,35x10 ⁷	1,74	4,00x10 ³	0,50
2	1,65x10 ⁸	3,43	6,05x10 ³	0,76
3	2,43x10 ⁸	5,07	7,11x10 ³	0,89
4	3,20x10 ⁸	6,66	7,65x10 ³	0,96
5	3,94x10 ⁸	8,21	7,93x10 ³	0,99
6	4,66x10 ⁸	9,72	8,07x10 ³	1,01

L'Anses considère les résultats exprimés en unités toxicologiques internationales pertinents pour l'évaluation du risque environnemental, sachant que l'activité biocide du *Bti* est imputable aux toxines, et que la quantité de toxine (exprimée en ITU) n'est pas directement proportionnelle à la densité (exprimée en CFU). Ainsi, sur la base des unités toxicologiques internationales :

- les applications terrestres conduisent à des risques acceptables pour le compartiment aquatique et le sol pour toutes les doses revendiquées et pour 8 applications à la dose jusqu'à 1 kg/ha, espacées de minimum 5 jours ;
- les applications aériennes conduisent à des risques acceptables pour le compartiment aquatique pour toutes les doses revendiquées et pour 8 applications espacées de minimum 5 jours et pour le sol en prenant en compte au maximum 5 applications espacées de 5 jours à la dose maximale de 1 kg /ha ou 8 applications à la dose minimale de 0,125 kg /ha.

Les conclusions de l'évaluation conduite lors de l'approbation de la substance active étant basées sur les résultats exprimés en densité bactérienne, les conclusions de l'évaluation du produit AQUABAC DF3000 se basent également sur les résultats exprimés en densité bactérienne, par souci d'harmonisation avec l'évaluation communautaire. Ainsi, sur la base de la densité bactérienne :

- les applications terrestres conduisent à des risques :
 - acceptables pour le compartiment aquatique et le sol en prenant en compte 8 applications espacées chacune de 5 jours à la dose de 0,125 kg/ha ;
 - acceptables pour le compartiment aquatique en prenant en compte 8 applications espacées chacune de 5 jours et pour le sol en prenant au maximum 2 applications espacées chacune de 5 jours à la dose de 1 kg/ha.
- les applications aériennes conduisent à des risques :
 - acceptables pour le compartiment aquatique en prenant en compte 8 applications espacées chacune de 5 jours et pour le sol en prenant au maximum 4 applications espacées chacune de 5 jours à la dose de 0,125 kg/ha ;
 - acceptables pour le compartiment aquatique en prenant en compte 8 applications espacées chacune de 5 jours et inacceptables pour le compartiment aquatique et le sol en prenant en compte une seule application à la dose de 1 kg/ha.

Pour les applications aériennes de produits phytopharmaceutiques, l'instauration de zones non traitées peut être préconisée pour réduire la dérive sur les surfaces non visées par le traitement. Ainsi, par exemple, le document guide « FOCUS Surface Water Scenarios in the EU Evaluation Process under 91/414/EEC » propose, une dérive de 27,3 % à 5 mètres dans le cas d'applications aériennes en rizière. Cette mesure de réduction des risques ne semble cependant pas appropriée dans le cas de la lutte anti-moustiques. En effet, la plupart des zones traitées par applications aériennes sont de larges plans d'eau, comme des lacs, des marécages ou des rizières, et laisser une zone non traitée en bordure pourrait réduire de manière importante l'efficacité du traitement.

Il faut néanmoins se rappeler que la $PNED_{sol}$ est dérivée d'une étude de toxicité aiguë sur vers de terre, qui ne montre aucun effet délétère à la concentration maximale testée. En absence de données sur micro-organismes du sol ou sur plantes terrestres, un facteur de sécurité de 1000 a été appliqué à la CL_{50}^{24} issue de cette étude. Cette $PNED$ pour le compartiment terrestre apparaît comme très conservatrice. En effet, des données de la littérature montrent que la toxine de *Bti* n'a aucun effet néfaste sur des microorganismes du sol. De plus, la substance active *Bti* AM65-52 est considérée comme non toxique pour les plantes, qui ne disposent ni de mécanismes d'absorption de la bactérie, ni d'enzymes digestives spécifiques permettant la libération des endotoxines. Enfin, la valeur de la $PNED$ pour le compartiment terrestre ($4,8 \times 10^7$ CFU/kg de sol) est du même ordre de grandeur que la densité naturelle de *Bacillus thuringiensis* dans les sols (2×10^5 to 5×10^7 CFU/kg (P.A.W. Martin, 1991)).

En conséquence, pour les applications terrestres et aériennes répétées et effectuées sur de larges étendues, l'évaluation quantitative du risque pour le compartiment terrestre apparaît comme surestimée. En l'absence d'informations complémentaires sur la dérive, l'interception de la végétation, la toxicité réelle du *Bti* sur les organismes terrestres, il n'est pas possible de préciser l'estimation du ratio PEC/PNEC. De plus, étant donné le mode d'action spécifique de la substance, il apparaît plus pertinent d'évaluer les effets de ces applications sur la diversité biologique, plus particulièrement sur les espèces proches des espèces cibles, comme par exemple les insectes appartenant au sous-ordre des Nématocères (ordre des Diptères), et aux espèces appartenant aux mêmes réseaux trophiques que les espèces cibles, en incluant les espèces terrestres.

L'Anses recommande donc qu'un suivi de la biodiversité incluant les chaînes trophiques terrestres de ces sites soit mis en place sur les zones de large étendue traitées par applications terrestre à partir de 3 applications espacées de 5 jours à la dose 1 kg/ha, et sur les zones de large étendue traitées par applications aériennes à partir de 5 applications espacées de 5 jours à la dose maximale de 0,125 kg/ha.

La dilution et l'adsorption étant plus importantes dans les stations d'épuration que dans un plan d'eau de 30 cm, il a été considéré que l'évaluation de l'exposition de ce compartiment est couverte par l'évaluation de l'exposition des eaux de surface. En raison de l'absence de données de toxicité obtenues selon les lignes directrices usuelles, une évaluation de risque quantitative n'a pas pu être effectuée pour les micro-organismes de la station d'épuration. Cependant, compte tenu des données de toxicité disponibles, il n'est pas attendu que l'application du produit AQUABAC DF3000 aura un impact négatif sur les micro-organismes de station d'épuration.

Une estimation de l'exposition du compartiment sédimentaire a été réalisée en tenant compte du Koc défini précédemment et indique des valeurs de EED et PEC jusqu'à $4,91 \cdot 10^8$ CFU/kg et $1,46 \cdot 10^4$ ITU/kg pour 8 applications de 1 kg / ha de produit AQUABAC DF3000, espacées chacune de 5 jours. En absence de données de toxicité, aucune évaluation de risque quantitative n'a pu être effectuée pour ce compartiment lors de l'évaluation européenne. Par ailleurs, des données contradictoires concernant les effets délétères chez des prédateurs des organismes cibles étant identifiées dans la littérature, l'Anses recommande qu'un suivi de la biodiversité des milieux aquatiques incluant les chaînes trophiques soit mis en place sur des sites traités sur de longues périodes et sur de grandes étendues.

L'évaluation des risques pour le compartiment aérien n'est pas considérée comme pertinente compte tenu de la sensibilité de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* aux rayonnements solaires.

L'évaluation des risques pour les eaux souterraines n'est pas considérée comme pertinente compte tenu de la faible mobilité des spores et des toxines de *Bacillus thuringiensis*.

²⁴ CL50 : concentration entraînant 50 % de mortalité.

Enfin, l'évaluation des risques pour oiseaux, mammifères et abeille n'est pas considérée comme pertinente compte tenu de la spécificité du mode d'action de la substance active, impliquant un pH alcalin dans le tube digestif de l'organisme cible, l'action d'enzymes spécifiques pour activer la toxine, et des récepteurs membranaires spécifiques qui vont interagir avec la toxine activée.

Lors de l'utilisation du produit AQUABAC DF3000, il est donc nécessaire de suivre les instructions d'utilisation présentées dans le tableau ci-dessous.

Conditions d'emploi et préconisations devant figurer sur l'étiquetage	Contexte / Remarque :
Pour les applications aériennes ne pas dépasser la dose de 0,125 kg/ha.	Indispensable pour la protection de l'environnement.
Appliquer par voie aérienne uniquement lorsque l'application par voie terrestre n'est pas possible et uniquement pour des surfaces traitées supérieures à 0,5 ha.	
La personne responsable du contrôle doit s'assurer que l'équipement d'application est adapté à l'aéronef choisi, qu'il soit calibré proprement, que la dérive due au vent soit minimale sur le site traité, afin de garantir la bonne dose d'application et limiter l'exposition du sol.	
L'aéronef doit être équipé d'un GPS professionnel permettant une application précise de l'AQUABAC DF3000 quand elle est nécessaire.	
L'étiquette du produit doit informer l'utilisateur de la nécessité de consulter les autorités locales et de respecter les conditions requises avant l'utilisation du AQUABAC DF3000 en milieu naturel.	
Des autorisations spécifiques sont requises pour l'application de AQUABAC DF3000 dans les zones couvertes par le réseau Natura 2000, les zones protégées ou les réserves naturelles.	
L'utilisateur doit enregistrer toutes les informations concernant les applications, en indiquant les zones traitées et les doses appliquées. Ces informations doivent être conservées pendant au moins 10 ans et fournies aux autorités locales ou aux chercheurs s'ils le demandent.	

Instructions sur l'élimination maîtrisée du produit et de son emballage	Contexte / Remarque :
Éliminer tous les déchets de produit et contenants dans les circuits de collecte appropriés.	Indispensable pour la protection de l'environnement.
Ne pas se débarrasser du produit biocide dans les canalisations (évier, toilettes...), les caniveaux, les cours d'eau, en plein champ ou dans tout autre environnement extérieur.	

3. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

En se fondant sur les critères d'acceptabilité du risque définis dans le règlement (UE) n° 528/2012, sur les conclusions de l'évaluation communautaire de la substance active, sur les données soumises par le pétitionnaire et évaluées dans le cadre de cette demande, ainsi que sur l'ensemble des éléments dont elle a eu connaissance, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

Les caractéristiques physico-chimiques du produit biocide AQUABAC DF3000 décrites dans le cadre de la demande d'autorisation de mise sur le marché permettent de s'assurer de la sécurité de son utilisation dans les

conditions d'emploi préconisées ci-dessous et pour les usages proposés par l'Anses à l'annexe 2. La durée de conservation proposée par l'Anses pour le produit AQUABAC DF3000 est de 6 mois à 25 °C.

Il conviendra toutefois de fournir, en post-autorisation, les résultats intermédiaires à 6 mois de l'étude de stabilité en cours, dans un délai de 6 mois.

Il conviendra par ailleurs de démontrer que la préparation peut être appliquée sans obstruction de l'appareillage d'application, et de préciser le matériau de l'emballage en fibre revendiqué.

Le niveau d'efficacité du produit AQUABAC DF3000 est satisfaisant pour les usages proposés à l'annexe 2, sous réserve de la soumission d'essais de terrain ou de semi-terrain (dans des conditions expérimentales proches de l'utilisation réelle du produit) sur le genre *Culex* en respectant les conditions d'emploi revendiquées (doses, stades larvaires, modes d'application), dans les 6 mois suivant l'obtention de l'autorisation.

Des essais de terrain ou de semi-terrain (dans des conditions expérimentales proches de l'utilisation réelle du produit) sur le genre *Aedes* sont également attendus pour confirmer la dose efficace de 1 kg/ha, dans un délai de 2 ans.

Les risques pour les professionnels liés à l'utilisation du produit AQUABAC DF3000 sont considérés comme acceptables pour les applications terrestres et aériennes dans les conditions d'emploi mentionnées ci-dessous.

Les risques d'exposition pour les passants, les résidents et les travailleurs sont considérés comme acceptables lors des applications terrestres et aériennes dans les conditions d'emploi mentionnées ci-dessous.

L'utilisation du produit AQUABAC DF3000 est considérée comme acceptable dans les rizières avec un délai avant récolte d'un mois. En revanche, lors de l'utilisation du produit AQUABAC DF3000 dans les eaux d'irrigation des cultures à l'exception du riz, il est impossible d'exclure une éventuelle contamination des denrées à la récolte en raison du manque d'informations disponibles dans le dossier. Il conviendra ainsi de ne pas utiliser le produit AQUABAC DF3000 dans les eaux d'irrigation des cultures à l'exception des rizières, pour lesquelles un délai avant récolte d'un mois doit être respecté. Le produit ne doit par ailleurs pas être appliqué dans les eaux stagnantes des champs lorsque les parties consommables des plantes sont présentes.

Les risques sont considérés comme acceptables à la dose de 1 kg/ha pour le compartiment aquatique en prenant en compte au maximum 8 applications, et pour le compartiment terrestre en prenant en compte deux applications, dans le cas de l'utilisation du produit biocide AQUABAC DF3000 par application par voie terrestre.

Les risques sont considérés comme acceptables pour le compartiment aquatique et terrestre en prenant en compte 4 applications à la dose de 0,125 kg/ha, dans le cas de l'utilisation du produit biocide AQUABAC DF3000 par application aérienne.

Il faut néanmoins noter que l'évaluation de risque pour le compartiment terrestre est basée sur une PNED du même ordre de grandeur que la densité naturelle de *Bacillus thuringiensis* observée dans les sols. De plus, la PNED est dérivée d'une étude de toxicité aiguë sur vers de terre ne montrant aucun effet à la plus haute concentration testée et aucun effet toxique n'est attendu sur les microorganismes du sol et sur les plantes terrestres. En conséquence, pour les applications terrestres à partir de 3 applications espacées de 5 jours à la dose 1 kg/ha et pour les applications aériennes à partir de 5 applications espacées de 5 jours à la dose maximale de 0,125 kg/ha, l'Anses recommande d'évaluer les effets de ces applications sur la diversité biologique par un suivi de la biodiversité, plus particulièrement sur les espèces proches des espèces cibles, comme par exemple les insectes appartenant au sous-ordre des Nématocères (ordre des Diptères), et aux espèces appartenant aux mêmes réseaux trophiques que les espèces cibles, en incluant les espèces terrestres.

De plus, en l'absence de données de toxicité sur les organismes du sédiment, et tennant compte de données contradictoires de la littérature concernant l'impact de la substance active *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* serotype H14, souche AM65-52 sur les prédateurs des organismes cibles, un suivi de la biodiversité incluant les chaînes trophiques des milieux aquatiques devra être effectué en cas d'applications répétées sur de grandes étendues du produit AQUABAC DF3000.

Les données collectées devront être fournies à l'Anses tous les 24 mois. Des mesures de réductions des risques appropriées devront être appliquées en cas de potentielle identification de risques pour ces organismes.

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 du produit biocide AQUABAC DF3000, dans les conditions mentionnées ci-dessous et pour les usages figurant dans l'annexe 2.

3.1. CLASSIFICATION²⁵ DE LA SUBSTANCE ACTIVE *Bti*, PHRASES DE RISQUE ET CONSEILS DE PRUDENCE

Les micro-organismes ne sont pas soumis à la classification.

3.2. CLASSIFICATION DU PRODUIT AQUABAC DF3000, PHRASES DE RISQUE ET CONSEILS DE PRUDENCE

Au regard des résultats expérimentaux, de la teneur en substance active, de la teneur en co-formulants et selon les règles de classification du règlement (CE) 1272/2008¹⁵, le produit AQUABAC DF3000 nécessite la classification suivante :

Irritation oculaire, catégorie 2 - H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

Conseils de prudence :

P264 : Se laver (les mains) soigneusement après manipulation.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Par ailleurs, les micro-organismes doivent être considérés comme des sensibilisants potentiels. Il conviendra de mentionner sur l'étiquette "*Contient du Bacillus thuringiensis israelensis. Peut provoquer des réactions de sensibilisation*".

3.3. CONDITIONS D'EMPLOI ET PRECONISATIONS DEVANT FIGURER SUR L'ETIQUETAGE POUR LES USAGES PROPOSES PAR L'ANSES

Conditions d'emploi et préconisations liées à l'évaluation des propriétés physico-chimiques

- Ne pas stocker plus de 6 mois ni à une température supérieure à 25 °C.
- Stocker à l'abri de la lumière.
- La préparation diluée devra être appliquée sous agitation continue.

Conditions d'emploi et préconisations liées à l'évaluation de l'efficacité

- Toujours lire l'étiquette ou la notice avant utilisation, et respecter toutes les instructions qui y sont indiquées.
- Adopter des méthodes de gestion intégrée telle que la combinaison de méthodes de lutte chimique, physique et autres mesures d'hygiène publique, en tenant compte des spécificités locales (conditions climatiques, espèces cibles, conditions d'usage, etc.).
- L'équipement utilisé pour les traitements doit être adapté, correctement entretenu et calibré.
- Tenir compte du cycle de vie et des caractéristiques des insectes cibles pour adapter les traitements. En particulier, cibler le stade de développement le plus sensible de l'organisme cible, le moment des applications et les zones à traiter.
- Informer le détenteur de l'autorisation de mise sur le marché en cas d'inefficacité d'un traitement.

¹⁹ Règlement (CE) no 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006

- Avant le traitement, déterminer précisément [les zones à traiter/les routes à suivre] (sur une carte ou un plan).
- Pour optimiser l'efficacité du traitement, ne pas appliquer par temps de pluie (prévue pour les 24 heures à venir) ou de vent (supérieur à 15 km/h).
- Ne pas utiliser dans des eaux contenant des niveaux excessifs de matières organiques.
- Ne pas pulvériser dans les endroits où les courants d'air sont montants, où lors d'inversion de température qui empêchent le nuage pulvérisé de se redéposer dans la zone traitée.

Conditions d'emploi et préconisations liées à l'évaluation des risques pour l'homme

- Porter des gants de protection (accordant une protection conforme à la norme NF EN 374 parties 1, 2 et 3 contre le produit et la substance active qu'il contient), une combinaison de protection catégorie III de type 4 (étanche aux pulvérisations), des lunettes de protection et un masque respiratoire EN FFP3 pendant toutes les phases exposantes.
- Ne pas utiliser par des personnes fortement immunodéprimées ou sous traitement immunosuppresseur.
- Pour les travailleurs entrant après épandage sur une zone traitée, porter une combinaison de travail et des gants de protection.
- Mettre en place une zone non accessible à la population générale pendant le traitement.
- Ne pas utiliser dans les eaux d'irrigation des cultures à l'exception des rizières, pour lesquelles un délai avant récolte de 1 mois doit être respecté.
- Ne pas appliquer dans les eaux stagnantes des champs lorsque les parties consommables des plantes sont présentes.

Conditions d'emploi et préconisations liées à l'évaluation des risques pour l'environnement

- L'étiquette du produit doit informer l'utilisateur de la nécessité de consulter les autorités locales et de respecter les conditions requises avant l'utilisation de l'AQUABAC DF3000 en milieu naturel.
- Des autorisations spécifiques sont requises pour l'application de l'AQUABAC DF3000 dans les zones couvertes par le réseau Natura 2000, les zones protégées ou les réserves naturelles.
- L'utilisateur doit enregistrer toutes les informations concernant les applications, en indiquant les zones traitées, les doses appliquées. Ces informations doivent être conservées pendant au moins 10 ans et fournies aux autorités locales ou aux chercheurs s'ils le demandent.

3.4. INSTRUCTIONS SUR L'ELIMINATION MAITRISEE DU PRODUIT ET DE SON EMBALLAGE

Instructions liées à l'évaluation des risques pour l'environnement

- Eliminer tous les déchets de produit et contenants dans les circuits de collecte appropriés.
- Ne pas se débarrasser du produit biocide dans les canalisations (égouts, toilettes...), les caniveaux, les cours d'eau, en plein champ ou dans tout autre environnement extérieur.

3.5. RECOMMANDATIONS A PRENDRE EN COMPTE PAR LE PETITIONNAIRE

- L'étiquette doit respecter les conditions d'emploi préconisées et le guide de l'étiquetage des produits biocides²⁶.
- En cas d'inefficacité du traitement (suspicion de résistance), l'autorité compétente devra en être informée.

3.6. DONNEES POST-AUTORISATION

Données requises liées à l'évaluation des propriétés physico-chimiques

- Certifier la bioactivité minimale et maximale du produit AQUABAC DF3000 en ITU/g, certifier les teneurs minimale, maximale et nominale de *Bacillus thuringiensis israelensis* souche BMP144 dans le produit biocide AQUABAC DF3000 en UFC/g, et de déterminer la bioactivité et les contaminants microbiens dans 5 lots de du produit AQUABAC DF3000 en utilisant des méthodes validées ou des méthodes standards internationales conformément au document OCDE 65 (2011).

²⁶ Guide à l'intention des responsables de la mise sur le marché des produits biocides. Lignes directrices sur l'étiquetage des produits biocides mis sur le marché. Version du 28 août 2007.

- Fournir les résultats à 6 mois de l'étude de stabilité au stockage à température ambiante en cours, dans un délai de 6 mois. Cette étude devra inclure, avant et après stockage, la détermination de la bioactivité (avec une variation de la bioactivité n'excédant pas 10 % et une bioactivité en accord avec les valeurs certifiées pour le produit AQUABAC DF3000) et des contaminants microbiens conformément au guide OCDE 65 en utilisant des méthodes validées ou des méthodes standards internationales.
- Démontrer que la préparation peut être appliquée sans obstruction de l'appareillage d'application.
- Préciser le matériau de l'emballage en fibre revendiqué.

Données requises liées à l'évaluation de l'efficacité

- Soumettre dans un délai de 6 mois suivant l'obtention de l'autorisation des essais de terrain ou de semi-terrain (dans des conditions expérimentales proches de l'utilisation réelle du produit) sur le genre *Culex* dans les conditions d'emploi revendiquées (doses, stades larvaires, modes d'application).
- Soumettre dans un délai de 2 ans suivant l'obtention de l'autorisation des essais de terrain ou de semi-terrain (dans des conditions expérimentales proches de l'utilisation réelle du produit) sur le genre *Aedes* dans les conditions d'emploi revendiquées (doses, stades larvaires, modes d'application).

Données requises liées à l'évaluation des risques pour l'environnement

- Il conviendra de mettre en place un programme de suivi de la biodiversité incluant les chaînes trophiques des milieux aquatiques sur les sites traités lors d'applications répétées du produit AQUABAC DF3000 sur de grandes étendues.
- Il conviendra de mettre en place un programme de suivi de la biodiversité incluant les chaînes trophiques terrestres sur les sites traités par des applications terrestres à partir de 3 applications espacées de 5 jours à la dose 1 kg/ha, et sur les zones de large étendue traitées par applications aériennes à partir de 5 applications espacées de 5 jours à la dose 0,125 kg/ha.

Les données collectées devront être fournies à l'Anses tous les 24 mois.

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

BAMM, AQUABAC DF3000, *Bacillus thuringiensis israelensis* serotype H14 souche BMP 14, TP18

Annexe 1

Liste des usages revendiqués pour une autorisation de mise sur le marché
du produit AQUABAC DF3000

Organismes cibles	Dose	Mode d'application
Moustiques Genres : <i>Culex spp</i> , <i>Aedes (Ochlerotatus) spp</i> et <i>Anopheles spp</i> Stades larvaires L1 à L4	0,125 à 1 kg/ha	Application terrestre par pulvérisation et application aérienne. Le produit est dilué dans l'eau avant l'application.

Annexe 2

Liste des usages proposés pour une autorisation de mise sur le marché
du produit biocide AQUABAC DF3000

Organismes cibles	Doses	Mode d'application
Moustiques Genres : <i>Aedes (Ochlerotatus) spp</i> <i>Culex spp.</i> * Stades larvaires L1 à début L4	1 kg/ha** Eaux modérément polluées	Application terrestre par pulvérisation (pulvérisateur manuel) Le produit est dilué dans l'eau avant l'application.

*Sous réserve de la soumission d'essais de terrain ou de semi-terrain (dans des conditions expérimentales proches de l'utilisation réelle du produit) sur le genre *Culex* dans un délai de 6 mois après autorisation.

**Sous réserve de la soumission d'essais de terrain ou de semi-terrain (dans des conditions expérimentales proches de l'utilisation réelle du produit) sur le genre *Aedes* dans un délai de 2 ans après autorisation.