



Maisons-Alfort, le 29 JUIL. 2021

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'introduction dans l'environnement d'un macro-organisme non indigène utile aux végétaux

Souche non indigène HB4 de *Heterorhabditis bacteriophora* de la société E-NEMA GmbH

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a notamment pour mission l'évaluation des dossiers de produits phytopharmaceutiques et de demande d'introduction dans l'environnement de macro-organismes non indigènes. Les avis formulés par l'agence 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 et de l'absence d'effets inacceptables sur les végétaux et produits végétaux ainsi que celle de leurs autres bénéfices éventuels ;
- Une synthèse de ces évaluations, assortie de recommandations portant notamment sur leurs conditions d'emploi.

PRESENTATION DE LA DEMANDE

Dans le cadre des dispositions prévues par l'article L 258-1 et 2 du code rural et de la pêche maritime, et du décret n° 2012-140 du 30 janvier 2012¹, l'entrée sur le territoire et l'introduction de macro-organismes non indigènes sont soumises à autorisation préalable des ministres chargés de l'agriculture et de la protection de la nature, sur la base d'une analyse du risque phytosanitaire et environnemental que cet organisme peut présenter.

L'Agence a accusé réception le 27 janvier 2021 d'une demande d'autorisation d'introduction dans l'environnement de la souche non indigène HB4 du macro-organisme *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar, 1976, de la part de la société E-NEMA GmbH. Conformément au code rural et de la pêche maritime, l'avis de l'Anses est requis.

Le présent avis porte sur l'évaluation du risque sanitaire, phytosanitaire et environnemental et des bénéfices liés à l'introduction dans l'environnement de la souche non indigène HB4 du macro-organisme *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976, un nématode entomopathogène, dans le cadre d'une lutte biologique augmentative ciblant les larves de diverses espèces de coléoptères se développant dans le sol dans des cultures telles que le maïs, l'arboriculture fruitière, les cultures légumières et ornementales ainsi que dans des situations telles que les terrains de golf et de sports et le gazon.

Il est fondé sur l'examen par l'Agence du dossier de demande déposé par E-NEMA GmbH pour ce macro-organisme, conformément aux dispositions du décret n° 2012-140 du 30 janvier 2012 et à l'annexe II de l'arrêté du 28 juin 2012² relatifs à la constitution du dossier technique.

Le territoire concerné par cette demande d'introduction dans l'environnement est la France métropolitaine continentale.

¹ Décret n° 2012-140 du 30 janvier 2012 relatif aux conditions d'autorisation d'entrée sur le territoire et d'introduction dans l'environnement de macro-organismes non indigènes utiles aux végétaux, notamment dans le cadre de la lutte biologique.

² Arrêté du 28 juin 2012 relatif aux demandes d'autorisation d'entrée sur le territoire et d'introduction dans l'environnement de macro-organismes non indigènes utiles aux végétaux, notamment dans le cadre de la lutte biologique (JORF N°0151 du 30 juin 2012 page 10790).

ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

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 relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle ». L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail « Macroorganismes utiles aux végétaux ». Le résultat de cette expertise a été présenté au CES ; le présent avis a été adopté par le CES réuni le 06/07/2021.

L'Anses prend en compte les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

SYNTHESE DE L'EVALUATION

CARACTERISTIQUES DU MACRO-ORGANISME

Identification taxonomique du macro-organisme et méthodes d'identification

En l'état des connaissances, la taxonomie est la suivante :

Embranchement : Nematoda

Classe : Secernentea

Ordre : Rhabditida

Famille : Heterorhabditidae

Genre : Heterorhabditis

Espèce : *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976

L'identification du macro-organisme faisant l'objet de cette demande a été confirmée par un certificat d'identification moléculaire.

Les nématodes entomopathogènes vivent en symbiose avec des bactéries qui sont responsables de l'activité entomopathogène. Deux « entités taxonomiques » de bactérie, historiquement dénommées *Photorhabdus temperata* et *Photorhabdus luminescens*, sont capables de vivre en symbiose avec *H. bacteriophora*. Ces deux entités ont longtemps été considérées comme deux espèces présentant chacune un grand nombre de sous-espèces. Des travaux plus récents (Machado *et al.*, 2018) suggèrent d'élever chacune de ces sous-espèces au rang d'espèce. *Heterorhabditis bacteriophora* est donc capable de vivre en symbiose avec de nombreuses espèces de *Photorhabdus* telles que *P. temperata*, *P. luminescens*, *P. caribbeanensis*, *P. kayaii*, *P. kharii*, *P. thracensis*, *P. laumondii*...

Le demandeur indique que la bactérie symbiotique de la souche HB4 de *H. bacteriophora* est *P. luminescens* subsp. *laumondii* (ancienne classification) / *P. laumondii* subsp. *laumondii* (classification de Machado *et al.*, 2018). Une caractérisation moléculaire de cette bactérie symbiotique a été réalisée et attestée par un certificat d'identification moléculaire.

Conformément à l'article 4 de l'arrêté du 28 juin 2012, un échantillon d'individus de référence devra être déposé au Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP).

Description, biologie, écologie, origine et répartition du macro-organisme

L'espèce *H. bacteriophora* est un nématode entomopathogène parasite obligatoire d'insectes et strictement inféodé au sol. Les espèces du genre *Heterorhabditis* se développent principalement dans les sols sableux à limono-sableux et côtiers à texture fine et aérée et dans lesquels le taux d'humidité est élevé (Griffin *et al.*, 1994 ; Choo *et al.*, 1995 ; Koppenhöffer & Fuzy, 2006).

Les juvéniles infectieux de *H. bacteriophora* pénètrent leurs hôtes par leurs orifices naturels. Les nématodes libèrent alors, par leur orifice buccal, les cellules bactériennes de *P. laumondii* directement à l'intérieur de l'hôte. Chaque nématode contient 100 à 500 bactéries.

La bactérie se multiplie au sein de l'hôte et libère des toxines entraînant la mort de l'hôte en 24 à 48 heures. Les nématodes se multiplient et se nourrissent du cadavre de l'insecte contenant les bactéries. Plusieurs générations de nématodes vont se succéder dans le cadavre. Dès que les ressources nutritives du cadavre sont épuisées, une nouvelle génération de juvéniles infectieux émerge de l'insecte. Ces derniers se réassocient spécifiquement avec leur bactérie symbiotique : *P. laumondii*. Le complexe némato-bactérien nouvellement formé part ensuite à la recherche d'un nouvel hôte. Les premières émergences de ce complexe apparaissent 12 à 14 jours après l'infection de l'hôte. La bactérie est stockée dans les intestins du nématode jusqu'à la pénétration d'un nouvel hôte. Il est à noter que *P. laumondii* n'a jamais été isolée en dehors de son partenaire *H. bacteriophora*. Cette bactérie n'est pas en mesure de vivre seule dans le sol.

Les espèces du genre *Heterorhabditis* sont présentes sur tous les continents habitables. L'espèce *Heterorhabditis bacteriophora* est aujourd'hui signalée en Afrique du Sud (De Waal, 2008), en Argentine (De Doucet *et al.*, 1999), en Australie (Akhurst, 1987), en Chine (Akhurst, 1987), en Corée (Choo *et al.*, 1995), en Ethiopie (Mekete *et al.*, 2005), en Israël (Glazer *et al.*, 1993), en Iran (Eivazian Kary *et al.*, 2009), aux Etats-Unis (Poinar & Georgis, 1990). En Europe, cette espèce a été isolée en Croatie (Majić *et al.*, 2019), en Espagne (De Doucet & Gabbara, 1994), en France (Emelianoff *et al.*, 2008), en Grande-Bretagne (Ansari *et al.*, 2008) et en Italie (Akhurst, 1987).

En France, les observations ont été réalisées dans le Gard et dans l'Hérault. Les souches d'*H. bacteriophora* isolées étaient associées soit à *P. kayaii* (*P. luminescens* spp. *kayaii* selon l'ancienne classification) soit à *P. laumondii* (*P. luminescens* ssp. *laumondii* selon l'ancienne classification) (Emelianoff *et al.*, 2008). L'espèce *H. bacteriophora* peut donc être considérée comme indigène du territoire de la France métropolitaine continentale.

La norme EPPO³ PM 6/3 (Liste d'agents de lutte biologique largement utilisés dans la région OEPP) indique que l'espèce serait utilisée comme agent de lutte biologique depuis 1984 en Allemagne, Autriche, Belgique, France, Italie, Pays Bas, Slovénie et Suisse.

Diverses souches ont par ailleurs déjà été introduites (la plupart commercialisées) en France métropolitaine continentale et en Corse d'après les données figurant dans l'avis de l'Anses du 1^{er} Août 2014 (saisine 2012-SA-0221) et d'après l'arrêté du 26 février 2015.

L'origine de la souche à l'origine de l'élevage a été décrite. La localisation de l'élevage a également été précisée.

Utilisation et cible du macro-organisme

Ce macro-organisme sera introduit dans le cadre d'une lutte biologique augmentative ciblant les larves de plusieurs espèces de coléoptères, en particulier :

- Les larves de charançon noir de la vigne (*Otiorynchus sulcatus*) dans les pépinières, les vergers et les jardins potagers,
- Les larves de hannetons (*Phyllopertha horticola*, *Hoplia philanthis*, *Melolontha melolontha*) sur les gazons et terrains de golf et de sports,
- Les larves de de la chrysomèle des racines du maïs (*Diabrotica virgifera virgifera*).

³ EPPO / OEPP : European and Mediterranean Plant Protection Organization / Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

Selon les situations, la dose d'application préconisée est de 2,5 à 5 milliards de nématodes par hectare avec une à trois applications par an excepté contre la chrysomèle du maïs, usage pour lequel la dose est de 1 à 2 milliards de nématodes par hectare, appliquée directement dans la ligne de semis.

Contrôle de la qualité du produit

Les coordonnées du producteur, le nom commercial, la formulation, la composition du produit et les modalités d'étiquetage ont été décrits.

Les procédures relatives au contrôle qualité ont été décrites et sont considérées comme satisfaisantes.

EVALUATION DU RISQUE LIÉ À L'INTRODUCTION DU MACRO-ORGANISME DANS L'ENVIRONNEMENT

Etablissement et dispersion du macro-organisme dans l'environnement

D'après la littérature, l'espèce *H. bacteriophora* est établie dans un grand nombre de pays européens, dont la France.

D'après une publication sur la persistance de diverses espèces de nématodes entomopathogènes après application, la population de nématodes introduite décline rapidement. Des pertes considérables sont observées au moment même de l'application. Il existe de grandes différences entre les souches d'une même espèce en termes de conditions pédoclimatiques optimales. Lorsque des nématodes entomopathogènes sont appliqués dans des conditions pédoclimatiques qui diffèrent grandement de celle du lieu de collecte, la probabilité de survie dans ce nouvel habitat est réduite (Leij, 1995). Les nématodes sont affectés par la dessiccation et les UV. Ils sont confrontés à de nombreux antagonistes : acariens prédateurs du sol, collemboles, tardigrades, virus, bactéries et champignons (Leij 1995 ; Kerry, 1995). Diverses publications indiquent une persistance de plusieurs semaines. Si des hôtes potentiels sont présents et que les conditions pédoclimatiques sont favorables, la population de nématodes peut persister plusieurs années à faible niveau (Mráček, 2003).

Les capacités de dispersion naturelle de l'espèce *H. bacteriophora* ne sont pas documentées. Il apparaît néanmoins que les nématodes ont une très faible capacité intrinsèque de déplacement, de l'ordre de quelques mètres par an. Les déplacements indirects *via* des hôtes infectés ou *via* les eaux de ruissellement représentent le seul moyen naturel de dispersion.

Compte tenu de ces informations, la probabilité d'établissement en France métropolitaine continentale peut être considérée comme élevée, mais limitée aux zones françaises présentant des conditions pédoclimatiques favorables à l'espèce (sols sableux et côtiers). La probabilité de dispersion est considérée comme faible.

Risque potentiel pour la santé humaine et/ou animale

Plusieurs études n'ont montré aucune pathologie suite à l'administration de nématodes entomopathogènes ou de leurs symbiotes à diverses espèces d'animaux telles que le cochon d'inde, le rat, la souris, le lapin, la poule et le singe excepté des ulcères de la peau sur la souris lorsque *S. carpocapsae* a été administré en sous cutanée à $2 \cdot 10^4$ nématodes (Arkhuist & Smiths, 2002). Aucun effet n'a été rapporté à 10^3 nématodes dans ces mêmes conditions.

En l'état actuel des connaissances, les nématodes entomopathogènes et leurs symbiotes ne sont pas connus pour transmettre des pathogènes spécifiques de l'homme ou de l'animal et pour avoir des effets sensibilisants à l'exception de la bactérie *Photorhabdus asymbiotica*. En effet, cette espèce peut entraîner, chez l'homme, une infection des tissus mous et une bactériémie (Gerrard & Stevens, 2017). Elle semble être la seule espèce de *Photorhabdus* capable d'infecter l'homme. En l'état actuel des connaissances, *Photorhabdus asymbiotica* est strictement associée à *Heterorhabditis gerrardi* (Plichta *et al.*, 2009). Une éventuelle association entre *P. asymbiotica* et *H. bacteriophora* n'a jamais été observée. Il est à noter que *P. asymbiotica* présente une température maximale de développement de 38°C alors que celle de *P. laumondii* est de 36°C (Boemare, 2002). Une étude de génomique comparée a montré que l'espèce *P. asymbiotica* possède des facteurs de virulence spécifiques qui pourraient jouer un rôle dans la pathologie

humaine (Wilkinson, 2009). A ce jour, ces facteurs de virulence n'ont jamais été identifiés chez d'autres espèces de *Photorhabdus*. L'espèce *P. laumondii* est phylogénétiquement éloignée de *P. asymbiotica*. Ces espèces sont facilement discriminées. Par ailleurs, le complexe nématobactérien *H. bacteriophora*-*P. laumondii* est déjà commercialisé sur le territoire de la France métropolitaine continentale depuis les années 1980 sans qu'aucun effet négatif n'ait été rapporté.

Compte tenu de l'ensemble de ces éléments, il n'est pas attendu de risques pour la santé humaine ou animale.

Risque potentiel pour la santé des végétaux

Les nématodes entomopathogènes ne sont pas connus pour avoir un comportement phytophage ni pour causer de dégâts aux végétaux. Il n'est pas attendu de risques pour la santé des végétaux.

Risque potentiel pour l'environnement et la biodiversité

Risque pour les arthropodes non cibles

En ce qui concerne les arthropodes non cibles, les nématodes entomopathogènes présentent une polyphagie certaine au laboratoire. Par exemple, Poinar rapporte en 1979 que *S. carpocapsae* est capable d'infecter 250 espèces appartenant à 75 familles de 13 ordres différents. Dans une étude de laboratoire, *H. bacteriophora* a montré une capacité d'infecter plus de 25 espèces appartenant à huit ordres d'insectes (De Doucet *et al.*, 1999).

Cependant, plusieurs études au champ n'ont montré aucun impact significatif négatif sur les populations de plus de 20 familles d'arthropodes non cibles du sol suite à l'utilisation de nématodes entomopathogènes comme *S. carpocapsae*, *S. feltia*, *H. megidis* et *H. bacteriophora* dans des cultures telles que le maïs, le chou ou la canneberge et des situations telles que les forêts, les vergers ou les gazons de golf (Georgis *et al.*, 1991, Buck & Bathon 1993, Koch & Bathon, 1993).

Une étude réalisée en Hongrie sur trois champs de maïs et sur une durée de deux ans a évalué l'impact de l'utilisation d'*H. bacteriophora* sur 18 taxons d'arthropodes non cibles (Babendreier *et al.*, 2015). Lors de cette étude, l'impact de la clothianidine (insecticide néonicotinoïde retiré du marché français en 2018) et de la téfluthrine (insecticide pyréthrinoïde autorisé en traitement de semence, notamment sur maïs) ont aussi été évalués. Les applications d'*H. bacteriophora* ont entraîné une légère baisse de certains taxons et une augmentation de la plupart des taxons suggérant ainsi l'absence d'effet néfaste. En ce qui concerne les insecticides testés, une réduction de l'ensemble des communautés étudiées a été observée (à l'exception des communautés de diptères sur les parcelles traitées à la clothianidine).

Lors d'une étude réalisée sur terrain de golf aux Etats-Unis, l'impact de l'application de nématodes entomopathogènes sur les autres communautés de nématode a été évalué (Somasekhar *et al.*, 2002). Deux souches différentes d'*H. bacteriophora* et une souche d'*H. indica* ont été utilisées lors de cette étude. L'impact de chacune de ces souches a été comparé à celui du trichlorfon, une substance de la famille des organophosphorés présentant une activité sur les nématodes et interdite en France depuis 2008. Les applications de nématodes entomopathogènes n'ont pas eu d'impact sur l'abondance et la richesse spécifique des nématodes libres. Au contraire, une certaine réduction de l'abondance et de la richesse spécifique des nématodes parasites des plantes a été observée.

D'après la littérature, une phase initiale de forte densité de population de nématodes entomopathogène est observée à un niveau local après application. La taille de la population se réduit rapidement à un très faible niveau et présente une distribution en patchs reflétant la distribution des hôtes potentiels présents. Dans ces conditions, une pullulation incontrôlée des nématodes introduits dans le sol apparaît donc hautement improbable. L'exposition des arthropodes non cibles à ces nématodes sera donc réduite.

Il est à noter que peu de données scientifiques sont disponibles sur l'impact des nématodes entomopathogènes sur les communautés d'arthropodes non cibles. De nouvelles données sur ce sujet devraient être produites par la communauté scientifique afin de compléter les connaissances disponibles à ce jour.

Risques pour les autres organismes non cibles

En ce qui concerne les espèces non cibles autres que les arthropodes, certaines souches de nématodes, dont une souche d'*H. bacteriophora* originaire d'Argentine, ont entraîné la mort de têtards de la rainette du Pacifique *Pseudacris regilla* et du xénope lisse *Xenopus laevis* en laboratoire (Poinar & Thomas, 1988 ; Kermarrec *et al.*, 1991) dans des conditions de contact forcé et à dose élevée comparée aux conditions réelles d'exposition. Cette mortalité était due à l'entrée de bactéries étrangères, autres que le symbionte, via l'ouverture créée par la pénétration du nématode sur la paroi intestinale des jeunes têtards. Aucun effet négatif sur les adultes n'a été rapporté. Néanmoins, aucun impact sur les jeunes têtards n'a été observé lors d'essais réalisés en aquariums à fond sableux à des doses similaires (Jung, communication personnelle dans Elhers & Peters, 2003). Dans ces conditions plus réalistes d'exposition les nématodes sédimentent immédiatement dans la couche sableuse et n'affectent pas les têtards.

De plus, l'exposition des espèces de batraciens aux nématodes entomopathogènes est limitée aux eaux de ruissellement et à la dérive de pulvérisation. Compte tenu des caractéristiques biologiques et comportementales des nématodes entomopathogènes et du fait que les batraciens ne sont pas des hôtes naturels des nématodes entomopathogènes, la probabilité de contact entre ces organismes peut être considérée comme faible. Dans ces conditions, il paraît peu probable que des effets négatifs sur les communautés de ces espèces non cibles puissent intervenir.

Conclusion relative aux risques potentiels pour l'environnement et la biodiversité

Les nématodes entomopathogènes sont utilisés sur tous les continents depuis le milieu des années 1980 (Poinar & Grewal, 2012). En particulier, plusieurs souches d'*H. bacteriophora* ont été commercialisées en France métropolitaine continentale sans qu'aucun impact négatif sur l'environnement et la biodiversité n'ait été rapporté. De plus, cette espèce peut être considérée comme indigène de ce territoire.

Le risque pour l'environnement et la biodiversité est donc considéré comme faible, et n'est, par ailleurs, pas amplifié par rapport à celui préexistant lié aux populations d'*H. bacteriophora* déjà établies ou commercialisées sur le territoire de la France métropolitaine continentale.

Efficacité et bénéfices du macro-organisme

Le pétitionnaire a fourni les résultats de plusieurs essais permettant d'évaluer l'efficacité de *H. bacteriophora* sur les charançons du genre *Otiorhynchus* :

- Dans un essai réalisé en chambre climatique, 20 larves de diverses espèces d'*Otiorhynchus* ont été placées dans des pots avant application de *H. bacteriophora*. Cette étude a montré une efficacité de 80 %, 52 % et 98 % respectivement contre *Otiorhynchus salicola*, *Otiorhynchus armadillo* et *Otiorhynchus dieckmanii* 3 semaines après application à une dose de 2500 individus de *H. bacteriophora* par pot.
- Lors d'un essai de laboratoire, la DL50 d'*H. bacteriophora* HB4 sur *Diabrotica virgifera* est d'environ 3 nématodes par larve. Cette DL50 était moins élevée que celles de deux autres souches d'*H. bacteriophora*, montrant ainsi l'intérêt de cette nouvelle souche.

L'expérience acquise au cours de l'utilisation commerciale de l'espèce *H. bacteriophora* dans divers pays européens témoigne de l'intérêt de cette espèce pour lutter contre certaines espèces de coléoptères. Plusieurs publications attestent de cet intérêt :

- Une expérimentation réalisée en plein champ sur deux sites en Slovénie pendant deux à trois ans a évalué le niveau d'efficacité d'applications de *H. bacteriophora* dans la ligne de semis de maïs pour lutter contre *Diabrotica virgifera*. Selon les années et les sites, le niveau d'efficacité variait de 21 % à 67 %. A titre comparatif, le thiaclopride (insecticide néonicotinoïde retiré du marché français en 2018) présentait un niveau d'efficacité de 3 à 52 % et la téfluthrine de 8 à 76 % (Modic *et al.*, 2020).
- Une étude réalisée sur gazon de golf en Allemagne a montré qu'une application d'*H. bacteriophora* présentait un niveau d'efficacité sur *Phyllopertha horticola* de 65 % et 83 % aux doses respectives de 0,5 et 1,5 million d'individus au m² (Sulistyanto & Ehlers, 1996).
- Des données de laboratoire ont montré une efficacité de 24 % et de 9 % sur *Melolontha melolontha* à des doses respectives de 5000 et 1500 individus par larve de 1^{er} stade. Sur larves de 2nd stade, ces niveaux d'efficacité étaient respectivement de 3 % et de 5 % (Peters, 2000). L'efficacité de *H. bacteriophora* sur *M. melolontha* est donc insuffisante.

- Lors de deux essais réalisés sur gazon sur un an en Belgique, *H. bacteriophora* a montré un niveau d'efficacité sur *Hoplia philanthus* de 40 à 45 % sept semaines après application et de 60 à 65 % un an après application à la dose de 250.000 individus par m². En combinaison avec le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, le niveau d'efficacité était de près de 100 % dès sept semaines après application (Ansari *et al.*, 2006).
- Lors d'un essai réalisé sur fraisier en laboratoire, une application de *H. bacteriophora* à une dose comprise entre 6000 et 7500 individus par plante a entraîné une mortalité moyenne de 93 % des larves d'*Othiorynchus sulcatus* (Susurluk & Ehlers, 2008).

Les bénéfices de l'utilisation du macro-organisme, objet de la demande, en tant qu'agent de lutte biologique, sont reconnus.

CONCLUSIONS

Compte tenu des éléments disponibles et en l'état actuel des connaissances :

- La probabilité d'établissement du macro-organisme, objet de la demande, sur les territoires de la France métropolitaine peut être considérée comme élevée. La probabilité de dispersion peut être considérée comme faible.
- Il n'est pas attendu de risques pour la santé humaine ou animale.
- Il n'est pas attendu de risques pour la santé des végétaux.
- Le risque pour l'environnement et la biodiversité est considéré comme faible, et n'est, par ailleurs, pas amplifié par rapport à celui préexistant lié aux populations d'*H. bacteriophora* déjà établies ou commercialisées sur le territoire de la France métropolitaine continentale.
- Les bénéfices potentiels de l'utilisation du macro-organisme, objet de la demande, en tant qu'agent de lutte biologique, sont reconnus.

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 à la demande d'autorisation d'introduction dans l'environnement du macro-organisme non indigène *Heterorhabditis bacteriophora* souche HB4 de la société E-NEMA GmbH sur le territoire de la France métropolitaine continentale.

Conformément à l'article 4 de l'arrêté du 28 juin 2012, un échantillon d'individus de référence devra être déposé au Centre de Biologie et de Gestion des Populations (CBGP).

Pour le directeur général,
par délégation,
le directeur
Directeur de l'évaluation des produits réglementés

Thierry MERCIER

Mots-clés : *Heterorhabditis bacteriophora*, Nématodes EntomoPathogènes NEP, EntomoPathogenic Nematodes EPN, agent non indigène, macro-organisme, lutte biologique, lutte augmentative, coléoptères ravageurs, France métropolitaine continentale.

BIBLIOGRAPHIE

Dans le cadre de cet avis, l'Anses a identifié les publications pertinentes suivantes :

- Akhurst R. J. (1987). Use of starch gel electrophoresis in the taxonomy of the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 33, pp. 1-9
- Akhurst R. J. & Smith K. (2002). Regulation and safety. Dans: Gaugler R. (Ed.) *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp-311-332.
- Ansari A. M., Shah F., Tirry L. & Moens M. (2006). Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control* 39, pp. 453-459.
- Ansari A. M., Shah F., & Butt T. (2008). First report of *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) from UK. *Nematology*, 10(2), pp. 289-291.
- Babendreier D., Jeanneret P., Pilz C. & Toepfer S. (2015). Non-target effects of insecticides, entomopathogenic fungi and nematodes applied against western corn rootworm larvae in maize. *Journal of Applied Entomology* 139, pp. 457-467.
- Boemare N. (2002) *Biology, Taxonomy and Systematics of Photorhabdus and Xenorhabdus* dans Gaugler R. (Ed.) *Entomopathogenic Nematology*. pp. 35-56. Wallingford, CABI Publishing.
- Buck M. & Bathon H. (1993). Auswirkungen des Einsatzes entomopathogener Nematoden (*Heterorhabditis* sp.) im Freiland auf die Nichtzielfauna, 2. Teil: Diptera. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 66, pp. 84-88.
- Choo H. Y., Kaya H. K. & Stock S. P. (1995). Isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea. *Japanese Journal of Nematology* 25 (1), pp. 44-51.
- De Doucet M. M. A. & Gabarra R. (1994). On the occurrence of *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) (Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Heterorhabditidae) in Catalogne, Spain. *Fundamental and Applied Nematology* 17, pp. 441-443.
- De Doucet M. M. A., Bertolotti M. A., Giayetto A. L. & Miranda M. B. (1999). Host Range, Specificity, and Virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum* and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 73 (3), pp. 237-242.
- De Waal J. Y. (2008). Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the control of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) under South African conditions. Mémoire de fin d'étude. Université de Stellenbosch. Afrique du Sud.
- Elhers R. U. & Peters A. (2003). Entomopathogenic nematodes in biological control: feasibility, perspectives and possible risks. Dans Hokkanen H.M.T. & Lynch J.M. (Ed.) *Biological Control: Benefits and Risks*. pp. 119-137. Cambridge University Press.
- Eivazian Kary N., Gholamreza N., Griffin C., Seyed M. & Moghaddam M. (2009). A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the north-west of Iran. *Nematology* 11, pp. 107-116.
- Emelianoff V., Le Brun N., Pagès S., Stock P., Tailliez P., Moulia C. & Sicard M. (2008). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). *Journal of Invertebrate Pathology* 98 (2), pp. 211-217.
- Georgis R., Kaya H. K. & Gaugler R. (1991). Effect of steinernematid and heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on non-target arthropods - *Environmental Entomology*, 20 (3), pp. 815-822.

- Gerrard J. G. & Stevens R. P. (2017). A Review of Clinical Cases of Infection with *Photorhabdus asymbiotica* - Current Topics in Microbiology and Immunology 402, pp. 179-191.
- Glazer I., Liran N., Poinar G. O. Jr. & Smits P. H. (1993). Identification and biological activity of newly isolated heterorhabditid populations from Israel. *Fundamental and Applied Nematology* 16, pp. 467-472.
- Griffin C. T., Joyce S. A., Dix I., Burnell A. M. & Downes M. J. (1994). Characterisation of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from Ireland and Britain by molecular and cross-breeding techniques, and the occurrence of the genus on these islands. *Fundamental and Applied Nematology* 20, pp. 211-216.
- Kermarrec A., Mauléon H., Sirjusingh H., Baud L. (1991). Etude expérimentale de la sensibilité de vertébrés hétérothermes tropicaux (crapaud, grenouilles, lézards) à diverses souches de nématodes entomoparasites des genres *Heterorhabditis* et *Steinernema*. Colloques INRA n°58 Rencontres Caraïbes en Lutte Biologique, Guadeloupe, 5-7 novembre 1990, Ed. INRA Paris.
- Kerry B. (1995). The potential impact of natural enemies on the survival and efficacy of entomopathogenic nematodes dans Griffin, C. T., Masson, J. P. and Gwynn, R. L. (ed.) Ecology and transmission strategies of entomopathogenic nematodes. Report COST 819. European Commission, Luxembourg. pp. 7-13.
- Koch U. & Baton H. (1993). Auswirkungen des Einsatzes entomopathogener Nematoden im Freiland auf die Nichtzielfauna, 1. Teil: Coleoptera. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz* 66:65–68.
- Koppenhöfer A. M. & Fuzy E. M. (2006). Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology* 92 (1), pp. 11-22.
- Leij F. A. A. M. (1995). Survival of entomopathogenic nematodes in soil dans Griffin, C. T., Masson, J. P. and Gwynn, R. L. (ed.) Ecology and transmission strategies of entomopathogenic nematodes. Report COST 819. European Commission, Luxembourg. pp. 1-6.
- Machado R. A. R., Wüthrich D., Kuhnert P., Arce C. C. M., Thönen, L., Ruiz C., Zhang X., Robert C. A. M., Karimi J., Ma J., Bruggmann R. & Erb M. (2018). Whole-genome-based revisit of *Photorhabdus* phylogeny: proposal for the elevation of most *Photorhabdus* subspecies to the species level and description of one novel species *Photorhabdus bodei* sp. nov., and one novel subspecies *Photorhabdus laumondii* subsp. *clarkei* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, pp. 2664-2681.
- Majić I., Ankica S., Lakatos T., Tóth T., Emilija R., Zlatko P., Gabriella S. & Žiga L. (2019). Virulence of new strain of *Heterorhabditis bacteriophora* from Croatia against *Lasioptera rubi*. *Plant Protection Science* 55 (10), pp. 134-141.
- Mekete T., Gaugler R., Nguyen K. B., Mandefro W. & Tessera M. (2005). Biogeography of entomopathogenic nematodes in Ethiopia. *Nematropica* 35 (1), pp. 31-36.
- Modic Š., Žigon P., Kolmanič A., Trdan S. & Razinger J. (2020). Evaluation of the field efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae) and synthetic insecticides for the control of western corn rootworm larvae. *Insects* 11, 202, doi:10.3390/insects11030202
- Mráček, Z. (2003). Use of Entomoparasitic Nematodes (EPANs) in Biological Control dans Upadhyay, R. K. (Ed.) *Advances in Microbial Control of Insect Pests*. pp. 235-264. Kluwer Academic Plenum, Dordrecht
- Peters A. (2000). Susceptibility of *Melelolontha melolontha* to *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis* and *Steinernema glaseri*. *IOBC/WPRS bulletin* 23(8), pp. 39-46.

- Plichta K. L., Joyce S. A., Clarke D., Waterfield N., Stock S. P. (2009). *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: gamma-Proteobacteria). *Journal of Helminthology* 83(4), pp. 309-20.
- Poinar G. O. Jr. (1979). *Nematodes for Biological Control of Insect*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 277.
- Poinar G. O. Jr. & Thomas G.M. (1988). Infection of frog tadpoles (Amphibia) by insect parasitic nematodes (Rhabditida). *Experientia* 44, pp. 528–531
- Poinar G. O. Jr., & Georgis R. (1990). Description and field application of the HP88 strain of *Heterorhabditis bacteriophora*. *Revue de Nematologie* 13, pp. 387-393.
- Poinar G. O. Jr. & Grewal P. S. (2012). History of entomopathogenic nematology. *Journal of Nematology*, 44(2), pp. 153-161
- Somasekhar N., Grewal P. S., De Nardo E. A. B. & Stinner B. R. (2002), Non-target effects of entomopathogenic nematodes on the soil nematode community. *Journal of Applied Ecology* 39, pp. 735-744.
- Sulistyanto D. & Ehlers R.U. (1996). Efficacy of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis megidis* and *Heterorhabditis bacteriophora* for the control of grubs (*Phyllopertha horticola* and *Aphodius contaminatus*) in Golf Course Turf. *Biocontrol Science and Technology* 6 (2), pp. 247-250.
- Susurluk A. & Ehlers R. U. (2008). Sustainable control of black vine weevil larvae, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) with *Heterorhabditis bacteriophora* in strawberry. *Biocontrol Science and Technology* 18 (6), pp. 627-632.
- Wilkinson P., Waterfield N. R., Crossman L., Corton C., Sanchez-Contreras M., Vlisidou I., Barron A., Bignell A., Clark L., Ormond D., Mayho M., Bason N., Smith F., Simmonds M., Churcher C., Harris D., Thompson N. R., Quail M., Parkhill J. & Constant R. H. (2009). Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. *BMC Genomics*, 10, pp. 302.