



Maisons-Alfort, le 15 mai 2019

Conclusions de l'évaluation

relatives à la demande d'autorisation de mise sur le marché de la société MONSANTO SAS pour le produit B-300

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a notamment pour missions l'évaluation ainsi que la délivrance des décisions relatives aux autorisations de mise sur le marché (AMM) des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture.

Les « conclusions de l'évaluation » portent sur l'évaluation des effets que l'utilisation des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture peuvent présenter pour la santé humaine, la santé animale et pour l'environnement ainsi que sur l'évaluation de leur efficacité au regard des effets revendiqués dans les conditions d'emploi prescrites.

Le présent document ne constitue pas une décision.

PRESENTATION DE LA DEMANDE

L'Anses a accusé réception d'une demande d'autorisation de mise sur le marché de la société MONSANTO SAS pour le produit B-300.

La production du produit B-300 est actuellement en phase pilote.

Le produit B-300 est une préparation fongique à base de *Penicillium bilaiae* souches P201 et P208 et se présente sous forme d'une solution pour traitement de semences pouvant être diluée avant emploi.

Les effets revendiqués par le demandeur pour le produit B-300 concernent la solubilisation des formes biologiquement indisponibles du phosphate lié et d'autres micronutriments dans le sol, l'augmentation de l'absorption de phosphore et de certains micronutriments dans les plantes, l'amélioration de la croissance des plantes (croissance des racines, croissance des pousses) et l'amélioration du potentiel de rendement.

Les caractéristiques garanties et les usages revendiqués par le demandeur pour le produit B-300 sont présentés en annexe 1.

L'évaluation de la présente demande est fondée sur l'examen par la Direction d'évaluation des produits réglementés (DEPR) du dossier déposé à l'Anses pour cette matière fertilisante, conformément aux dispositions du code rural et de la pêche maritime¹ et sur la base des recommandations proposées dans la « Note d'information aux demandeurs concernant l'homologation des MFSC² ».

Les données prises en considération sont celles soumises par le demandeur et jugées valides par la DEPR, ainsi que l'ensemble des éléments dont la DEPR a eu connaissance. Les conclusions relatives à la conformité des éléments présentés se réfèrent aux critères définis dans le « Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation Matières fertilisantes - Supports de culture » (formulaire cerfa n° 50644#01), sous réserve de l'utilisation des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture dans le respect des bonnes pratiques agricoles.

Lorsque des données complémentaires sont identifiées comme nécessaires, celles-ci sont détaillées à la fin des conclusions.

¹ Les principes de la mise sur le marché des matières fertilisantes, des adjuvants pour matières fertilisantes et des supports de culture sont définis dans le chapitre V du titre V du livre II du code rural et de la pêche maritime.

² Note d'information aux pétitionnaires concernant l'homologation des matières fertilisantes et supports de culture (MFSC) : Etat des exigences scientifiques - 1 août 2013.

SYNTHESE DE L'EVALUATION

Après évaluation de la demande et avec l'accord du Comité d'experts spécialisé "Matières Fertilisantes et Supports de Culture", réuni le 2 mai 2019, la Direction d'évaluation des produits réglementés émet les conclusions suivantes.

CONCLUSIONS RELATIVES A LA CARACTERISATION DU PRODUIT ET A LA QUALITE DE LA PRODUCTION

Caractérisation et procédé de fabrication

Les spécifications du produit B-300, telles que décrites sur le formulaire cerfa n°11385 et la fiche d'information, permettent de le caractériser et sont conformes aux dispositions réglementaires.

Les souches de *Penicillium bilaiae* considérées sont des souches naturelles non génétiquement modifiées, isolées à partir de sols canadiens (souche P201) et de sols australiens (souche P208). La souche P201 est enregistrée à l'ATCC³ (ATCC n° 20851) et par l'Agricultural Research Service Culture Collection (NRLL 50169). La souche P208 est enregistrée par l'Agricultural Research Service Culture Collection (NRLL 50162).

Le procédé de production à l'échelle pilote du produit B-300 repose sur l'inoculation de *Penicillium bilaiae* souches P201 ou P208 sur un milieu solide. Les spores récoltées suite à cette fermentation sont séchées puis séparées du substrat. Les spores ainsi obtenues sont ensuite ajoutées à des co-formulants pour former le produit fini B-300.

Le système de management de la qualité de la fabrication est décrit de manière suffisante et est considéré comme satisfaisant. Les systèmes de traçabilité et d'enregistrement des matières premières et des lots de production ne sont pas décrits et devront être fournis lors du passage à la production commerciale. La gestion des non-conformités est pertinente.

Les attestations croisées de fourniture et d'approvisionnement sont présentées de manière exhaustive pour ce qui concerne les sources des matières premières. Toute autre provenance correspondrait à un changement de composition et nécessiterait une évaluation complémentaire.

Les matières premières, ainsi que le procédé de fabrication, ne présentent pas de dangers physico-chimiques particuliers.

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse

La méthode d'échantillonnage utilisée dans le cadre du dossier technique pour constituer les échantillons soumis à l'analyse est pertinente compte tenu de la matrice considérée et des essais.

La plupart des analyses présentées a été effectuée sous accréditation du COFRAC⁴ ou d'organisme reconnu équivalent ISO 17025 et sont considérées comme acceptables.

Les méthodes d'analyse mises en œuvre pour la caractérisation du produit sont fournies et considérées acceptables.

La méthode permettant de déterminer la quantité de *Penicillium bilaiae* dans le produit B-300 est considérée acceptable.

Les méthodes d'analyses mises en œuvre pour la caractérisation de la souche, basées sur le séquençage de l'ADN ribosomal 28s (région 2D), sont considérées acceptables.

Il est rappelé que, aux écarts admissibles près, la conformité de chaque unité de commercialisation du produit aux teneurs garanties sur l'étiquette est requise, et que ces écarts admissibles ne peuvent pas être utilisés de manière systématique.

³ ATCC : American Type Culture Collection

⁴ COFRAC = Comité Français d'Accréditation

Constance de composition

La constance de composition du produit relative aux éléments de marquage obligatoire (teneurs en *Penicillium bilaiae* souches P201 et P208) est convenablement établie pour l'homogénéité et l'invariance du produit.

L'étude de stabilité montre que le produit est stable sur 12 mois à des températures inférieures à 15°C dans les emballages testés (bouteille, bidons ou cuves en PEHD⁵ de 0,25 L à 114 L). Les volumes des emballages commerciaux revendus sont 9,5 L, 57 L, ou 113,6 L.

Il est à noter qu'il conviendra de vérifier la constance de composition (invariance et stabilité) du produit B-300 sur la production industrielle.

CONCLUSIONS RELATIVES AUX PROPRIETES TOXICOLOGIQUES ET A L'EXPOSITION DE L'OPERATEUR

Profil toxicologique

L'espèce *Penicillium bilaiae* n'est pas inscrite sur la liste 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.

Des données de la littérature démontrent que ce champignon ne produit pas de métabolites secondaires toxiques.

Aucune étude n'a été réalisée sur l'infectiosité et la pathogénicité des souches P201 et P208 de *Penicillium bilaiae* composant le produit B-300. Par ailleurs, les infections confirmées à *Penicillium* sont rares et seul *Penicillium marneffei* est connu pour posséder un réel pouvoir pathogène à l'origine d'infections disséminées décrites essentiellement chez le patient porteur du virus de l'immunodéficience humaine.

Une recherche bibliographique récente indique que des infections opportunistes imputées à *Penicillium bilaii* ont été rapportées chez des sujets fortement immunodéprimés.

Concernant les matières premières composant le produit B-300, seule l'une d'elles (alcool secondaire C11-C15, éthoxylé) est classée pour la santé humaine selon la fiche de données de sécurité soumise. Sa teneur dans le produit entraîne la classification H319 du produit B-300.

Analyses réglementaires

Les teneurs en éléments traces métalliques (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) permettent de respecter les critères d'innocuité⁶ pour l'autorisation de mise sur le marché des matières fertilisantes dans les conditions d'emploi préconisées.

Aucune analyse relative aux composés traces organiques (fluoranthène, benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène et 7 PCBs⁷) n'a été soumise. Cependant, compte tenu de la nature des matières premières et du procédé de fabrication, il n'est pas attendu de contamination du produit par des micropolluants organiques.

Les résultats des analyses microbiologiques conduites sur un échantillon unique montrent que le produit B-300 respecte l'ensemble des valeurs microbiologiques de référence⁶ pour les usages revendus.

Etudes toxicologiques

Aucun essai de toxicologie réalisé sur le produit B-300 n'a été soumis. Seules des études réalisées avec de la poudre active de spores de *Penicillium bilaiae* (souches P201 et P208) ont été présentées. Toutefois, ces études n'étant pas réalisées sur le produit fini B-300, leurs résultats ne sont pas pris en compte pour la classification du produit.

⁵ PEHD : Polyéthylène Haute Densité

⁶ Tels que définis à l'Annexe VII du formulaire cerfa n° 50644#01 'Guide pour la constitution des dossiers de demande d'homologation Matières fertilisantes - Supports de culture'

⁷ PCB = polychlorobiphényle

Classement et conditions d'emploi proposés

La classification toxicologique du produit B-300, déterminée par calcul au regard de la classification des matières premières ainsi que de leur teneur dans le produit fini, est, au sens du règlement (CE) n° 1272/2008 : **H319** (Provoque une sévère irritation des yeux).

S'agissant d'un produit à base de micro-organismes, la phrase de précaution « Contient *Penicillium bilaiae*. Les micro-organismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » devra être mentionnée sur l'étiquette.

De plus, le produit B-300 ne devra pas être utilisé par des personnes immunodéprimées ou sous traitement immunosuppresseur.

Par ailleurs, considérant l'ensemble des informations disponibles et la nature du produit (produit composé d'un micro-organisme), des gants et un vêtement de protection appropriés, ainsi qu'un demi-masque anti-aérosol (EN149 FFP3 ou équivalent), devront être portés pendant toutes les phases de traitement et manipulation des semences et de semis.

CONCLUSIONS RELATIVES AUX RESIDUS ET A L'EXPOSITION DU CONSOMMATEUR

Compte tenu des usages revendiqués et du mode d'apport (traitement de semences), il n'est pas attendu de risque pour le consommateur.

CONCLUSIONS RELATIVES AU DEVENIR ET AU COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT ET A L'ECOTOXICITE

Aucun test d'écotoxicité, ni aucun essai visant à mesurer l'impact environnemental du produit B-300, n'ont été effectués.

Le micro-organisme *Penicillium bilaiae* est un saprophyte naturellement présent dans les sols et vivant préférentiellement dans la rhizosphère des plantes (Wakelin *et al.*, 2004b). Les éléments bibliographiques soumis par le demandeur indiquent que la population microbienne retrouve son niveau initial après la récolte (OCDE, 1995, point 5.3.2.1⁸). De plus, la colonisation spatiale des champignons de type *Penicillium* est en générale limitée (Dommergues et Mangenot, 1970).

En outre, considérant le mode d'apport du produit (traitement de semences), un transfert des souches P201 et P208 vers les milieux aquatiques n'est pas attendu.

En conclusion, il n'est pas attendu d'effets néfastes sur les organismes aquatiques et terrestres suite à l'utilisation du produit B-300 pour l'ensemble des usages revendiqués.

Classement proposé

La classification du produit B-300 vis-à-vis de l'environnement, déterminée par calcul au regard de la classification des matières premières ainsi que de leur teneur dans le produit fini, est, au sens du règlement (CE) n° 1272/2008 : sans classement.

CONCLUSIONS RELATIVES A L'EFFICACITE**Caractéristiques biologiques***Effets revendiqués*

Les effets revendiqués par le demandeur pour le produit B-300 concernent la solubilisation des formes biologiquement indisponibles du phosphate lié et d'autres micronutriments dans le sol, l'augmentation de l'absorption de phosphore et de certains micronutriments dans les plantes, l'amélioration de la croissance des plantes (croissance des racines, croissance des pousses) et l'amélioration du potentiel de rendement (formulaire cerfa n° 11385 du 18 décembre 2018).

⁸ OECD, 1995. Safety considerations for biotechnology. Scale-up of micro-organisms as biofertilizers. OECD Editions, p.47

Eléments relatifs à l'efficacité intrinsèque et au mode d'action

Les effets du produit B-300 sont basés sur la nature de ses éléments de composition : *Penicillium bilaiae* souches P201 et P208.

Le mode d'action proposé par le demandeur par rapport aux effets revendiqués repose sur des données de la littérature scientifique disponibles dans le dossier. *Penicillium bilaiae* aurait la capacité de solubiliser le phosphore inorganique et, dans une moindre mesure, certains micro nutriments tels que le zinc, le fer et le cuivre. Le phosphore est ainsi davantage disponible pour la culture. La meilleure disponibilité de cet élément peut permettre une amélioration de la croissance des cultures et un rendement plus élevé. Les deux souches agiraient à des stades différents de la levée de la semence.

Essais d'efficacité

La démonstration de l'efficacité du produit B-300 s'appuie sur 29 essais d'efficacité conduits dans les conditions d'emploi préconisées sur maïs (13 essais) et blé (16 essais). Dans ces essais, seul le rendement a été mesuré. Par ailleurs, aucun essai sur colza (culture revendiquée) n'a été soumis.

Essais maïs

Les analyses statistiques de chaque essai individuel ne mettent en évidence aucun effet significatif positif sur le rendement dans les parcelles traitées avec B-300 à la dose revendiquée de 2,6 ml/80000 de semences de maïs comparées à celles du témoin non traité quel que soit l'apport phosphaté rajouté lors des traitements.

Par ailleurs, l'analyse statistique du regroupement des 13 essais ne montre pas d'effet significatif de B-300 sur le rendement du maïs par rapport au témoin non traité.

Essais blé

Les résultats des 16 essais présentés montrent une augmentation significative du rendement dans 1 seul essai suite au traitement avec B-300 à la dose revendiquée de 0,06 ml/kg de semences, en comparaison avec le témoin non traité.

Par ailleurs, l'analyse statistique du regroupement des 16 essais ne montre pas d'effet significatif de B-300 sur le rendement du blé par rapport au témoin non traité.

Les résultats obtenus sur les autres paramètres du rendement, tels que le taux d'humidité des grains et le poids de mille grains, ne montrent pas d'effet positif significatif de B-300 comparé au témoin non traité.

Conclusions sur le mode d'emploi

Le mode d'emploi indiqué est suffisant pour permettre l'utilisation du produit.

Conclusions sur les revendications et la dénomination de classe et de type

Considérant l'ensemble des données d'efficacité disponibles, l'efficacité du produit B-300 par rapport au rendement n'est pas considérée démontrée.

Les autres effets revendiqués (solubilisation des formes biologiquement indisponibles du phosphate lié et d'autres micronutriments dans le sol, augmentation de l'absorption de phosphore et de certains micronutriments dans les plantes, amélioration de la croissance des plantes) ne sont étayés par aucun essai d'efficacité et les données bibliographiques ne sont pas considérées suffisantes. Ces effets ne peuvent donc pas être retenus.

Par ailleurs, aucun essai sur colza n'a été présenté. Il est à noter que les besoins en phosphore du colza sont supérieurs à ceux du maïs et du blé.

La dénomination de classe et de type qui pourrait être proposée est : « Préparation fongique » - « Solution pour traitement de semences de *Penicillium bilaiae* souches P201 et P208 ».

SYNTHESE DES RESULTATS DE L'EVALUATION

En se fondant sur les données soumises par le demandeur et évaluées dans le cadre de cette demande conformément aux dispositions réglementaires nationales, ainsi que sur l'ensemble des éléments dont elle a eu connaissance, la Direction d'évaluation des produits réglementés estime que :

- A.** La caractérisation et la constance de composition du produit formulé à l'échelle pilote est convenablement établie.

Les données de l'étude de stabilité montrent que le produit est stable sur 12 mois à des températures inférieures à 15°C dans les emballages testés (bouteille, bidons ou cuves en PEHD de 0,25 L à 114 L).

Il conviendra, de confirmer la constance de composition du produit B-300 sur la production industrielle et de fournir la description des systèmes de traçabilité et d'enregistrement des matières premières et des lots de production lors du passage en production industrielle.

- B.** Dans le cadre des usages et des conditions d'emploi retenus suite à l'évaluation, le produit B-300 est considéré comme conforme aux dispositions réglementaires pour les contaminants chimiques et biologiques pour lesquels il existe une valeur de référence.

Considérant l'ensemble des éléments disponibles, aucun effet néfaste pour l'homme ou l'environnement lié à l'utilisation du produit B-300 n'est attendu pour les usages et dans les conditions d'emploi retenues suite à l'évaluation.

- C.** Considérant l'ensemble des données d'efficacité disponibles, l'efficacité du produit B-300 relative aux effets revendiqués sur le rendement n'est pas considérée démontrée.

Les autres effets revendiqués (solubilisation des formes biologiquement indisponibles du phosphate lié et d'autres micronutriments dans le sol, augmentation de l'absorption de phosphore et de certains micronutriments dans les plantes, amélioration de la croissance des plantes) ne sont étayés par aucun essai d'efficacité et les données bibliographiques ne sont pas considérées suffisantes. Ces effets ne peuvent donc pas être retenus.

Par ailleurs, aucun essai sur colza n'a été présenté.

La dénomination de classe et de type qui pourrait être proposée est : « Préparation fongique »
- « Solution pour traitement de semences de *Penicillium bilaiae* souches P201 et P208 ».

CONCLUSIONS

La conformité ou l'absence de conformité aux dispositions réglementaires nationales, **dans les conditions d'étiquetage et d'emploi décrites aux points II et IV et des compléments d'information et suivis de production listés au point V**, est précisée ci-après.

I. Usages : résultats de l'évaluation pour une autorisation de mise sur le marché du produit B-300

Cultures	Dose par apport	Nombre maximum d'apport par an	Volumes de dilution (mL/kg)	Modes et époques d'apport	Conclusion (commentaires)
Maïs	2,6 mL pour 80 000 semences	1	0,408 à 0,8	Semis (printemps)	Non conforme (Rendement) (Efficacité non démontrée) Non finalisé (Autres effets*) (Absence d'essais d'efficacité)
Blé	0,06 mL/kg de semences	1	1,5 à 2	Semis (hiver ou printemps)	Non conforme (Rendement) (Efficacité non démontrée) Non finalisé (Autres effets*) (Absence d'essais d'efficacité)
Colza	2 mL/kg de semences	1	3,2 à 5,2	Semis (hiver ou printemps)	Non finalisé (Absence d'essais d'efficacité)

* Solubilisation des formes biologiquement indisponibles du phosphate lié et d'autres micronutriments dans le sol, augmentation de l'absorption de phosphore et de certains micronutriments dans les plantes, amélioration de la croissance des plantes (croissance des racines, croissance des pousses).

II. Résultats de l'évaluation pour les éléments de marquage obligatoire et les teneurs garanties pour une autorisation de mise sur le marché du produit B-300

Paramètres déclarables retenus	Teneurs minimales garanties retenues
<i>Penicillium bilaiae</i> souche P201	1,5x10 ⁹ cfu/g
<i>Penicillium bilaiae</i> souche P208	1,5x10 ⁹ cfu/g

III. Classification du produit B-300 au sens du règlement (CE) n° 1272/2008

Catégorie	Code H
Irritation oculaire, catégorie 2	H319 Provoque une sévère irritation des yeux
Pour les phrases P se référer à la réglementation en vigueur	

IV. Conditions d'emploi

Les conditions d'emploi précisées ci-dessous sont issues de l'évaluation, pour chaque section du dossier pour laquelle l'usage revendiqué pourrait ainsi être considéré comme conforme. Il convient de les reprendre et/ou de les adapter au regard des usages qui seront effectivement accordés.

Ne pas utiliser par des personnes immunodéprimées ou sous traitement immunosuppresseur.

La mention : « Contient *Penicillium bilaiae*. Les micro-organismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » devra être mentionnée sur l'étiquette.

Port de gants et d'un vêtement de protection appropriés, ainsi qu'un demi-masque anti-aérosol (EN149 FFP3 ou équivalent), pendant toutes les phases de traitement et manipulation des semences et de semis.

Durée maximale de stockage avant utilisation : 12 mois à des températures inférieures à 15°C dans les emballages commerciaux envisagés (bidons ou cuves en PEHD de 0,25 L à 114 L).

Mots-clés : B-300 - *Penicillium bilaiae* souches P201 et P208 - maïs – blé - colza – traitement semences - FSIM.

ANNEXE 1

Caractéristiques revendiquées par le demandeur pour une autorisation de mise sur le marché du produit B-300

Paramètres déclarables	Teneur garantie selon la déclaration du demandeur (sur produit brut)
<i>Penicillium bilaiae</i> souches P201 et P208	3 x 10 ⁹ cfu/g

Usages revendiqués par le demandeur pour une autorisation de mise sur le marché du produit B-300

(Formulaire cerfa n° 11385 du 19/12/2018)

Cultures	Dose par apport	Nombre d'apports par an	Volumes de dilution	Modes et époques d'apport
Maïs	2,6 mL pour 80 000 semences	1	0,408 à 0,8 mL/kg	Semis (printemps)
Blé	0,06 mL/kg de semences	1	150 à 200 mL/100 kg	Semis (hiver ou printemps)
Colza	2 mL/kg de semences	1	3,2 à 5,2 mL/kg	Semis (hiver ou printemps)