

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

relatif aux risques en termes de sécurité sanitaire liés à l'utilisation de souches de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en tant que substances actives dans des insecticides biologiques

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'Agence a été saisie le 28 février 2013 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif aux risques en termes de sécurité sanitaire liés à l'utilisation de souches de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en tant que substances actives dans des insecticides biologiques.

1. OBJET DE LA SAISINE

En mars 2012, la DGCCRF a lancé une alerte sur des lots de persil frisé en raison de la présence de *Bacillus cereus* présumptifs avec un dénombrement supérieur à 10^5 ufc¹/g.

L'alerte a été donnée après analyses d'un lot de persil le 24/01/2013 dans le cadre "Plan de contrôle de la qualité microbiologique des végétaux" qui rapportaient la présence de *Bacillus cereus* présumptifs à un taux estimé à $1,3 \times 10^5$ ufc/g. Cinq autres analyses effectuées le 27/02/2013 rapportent des taux compris entre $5,9 \times 10^5$ - $1,16 \times 10^6$ ufc/g (moyenne proche de 9×10^5 ufc/g).

Bacillus cereus ne fait pas l'objet de critères de sécurité des aliments selon la réglementation européenne. Toutefois, le règlement (CE) n°2073/2005 modifié définit un critère d'hygiène des procédés applicable à *B. cereus* présumptifs pour les préparations en poudre et aliments diététiques destinés aux enfants de moins de 6 mois ($m = 50$ ufc/g et $M = 500$ ufc/g ; $n=5$, $c = 1$)².

Le seuil d'alerte est fixé à 1 000 ufc/g pour ces produits et à 1×10^5 ufc/g pour les autres denrées alimentaires (note DGAL/MUS/N2009-8188, 2009). Certains guides de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH) ont des spécifications concernant *B. cereus* ($m= 1000$ ufc/g et $M= 1 \times 10^4$ ufc/g).

¹ Ufc : unité formant colonie

² n : nombre d'unités dont se compose l'échantillon

m : seuil limite en dessous duquel tous les résultats sont considérés comme satisfaisants

M : seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants

c : nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs comprises entre m et M

D'autre part, le contrôle de végétaux selon le guide d'aide à la gestion des alertes d'origine alimentaire, en date du 02/07/2009, peut conduire à la recherche de *Bacillus* sur les fruits et légumes frais, sans base réglementaire. Mais ces critères n'ont pas été pris en compte dans le GBPH fruits et légumes frais, non transformés (guide validé en août 2011).

Le persil incriminé était issu de l'agriculture biologique et avait fait l'objet d'un traitement insecticide contenant *Bacillus thuringiensis* SA-12, souche approuvée au niveau européen en tant que substance active phytopharmaceutique³ pour lutter contre l'attaque des chenilles.

La méthode mise en œuvre par les laboratoires de la DGCRFF pour le dénombrement de *B. cereus* présumptif suit la norme NF EN ISO 7932. Or, cette méthode microbiologique ne permet pas de distinguer *B. cereus sensu stricto* de *B. thuringiensis*.

En effet, *B. cereus sensu lato*, ou "*B. cereus* groupe", comprend six "espèces" : *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoïdes*, *B. weihenstephanensis* et *B. pseudomycoïdes*, toutes donnant des colonies de *B. cereus* présumptifs et qui seront prises en compte lors des analyses microbiologiques des aliments.

B. thuringiensis se différencie de *B. cereus stricto sensu* par un cristal parasporal toxique pour les insectes produit lors de la sporulation de la bactérie. Ce cristal est observable au microscope.

La DGCCRF demande à l'Anses d'examiner les questions suivantes :

- 1 Quels sont les risques liés à *B. thuringiensis sensu stricto* en termes de toxi-infections alimentaires ?
- 2 Est-il pertinent de maintenir un seuil d'alerte en *B. cereus* présumptifs à 10^5 ufc/g pour les denrées végétales préalablement traitées avec un produit de lutte biologique à base de *B. thuringiensis* autorisés en tant que substance active (sous réserve de la preuve de traitement) ?
- 3 Dans le cas où un seuil d'alerte en *B. cereus* présumptifs à 10^5 ufc/g pour les denrées végétales préalablement traitées avec un produit de lutte biologique à base de *B. thuringiensis* n'est pas pertinent :
 - un autre seuil pour *B. cereus* présumptifs permettrait-il un niveau de sécurité sanitaire équivalent ?
 - Ou
 - serait-il pertinent d'envisager un dénombrement différencié de *B. cereus* présumptifs et *B. thuringiensis* (par exemple par démonstration des inclusions cristallines parasporales) avec maintien du seuil existant de 10^5 ufc/g pour les *B. cereus* mais excluant les *B. thuringiensis* ?
- 4 Existe-t-il des méthodes pour différencier les *B. thuringiensis* autorisés des *B. thuringiensis* environnementaux ? Sinon quelles seraient les conditions requises pour qu'une denrée soit considérée comme propre à la consommation ?

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise 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)".

L'expertise a été réalisée par la Direction des produits réglementés de l'Anses et le Comité d'experts spécialisé "Produits phytopharmaceutiques : microorganismes et macroorganismes utiles aux végétaux" a été consulté le 1^{er} juillet 2013.

³ Règlement d'exécution (UE) n° 540/2011 de la Commission du 25 mai 2011 portant application du règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne la liste des substances approuvées.

3. ANALYSE

3.1 Est-il possible de différencier *B. thuringiensis* de *B. cereus* et les *B. thuringiensis* autorisés des *B. thuringiensis* environnementaux ?

L'espèce *B. thuringiensis* fait partie du groupe des *B. cereus* qui comprend plusieurs espèces dont *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. mycoïdes*, *B. weihenstephanensis* et *B. pseudomycoïdes*. En fait aujourd'hui, certains auteurs considèrent que ces différentes espèces ne constituent qu'une seule espèce.

Les méthodes d'analyse standard (ISO 7932 et 21871) pour la détection et le dénombrement de *B. cereus sensu lato* ne permettent pas de distinguer *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis*. De ce fait, les données d'incidence de *B. cereus* dans les aliments, ainsi que les rapports d'intoxication alimentaire mettant en cause *B. cereus*, peuvent concerner les trois espèces (EFSA, 2005).

Alors que *B. thuringiensis* est connu et exploité pour ses propriétés insecticides, *B. anthracis* est responsable de la maladie du charbon et *B. cereus* est responsable de toxi-infections alimentaires, caractérisées par des symptômes diarrhéiques, et d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques. Ces différentes espèces restent difficiles à identifier quelles que soient les méthodes utilisées. Classiquement, à partir de cultures, c'est l'observation microscopique de la présence d'un cristal protéique qui permet de différencier *B. thuringiensis* de *B. cereus*.

Pour une identification plus sûre, il faut faire appel aux méthodes moléculaires. Toutefois, après avoir comparé différentes méthodes (rep-PCR, PCR-TGGE et RAPD-PCR), Manzano *et al.* (2009) concluent qu'il reste difficile de discriminer *B. thuringiensis* et *B. cereus*.

La discrimination entre *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* en utilisant le gène *gyrB* a également été tentée (Cherif *et al.* 2003a, 2003b, 2007; Daffonchio *et al.* 2006; Jensen *et al.* 2005; La Duc *et al.* 2004), mais n'est pas complètement validée. Il est également possible de rechercher spécifiquement la présence des gènes (*cry* et *ces*) qui codent respectivement pour les toxines "insecticides" et la toxine émétique "céréulide". Les souches de *B. cereus* impliquées dans les toxi-infections peuvent produire d'autres toxines (entérotoxines) que la toxine émétique (céréulide).

Lors de l'analyse des aliments ou lors de l'investigation d'épidémies, les tests complémentaires permettant de distinguer *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. weihenstephanensis* ne sont généralement pas effectués.

Toutefois, dans le cas du lot de persil dans lequel a été identifiée la présence de *Bacillus cereus* présumés avec un dénombrement supérieur à 10^5 ufc/g, les analyses complémentaires réalisées par la méthode de recherche microscopique d'un cristal protéique, démontrent qu'en réalité les dénombrements de *B. cereus sensu stricto* étaient inférieurs à 1×10^3 ufc/g.

Par ailleurs, il n'est pas possible, actuellement, de différencier les souches autorisées de *B. thuringiensis* de celles naturellement présentes dans l'environnement. Les souches autorisées sont caractérisées par leur sérotype, mais elles ne sont pas identifiables par des méthodes de routine. Une méthode d'identification spécifique à chaque souche autorisée sera toutefois demandée aux pétitionnaires dans le cadre du réexamen communautaire des produits contenant ces substances (EFSA Journal 2012;10(2): 2540⁴).

La question n'est toutefois pas seulement de savoir s'il est possible de proposer une méthode fiable de distinction de *B. thuringiensis* et *B. cereus* et des souches de *B. thuringiensis* entre elles mais si *B. thuringiensis* présente des risques en termes de toxi-infections alimentaires.

⁴ <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/2540.pdf>

3.2 *B. thuringiensis* présente-t-il des risques en termes de toxi-infections alimentaires ?

Les risques que présentent les souches de *B. thuringiensis*, notamment les souches autorisées en tant qu'agents de bio-contrôle, en termes de toxi-infections alimentaires ne sont pas clairement établis.

Facteurs de virulence de *B. cereus*

B. cereus est responsable d'une part d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques et d'autre part de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques. Les seuils de contamination déclenchant le risque émétique est plus clair que celui déclenchant les diarrhées (Pielaat *et al.* 2006). Toutefois, toutes les souches de *B. cereus* n'ont pas la même capacité à provoquer des symptômes diarrhéiques, certaines étant même utilisées comme probiotiques.

Les toxi-infections associées à *B. cereus* sont souvent bénignes, la durée des symptômes est de l'ordre de 24 heures et les complications sont rares. Entre 2006 et 2010, *B. cereus* représente selon les années la 4^{ème} à la 6^{ème} cause des foyers de toxi-infections alimentaires en France pour lesquels l'agent est confirmé (Anses et DGAI. Bulletin épidémiologique Santé animale et alimentation).

Les souches responsables des diarrhées sont capables de produire des entérotoxines (HBL, NHE et CytK). Les entérotoxines HBL (hémolysine BL) et NHE (entérotoxine non hémolytique) sont chacune composées de trois protéines. La cytotoxine K (CytK) existe sous deux formes, CytK1 et CytK2, la première étant plus cytotoxique que la seconde. De grandes différences de production de toxines HBL et NHE ont été observées entre les souches impliquées dans des toxi-infections alimentaires et les souches de l'environnement (Moravek *et al.*, 2006). Il semblerait que le niveau de production de NHE pourrait être responsable de la toxicité de *B. cereus* et un indicateur de son potentiel diarrhéique (Moravek *et al.*, 2006). D'autre part, il a été signalé un système très complexe de régulation de la production de ces entérotoxines (Rapport du Conseil supérieur de la santé de Belgique, 2008).

Dans l'avis du Conseil supérieur de la santé de Belgique de janvier 2010 issu de ce rapport, il est indiqué : *"la régulation de la formation d'entérotoxines est très complexe, dans la mesure où elle implique divers régulateurs transcriptionnels. L'expression des gènes d'entérotoxines codant pour NHE, HBL et CytK est fortement régulée par le système quorum sensing PlcR-PapR (Gohar et al., 2008), mais pour NHE et HBL, leurs régulations dépend également d'autres systèmes liés à l'environnement tels que les régulateurs redox ResDE et Fnr (Duport et al., 2006; Zigha et al., 2007), qui régulent également la croissance fermentative de B. cereus et pourraient à tout le moins partiellement fonctionner indépendamment de PlcR. Par ailleurs, l'expression des opérons hbl et nhe semble être freinée par le régulateur catabolique CcpA, qui contrôle également le métabolisme glucosique (van der Voort et al., 2008). Ces données correspondent à la double constatation qu'aussi bien la vitesse de croissance que la source de glucides influencent la production d'entérotoxines, le sucrose augmentant notamment la production de NHE (Ouhib et al., 2006), et que le faible potentiel redox stimule la production d'entérotoxines (surtout HBL) (Zigha et al., 2006)."*

Les toxi-infections diarrhéiques à *B. cereus* sont le plus souvent associées à une population égale ou supérieure à 10⁵ ufc/g d'aliments consommés, bien que des épidémies associées à des aliments contenant 10³ ufc/g aient été décrites (Arnesen *et al.* 2008).

Les souches de *B. cereus* capables de produire la toxine émétique, appelée céréulide (peptide cyclique, résistant au pH et à la chaleur) représentent une minorité, généralement 1-7 % des isolats issus des aliments ou de l'environnement (EFSA 2005, Afssa 2009).

Les souches *B. thuringiensis* utilisées en tant que bio-pesticides possèdent-elles les gènes codant pour les entérotoxines ?

Il faut souligner qu'aucune des souches de *B. thuringiensis* actuellement autorisées n'a été caractérisée du point de vue de la production potentielle d'entérotoxines⁵. Dans ses rapports, l'EFSA souligne ce manque de données.

Cependant, des travaux ont montré la production d'entérotoxines par des souches de *B. thuringiensis* isolées d'insecticides biologiques. Une étude danoise (Damgaard, 1995) a montré que toutes les souches isolées d'insecticides biologiques étaient capables de produire *in vitro* des entérotoxines avec cependant une grande variabilité dans les quantités produites. Frederiksen *et al.* (2006) ont également montré que des souches commerciales utilisées comme bio-pesticides possèdent les opérons complets des entérotoxines HBL, NHE and CytK mais ne possèdent pas le gène responsable codant pour la peptide synthétase (*ces*) de cérulide. Certaines souches de *B. thuringiensis* peuvent produire aussi une bêta exotoxine, mais ces souches ne sont pas autorisées comme bio-pesticides.

En conclusion de ces divers travaux, il n'est pas possible actuellement de préciser les conditions et la capacité de production des toxines par les différentes souches de *B. thuringiensis* à l'origine des symptômes diarrhéiques (nombre de gènes nécessaires et niveau d'expression selon les souches). La simple présence de gènes n'implique pas obligatoirement qu'une souche est pathogène ; l'expression des gènes dépend de la souche, de son potentiel pour les exprimer, ainsi que de l'influence de l'environnement⁶.

Toxicité par voie orale des souches de *B. thuringiensis* utilisées en tant que bio-pesticides

La toxicité et la pathogénicité par voie orale des souches approuvées ont par ailleurs été testées dans de nombreux essais *in vivo*. Dans les rapports d'évaluation européens des différentes souches de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, aucune étude expérimentale réalisée chez le rat par voie orale n'a mis en évidence d'effet néfaste, notamment après une administration orale d'une dose très élevée (10¹⁰ spores/jour) pendant 2 ans (EFSA, 2013⁷).

Des études de toxicité par voie orale ont été aussi menées avec d'autres sérotypes de *B. thuringiensis* autorisés qui n'ont pas non plus révélé d'effet néfaste chez le rat.

Mise en cause de souches autorisées dans des épisodes de toxi-infection ?

Dans un article de synthèse publié par Siegel en 2001, qui conclut à la parfaite innocuité pour les mammifères des insecticides à base de *B. thuringiensis*, l'auteur a passé en revue tous les cas de symptômes attribués, chez l'homme, à une exposition à *B. thuringiensis* pour conclure que ces souches microbiennes ne présentent aucun danger pour l'homme.

Cependant, lors de l'analyse des aliments ou lors de l'investigation d'épidémies, les tests permettant de distinguer *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. weihenstephanensis* ne sont généralement pas effectués, ce qui pourrait conduire à une sous-estimation de l'implication de *B. thuringiensis* dans les toxi-infections. Ainsi, une étude canadienne (Mc Intyre, 2008) qui a analysé 39 cas de toxi-infections imputés à *B. cereus sensu stricto* a identifié *B. cereus* dans 23 cas, *B. thuringiensis* dans 4 cas, *B. mycoïdes* dans 1 cas et une contamination mixte dans 11 cas.

Compte tenu de ces travaux, il n'est pas possible d'exclure totalement le risque de toxi-infections alimentaires imputables à *B. thuringiensis*.

⁵ Pour certaines souches, la recherche de toxines dans le produit technique a été réalisée mais aucune donnée de toxinogénèse au champ n'est disponible. La recherche des gènes codant les entérotoxines dans le génome des souches déposées n'a pas non plus été réalisée dans le cadre de leur évaluation européenne..

⁶ <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/2540.pdf>

⁷ <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/3063.htm> ; EFSA J. 2013, 11(1): 3063

Exposition potentielle du consommateur à des denrées traitées avec *B. thuringiensis*

Dans le cadre de l'évaluation européenne des *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, l'Etat membre rapporteur a calculé, pour la souche ABTS-351 utilisée pour traiter les choux, une teneur en *B. thuringiensis* au moment de la récolte de $6,62 \times 10^4$ ufc/g. En prenant en compte le nombre d'application revendiqué, cette teneur à la récolte pourrait atteindre $2,2 \times 10^6$ ufc/g. Le calcul effectué pour des cultures de tomates sous serre a conduit à une teneur de $2,3 \times 10^4$ ufc/g, mais selon l'Etat membre rapporteur, ce calcul serait clairement sous estimé dans la mesure où ces traitements impliquent en moyenne 12 applications de *B. thuringiensis*. En ce qui concerne les souches SA11, SA12 et EG2348 utilisées sur vigne, la teneur calculée serait de $5,6 \times 10^6$ ufc/g.

Toutes les concentrations calculées dépassent 10^3 ufc/g (valeur de m) et certaines dépassent largement le seuil d'alerte. On peut donc s'interroger sur la quantité de "résidus viables" au moment de la récolte mais également lors de la consommation des denrées traitées.

L'exposition au soleil (rayons UV) des souches après application entraîne une diminution progressive du nombre d'ufc/g, d'importance variable, au cours du temps. Ainsi, une étude de Pedersen *et al* (1995) montre que la population de *B. thuringiensis*, pulvérisée sur des feuilles de chou, diminue d'un facteur 10^5 en 4 semaines, la durée de demi-vie étant de 16 heures. Il faut aussi prendre en considération les cultures sous serre moins exposées au rayonnement UV pour lesquelles cet abattement serait moindre. Par contre, cette bactérie survit beaucoup mieux dans les couches superficielles du sol, la durée de demi-vie étant de 100 jours. Une autre étude visant à déterminer l'occurrence naturelle de *B. cereus/B. Thuringiensis* dans la phyllosphère a été réalisée sur rumex sauvage non traité préalablement par une souche de *B. thuringiensis* bio-insecticide. Les résultats de cette étude montrent une densité de *B. cereus/B. thuringiensis* sur les feuilles de rumex de 1×10^4 ufc/g. 37 % et 12 % de ces souches possédaient les gènes *cry1* et *cry2* permettant de les identifier comme *B. thuringiensis* (Collier *et al*, 2005).

Données manquantes

Les éléments présentés ci-dessus indiquent que des incertitudes subsistent quant aux risques que les souches de *B. thuringiensis*, notamment les souches autorisées en tant qu'agents de bio-contrôle, puissent présenter en termes de toxi-infections alimentaires.

La souche SA12, qui a fait l'objet de l'alerte sur des lots de persil frisé lancée par la DGCCRF, est l'une des souches de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (souche ABTS 351, PB 54, SA 11, SA 12, EG 2348) qui ont été approuvées au titre du règlement (CE) n°1107/2009 et pour lesquelles des rapports d'évaluation (janvier 2008) ont été produits par le Danemark en tant qu'Etat membre rapporteur. L'EFSA a émis une opinion en relation avec la substance active *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (souches ABTS 351, PB 54, SA 11, SA 12, EG 2348), en identifiant les points présentant des lacunes (EFSA Journal 2012;10(2): 2540). Il convient de noter que l'EFSA a listé comme données manquantes notamment :

- une méthode d'identification spécifique à chaque souche ;
- des données sur le potentiel toxigène de chaque souche ;
- des données résidus spécifiques des souches.

Ces données qui seront demandées aux pétitionnaires devraient contribuer à lever les incertitudes.

3.3 Pertinence du seuil d'alerte

En l'état actuel des données disponibles, et en attente de données précises sur le potentiel toxigène des souches autorisées ou de données épidémiologiques démontrant l'imputabilité de *B. thuringiensis* dans des toxi-infections attribuées à *B. cereus sensu lato*, il est jugé prudent de maintenir un seuil d'alerte $>10^5$ ufc/g de *B. cereus sensu lato* y compris pour les produits traités avec une souche autorisée de *B. thuringiensis*.

Cependant, cette saisine est basée sur le seul résultat d'un lot de persil contaminé à un niveau supérieur au seuil d'alerte. Il serait opportun de savoir si le cas du persil contaminé par plus de 10^5 ufc/g de *B. cereus sensu lato*, est un cas sporadique parmi un ensemble de contrôles. Au

vu des quantités de *B. thuringiensis* appliquées sur les cultures légumières ou fruitières et des délais de traitement avant récolte très courts (jusqu'à 1 jour), il pourrait être recommandé de faire des analyses systématiques des fruits et légumes traités par des souches de *B. thuringiensis*. Si le seuil d'alerte est régulièrement dépassé, il sera alors nécessaire de réévaluer celui-ci au regard de données épidémiologiques précédemment évoquées sur les incidences potentielles de toxi-infections.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

1 Quels sont les risques liés à *B. thuringiensis sensu stricto* en termes de toxi-infections alimentaires ?

Au regard des données disponibles, le risque de toxi-infections alimentaires provoquées par *B. thuringiensis* ne peut être totalement exclu dans la mesure où les méthodes permettant de discriminer *B. thuringiensis* de *B. cereus sensu stricto* ne sont généralement pas mises en œuvre dans l'identification des souches impliquées dans les toxi-infections.

Bien que les souches de bio-insecticides soient utilisées pour le traitement des fruits et légumes depuis plusieurs décennies, il est difficile de trouver des études suggérant un effet délétère lié à leur utilisation. Une fois que le problème d'identification des souches du "groupe *B. cereus*" sera résolu par l'utilisation de méthodes moléculaires performantes et en routine, il conviendrait d'identifier de façon précise les souches impliquées dans les toxi-infections alimentaires, en discriminant *B. cereus* de *B. thuringiensis*, voire les différentes souches utilisées comme bio-pesticides.

Une étude épidémiologique pourrait être réalisée auprès des consommateurs de fruits et légumes en relation avec les toxi-infections alimentaires, avec une identification des souches impliquées suffisante pour permettre une discrimination entre *B. cereus* et *B. thuringiensis*.

2 Est-il pertinent de maintenir un seuil d'alerte en *B. cereus* présumés à 10^5 ufc/g pour les denrées végétales préalablement traitées avec un produit de lutte biologique à base de *B. thuringiensis* autorisés en tant que substance active (sous réserve de la preuve de traitement) ?

En l'état actuel des données disponibles, il paraît prudent de maintenir un seuil d'alerte $>10^5$ ufc/g de *B. cereus sensu lato* y compris pour les produits traités avec une souche autorisée de *B. thuringiensis* en attente de données épidémiologiques démontrant l'imputabilité de *B. thuringiensis* dans les toxi-infections attribuées à *B. cereus sensu lato*, ou à moins de pouvoir démontrer que les souches autorisées ne sont pas toxigènes.

3 Dans le cas où un seuil d'alerte en *B. cereus* présumés à 10^5 ufc/g pour les denrées végétales préalablement traitées avec un produit de lutte biologique à base de *B. thuringiensis* n'est pas pertinent :

- un autre seuil pour *B. cereus* présumés permettrait-il un niveau de sécurité sanitaire équivalent ?

Ou

- serait-il pertinent d'envisager un dénombrement différencié de *B. cereus* présumés et *B. thuringiensis* (par exemple par démonstration des inclusions crytallines parasporales) avec maintien du seuil existant de 10^5 cfu/g pour les *B. cereus* mais excluant les *B. thuringiensis* ?

Cette question ne se pose plus compte tenu de la réponse à la question 2.

4 Existe-t-il des méthodes pour différencier les *B. thuringiensis* autorisés des *B. thuringiensis* environnementaux ? Sinon quelles seraient les conditions requises pour qu'une denrée soit considérée comme propre à la consommation ?

Il n'a pas jusqu'ici été développé de méthode permettant de différencier les souches autorisées des souches naturellement présentes dans l'environnement de *B. thuringiensis*. Les souches autorisées sont caractérisées par leur sérotype, mais elles ne sont pas identifiables par des méthodes de routine. Dans ses conclusions, l'EFSA a identifié ce point comme manquant et recommande aux Etats membres dans le cadre du réexamen des préparations contenant ces substances actives de demander aux pétitionnaires une méthode d'identification spécifique à chaque souche autorisée.

En conclusion, les produits à base de *B. thuringiensis* destinés au traitement des cultures en particulier alimentaires sont en cours de réexamen. Dans ce cadre, des informations complémentaires seront demandées afin de combler les données manquantes identifiées lors de l'évaluation européenne des souches de *B. thuringiensis* :

- une méthode d'identification spécifique à chaque souche ;
- des données sur le potentiel toxigène de chaque souche ;
- des données résidus spécifiques des souches.

L'Anses recommande de disposer de résultats d'analyse (plans de contrôle et de surveillance et auto-contrôles) des fruits et légumes traités par des souches bio-insecticides de *B. thuringiensis*. Si le seuil d'alerte est régulièrement dépassé, il sera alors nécessaire de réévaluer celui-ci au regard de données épidémiologiques sur les incidences potentielles de toxi-infections.

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Produits phytopharmaceutiques, *B. cereus*, *B. thuringiensis*

Bibliographie

Afssa, 2009. Avis du 10 avril 2009 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'avis complémentaire concernant les références applicables aux denrées alimentaires en tant que critères indicateurs d'hygiène des procédés.

Anses et DGAI. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. Bulletin épidémiologique Santé animale et alimentation. N°50/Sécial Risques alimentaires microbiologiques.

Arnesen, L. P. S., Fagerlund, A. and Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 579-606.

Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H. and Daffonchio, D. (2003a). Genetic relationship in the "*Bacillus cereus* group" by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 1108-1119.

Cherif, A., Borin, S., Rizzi, A., Ouzari, H., Boudabous, A., and Daffonchio, D. (2003b). *Bacillus anthracis* diverges from related clades of the *Bacillus cereus* group in 16S-23S ribosomal DNA intergenic transcribed spacers containing tRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 33-40.

Cherif, A., Ettouni, B., Raddadi, N., Daffonchio, D., and Boudabous, A. (2007). Genomic diversity and relationship of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by multi-REP-PCR fingerprinting. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 343-350.

Collier, F.A. Elliot, S.L. Ellis R.J. (2005). Spatial variation in *Bacillus thuringiensis cereus* populations within the phyllosphere of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius*) and surrounding habitats. *FEMS Microbiology Ecology* **54**, 417-425

Daffonchio, D., Raddadi, N., Merabishvili, M., Cherif, A., Carmagnola, L., Brusetti, L., Rizzi, A., Chanishvili, N., Visca, P., Sharp, R. and Borin, S. (2006). Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1295-1301.

Damgaard, P. H. (1995). Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**: 245-250.

Denmark, 2008. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* (strains ABTS 351, PB 54, SA 11, SA 12, EG 2348). prepared by the rapporteur Member State Denmark in the framework of Directive 91/414/EEC, February 2008.

Denmark, 2011. Final Addendum to Draft Assessment Report on *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* (strains ABTS 351, PB 54, SA 11, SA 12, EG 2348), compiled by EFSA, November 2011.

Duport C., Zigha A., Rosenfeld E., Schmitt P. (2006). Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol*; **188**(18):6640-51.

EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. *The EFSA Journal*, **175**, 1-48.

EFSA, 2011. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* (strains ABTS 351, PB 54, SA 11, SA 12, EG 2348)

Frederiksen, K., Rosenquist, H., Jørgensen, K. and Wilcks, A. (2006). Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3435-3440.

Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Okstad OA, Gominet M, et al. (2008). The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* ; **3**(7):e2793.

Jensen, G.B., Fisker, N., Sparsø, T., and Andrup, L. (2005). The possibility of discriminating within the *Bacillus cereus* group using *gyrB* sequencing and PCR-RFLP. *International Journal of Food Microbiology* **104**: 113-120.

- La Duc, M.T., Satomi, M., Agata, N., and Venkateswaran, K. (2004) *GyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *Journal of Microbiological Methods* **56**: 383-394.
- McIntyre, L. Bernard, K. Beniac, D. Isaac-Renton, J. Naseby D.C. (2008). Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 7451-7453
- Manzano, M. Giusto, C. Iacumin, L. Cantoni, C. Comi, G. (2009). Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. *Food Microbiology* 26, 259-264
- Moravek, M., Dietrich, R., Buerk, C., Broussolle, V., Guinebretière, M. H., Granum, P. E., Nguyen The, C. and Martlbauer, E. (2006). Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol Lett* **257**: 293-298.
- Ouhib O, Clavel T, Schmitt P. (2006). The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. *Curr Microbiol*; 53(3):222-6.
- Pedersen, J.C. Damgaard, P.H. Eilenberg, J. Hansen, B.M. (1995). Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* in an experimental cabbage field. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 118-125
- Pielaat, A., Wijnands, L. M., Takumi, K., Nauta, M. J. and Van Leusden, F. M. (2006). The fate of *Bacillus cereus* in the gastrointestinal tract. RIVM, Bilthoven, The Netherlands.
- PUBLICATION DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE DE BELGIQUE n° 8316. Profil de risque pour le Groupe *Bacillus cereus* dans les toxi-infections d'origine alimentaire: situation en Belgique et recommandations Janvier 2010
- Rapport du Conseil supérieur de la santé de Belgique. Risk profile of the *Bacillus cereus* group implicated in food poisoning. 22/12/2008
<http://www.health.belgium.be/internet2Prd/groups/public/@public/@shc/documents/ie2divers/19060475.pdf>
- Siegel, J. P. (2001). Minireview: The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*- based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology* **77**, 13-21 (2001)
- Van der Voort M, Kuipers OP, Buist G, de Vos WM, Abee T. (2008). Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiol*; 8:62.
- Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. (2006). Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidation-reduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch Microbiol*; 185(3):222-33.
- Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. (2007). The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J Bacteriol*; 189(7):2813-24.