



**HAL**  
open science

## Risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation des insecticides microbiens à base de **Bacillus thuringiensis**

Armel Gallet, Salma Hachfi, Alexandra Brun-Barale, Arnaud Fichant, Patrick Munro, Marie-Paule Nawrot-Esposito, Gregory Michel, Raymond Ruimy, Raphaël Rousset, Mathilde Bonis, et al.

► **To cite this version:**

Armel Gallet, Salma Hachfi, Alexandra Brun-Barale, Arnaud Fichant, Patrick Munro, et al.. Risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation des insecticides microbiens à base de *Bacillus thuringiensis*. *Les Cahiers Espace, Environnement, Risques et Résilience*, 2024, 1. hal-04403793

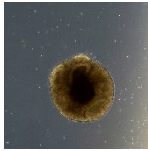
**HAL Id: hal-04403793**

**<https://hal.science/hal-04403793>**

Submitted on 18 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



### Highlight

## Risques pour la santé et l'environnement liés à l'utilisation des insecticides microbiens à base de *Bacillus thuringiensis*

D'après les travaux issus du projet [BtSI2S](#) soutenu par l'Académie 3, Université Côte d'Azur et publiés dans: Salma Hachfi<sup>1,2</sup>, Alexandra Brun-Barale<sup>1</sup>, Arnaud Fichant<sup>1,3</sup>, Patrick Munro<sup>2</sup>, Marie-Paule Nawrot-Esposito<sup>1</sup>, Gregory Michel<sup>2</sup>, Raymond Ruimy<sup>2,4</sup>, Raphaël Rousset<sup>1</sup>; Mathilde Bonis<sup>3</sup>, Laurent Boyer<sup>2</sup> and Armel Gallet<sup>1</sup>: "Ingestion of *Bacillus cereus* spores dampens the immune response to favor bacterial persistence" (2023). *bioRxiv (Nature Comm)*

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.16.532769v1.full>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, INRAE, ISA, Sophia Antipolis

<sup>2</sup>Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, Nice

<sup>3</sup>Anses (Laboratoire de Sécurité des Aliments), Université Paris-Est

<sup>4</sup>Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Archet 2, Université Côte d'Azur, Nice

La population mondiale a atteint les 8 milliards en 2022 et l'on prévoit d'atteindre un effectif de plus de 9 milliards en 2050, selon les estimations de l'[Insee](#). L'un des enjeux majeurs de cet accroissement démographique est l'augmentation de notre production alimentaire, dans le respect de notre planète et de ses écosystèmes. Pour cela, les pratiques agricoles commencent à évoluer et tendent à réduire l'utilisation de pesticides chimiques au profit d'alternatives dites de biocontrôle, considérées comme plus respectueuses de l'environnement. Les biopesticides (aussi appelé produits de biocontrôle) font d'ores et déjà l'objet d'une utilisation croissante dans la lutte contre les nuisibles et les adventices ("mauvaises herbes"). Bien qu'actuellement leur proportion ne représente que 8% de l'ensemble des produits phytosanitaires, l'objectif est d'atteindre 50 % du marché global des pesticides d'ici à 2050 ([Damalas and Koutroubas, 2018](#); [Willer and Lernoud, 2018](#)). Cet objectif est d'ailleurs soutenu par différentes incitations gouvernementales, comme c'est le cas en France avec le plan d'action [Ecophyto II+](#), qui vise à réduire de moitié l'utilisation des pesticides chimiques d'ici 2030, ce qui aura pour conséquence une nette augmentation de l'usage et donc de la dispersion, des biopesticides dans l'environnement.

Les bactéries du genre *Bacillus* constituent une source prometteuse d'agents de biocontrôle efficaces. Nombre d'entre elles sont dotées de propriétés exploitables en agriculture, telles que la stimulation de la croissance des végétaux, l'activation de leurs défenses naturelles, ou encore leur protection contre différents bioagresseurs, via la production d'antibiotiques, d'antifongiques et de substances entomopathogènes ([Shafi et al., 2017](#)). De plus, les *Bacillus* sont généralement utilisés sous forme de spores, dont la production et la conservation sont aisées et peu onéreuses, constituent un atout supplémentaire. L'une d'entre elles, nommée *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), occupe la première place du marché mondial des biopesticides, avec 50 % des parts de marché total et couvre 69% des surfaces cultivées certifiées "agriculture biologique" ([Bonis and Gallet, 2020](#)). Le recours à *Bt* ne se limite d'ailleurs pas à la lutte contre divers insectes ravageurs (Lépidoptères et Coléoptères pour la plupart) en agriculture conventionnelle ou biologique. Il donne également lieu à des usages biocides importants dans la lutte anti-vectorielle contre les larves de moustiques (des genres *Aedes* et *Culex*), ainsi qu'en sylviculture dans la lutte contre la chenille processionnaire du pin. De fait, les bioinsecticides *Bt* sont

les seconds produits insecticides (chimiques et biologiques confondus) les plus vendus dans le monde avec 32 000 de tonnes par an (Casida and Bryant, 2017).

*Bt* est une bactérie opportuniste sporulante appartenant au groupe phylogénétique *Bacillus cereus* (*Bc*) (Carroll et al., 2020). Les spores bactériennes sont des formes "dormantes" extrêmement résistantes aux stress environnementaux (UV, chaleur, sécheresse, congélation...) et chimiques (désinfectants, détergents...). De fait, les spores peuvent persister longtemps dans la nature ou l'environnement hospitalier (Setlow, 2014). Les bactéries opportunistes du groupe *Bc* ont été responsables en 2019 de 355 Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) en France correspondant à 3143 malades, 83 hospitalisations et 6 décès). Le groupe *Bc* était la 2<sup>ème</sup> cause de TIAC en France depuis 2011 derrière *Staphylococcus aureus* puis est devenu la 1<sup>ère</sup> en 2021 ([données Santé publique France](#)). Au niveau européens, le groupe *Bc* est la 3<sup>ème</sup> cause de TIAC après *Salmonella spp* et *Staphylococcus aureus* (EFSA and ECDC, 2018) mais ce chiffre est probablement sous-estimé car tous les pays ne font pas une recherche systématique de bactéries du groupe *Bc* dans les événements de TIAC. Les facteurs bactériens responsables des symptômes diarrhéiques sont des entérotoxines produites par la bactérie végétative, c'est-à-dire la forme bactérienne biologiquement active et proliférative en opposition à la spore inactive.

Ce qui différencie *Bt* parmi le groupe *Bc*, c'est qu'au cours de la sporulation, *Bt* produit des toxines insecticides nommées Cry enfermées dans un cristal. La spécificité d'action de certaines toxines Cry envers des nuisibles a conduit à la sélection de souches de *Bt* pour leur utilisation en agriculture. Les bioinsecticides *Bt* sont un mélange de spores de *Bt* et de cristaux de toxines Cry. Après ingestion du produit par les insectes cibles, les cristaux sont dissouts. Les toxines Cry ainsi libérées et activées détruisent le tube intestinal créant des brèches dans l'épithélium permettant aux bactéries (spores de *Bt* ayant germées) de traverser la barrière intestinale et de pénétrer dans le milieu intérieur, provoquant une septicémie. *Bt* tue le ravageur ciblé en 2-3 jours (Ehling-Schulz et al., 2019). Les bioinsecticides *Bt*, sont épanchés par des moyens terrestres ou aériens. De par leur mode d'action, les bioinsecticides *Bt* respectent en termes de toxicité aiguë les autres espèces de l'écosystème, dont l'homme. Cependant, bien que de nombreuses études (principalement sur les mammifères) aient démontré l'innocuité de l'utilisation de ces produits pour les organismes non cibles sur une courte période (toxicité aiguë), on ne sait pas grand-chose sur les effets indésirables potentiels d'une exposition sur plusieurs décennies (toxicité chronique). L'accroissement de leur utilisation augmente leur présence dans l'air, l'eau et la nourriture, trois sources potentielles de contamination pour l'Homme et la faune. De plus, l'instabilité des cristaux de toxines Cry (Hung et al., 2016) nécessite bien souvent le renouvellement des traitements. A ce titre l'UE autorise jusqu'à 8 traitements successifs espacés d'une semaine dont la conséquence est l'accumulation des spores et donc l'augmentation de la charge bactérienne. D'ailleurs, dès juillet 2013, l'Anses a souligné le manque d'études sur les effets à long terme des bioinsecticides *Bt* et sur la probable sous-estimation de l'implication de *Bt* dans des TIAC, avis partagé par l'EFSA en 2016 ([ANSES Saisine n° 2013-SA-0039, 2013](#); [EFSA BIOHAZ, 2016](#)). En effet, les analyses microbiologiques effectuées suite à la survenue de TIAC ne distinguent pas *Bt* parmi le groupe *Bc*. Une analyse rétrospective du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'Anses sur 250 événements de TIAC imputées au groupe *Bc* a montré que *Bt* était présent dans 20% des TIAC analysées, *Bt* étant même le seul germe identifié dans 8% des cas et correspondait aux souches utilisées en agriculture (Bonis et al., 2021). **Ainsi, l'utilisation croissante de *Bt* en agriculture, sa présence avérée dans les aliments et la grande capacité de ses spores à résister aux stress forcent à s'interroger sur le comportement et le devenir des spores de *Bt* une fois dans l'intestin et sur les mécanismes de défenses mis en place par l'hôte.**

La réponse immunitaire innée intestinale est le principal moyen de défenses des organismes contre les bactéries opportunistes (telles les bactéries du groupe *Bc*) ingérées avec la nourriture. Cette réponse est rapide (en moins de 24h) et efficace chez des organismes sains. Par contre elle est compromise chez des organismes affaiblis, stressés, immunodéprimés, immatures ou âgés rendant de

fait le terrain favorable à l'expression de la pathogénicité des bactéries opportunistes. Cependant, lors d'épisode de TIAC avec plus de 50 malades (les principaux symptômes étant douleurs abdominales et diarrhées avec parfois vomissement), l'hypothèse d'une réponse immunitaire innée affaiblis chez tous les patients est peu probable. En effet, ces épisodes de TIAC surviennent en restauration commerciale, cantines scolaires ou restaurants d'entreprise, où chaque individu a une histoire de vie et un état physiologique différent mais avec, en général, une réponse immunitaire innée fonctionnelle. Alors, comment peut-on expliquer ses évènements de TIAC impliquant un grand nombre de malades?

Le projet [BtSI2S](#) s'intéresse justement aux interactions biologiques établies entre l'hôte et les spores du groupe *Bc* (dont *Bt*) ingérées avec la nourriture chez des organismes en bonne santé. La physiologie intestinale est extrêmement bien conservée dans le règne animal. Quel que soit l'organisme (une étoile de mer ou un humain), l'intestin a deux grandes fonctions: la nutrition (digestion des aliments et absorption des nutriments) et la défense contre les microbes ingérés avec les aliments. Dans ce projet, l'utilisation de deux modèles animaux, la drosophile (mouche du vinaigre) et la souris, ont permis de mieux comprendre comment *Bt* (et plus largement les bactéries du groupe *Bc*) était à l'origine d'intoxications alimentaires. Le modèle drosophile offre de nombreux outils génétiques, cellulaires et moléculaires permettant d'identifier les processus physiologiques mis en jeu en présence de *Bt* dans l'intestin. De manière plus générale, ce modèle insecte permet de mieux comprendre l'impact que *Bt* pourrait avoir sur l'environnement. C'est aussi une étape préalable avant des études chez les mammifères. En effet, pour une approche éthique de l'expérimentation animale, les résultats obtenus grâce à l'utilisation de la drosophile permettent de réduire fortement le nombre d'expérimentations chez la souris.

Alors que la majorité des autres bactéries ingérées avec l'alimentation sont sous formes végétatives, la particularité des bactéries du groupe *Bc* est qu'elles sont la plupart du temps ingérées sous formes de spores. Quand des bactéries végétatives sont ingérées, l'environnement gastrique acide puis les sels biliaires tuent la grande majorité. Les bactéries végétatives survivantes vont être ensuite rapidement détectées par l'intestin grêle antérieur (le duodénum) et deux mécanismes de défenses immunitaires vont être mis en place pour les combattre: la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la production de peptides antimicrobiens (antibiotiques naturels produits par les intestins de tous les organismes, y compris l'humain). Le projet [BtSI2S](#) a permis de montrer que suite à l'ingestion de formes végétatives de bactéries du groupe *Bc*, ces dernières sont éliminées en moins de 4h sans déclencher de diarrhées. A l'inverse, le projet a permis de montrer que, chez la drosophile comme chez la souris, l'ingestion de spores du groupe *Bc* (dont des spores *Bt* utilisées en agriculture) ne déclenchait aucune réponse immunitaire (ni production de ROS, ni de peptides antimicrobiens), qu'elle déclenchait des diarrhées et que les bactéries persistaient jusqu'à 10 jours dans l'intestin. En fait, les spores résistent à l'acidité de l'intestin et aux sels biliaires. Elles ne sont pas non plus détectées par le système immunitaire innée du duodénum. En conséquence, les spores atteignant la partie postérieure de l'intestin grêle (le jéjunum et l'iléon) y germent pour donner naissance aux formes végétatives. Hors le jéjunum et l'iléon sont dotés d'une réponse immunitaire innée faible car c'est le lieu de résidence de la flore commensale (du microbiote). Cette réponse immunitaire réduite permet de maintenir sous contrôle le développement de la flore commensale sans la détruire. A contrario, une réponse immunitaire trop efficace éliminerait les bactéries bénéfiques du microbiote avec pour conséquence un effet délétère sur la santé. Cet environnement immunitaire intestinal est donc favorable à la persistance des formes végétatives des bactéries du groupe *Bc* et à la production des entérotoxines responsables des symptômes diarrhéiques. De plus le projet a permis de montrer que la présence des formes végétatives de *Bc/Bt* dans le jéjunum et l'iléon avait une action répressive sur la réponse immunitaire innée intestinale, induisant ainsi un cercle vicieux favorisant leur persistance. Ainsi, les bactéries du groupe *Bc*, lorsqu'elles sont ingérées sous formes de spores, se comportent comme des fantômes vis-à-vis de la réponse immunitaire innée du duodénum leur permettant d'atteindre le jéjunum et l'iléon où elles sont perçues comme des

bactéries de la flore commensale, leur laissant toute liberté de produire des entérotoxines et déclencher des diarrhées.

Ainsi, les travaux issus de ce projet apportent des explications quant à la survenue de TIAC incluant un grand nombre d'individus physiologiquement disparates. L'apparition des symptômes n'est en rien due à une réponse immunitaire affaiblie chez tous les sujets (individus stressés, immunodéprimés, âgés...) mais à l'ingestion de spores et à leur astucieuse stratégie pour atteindre une région de l'intestin où elles pourront se développer et produire leurs entérotoxines. Une question encore en suspens est: quelle quantité de spores doit être ingérée pour déclencher une intoxication alimentaire? Le groupe *Bc* ne faisant pas l'objet d'un contrôle microbiologique réglementaire en agroalimentaire, aucune dose maximale n'est imposée dans les aliments. L'Anses préconise quand même la dose maximale de [10<sup>5</sup> spores/g d'aliment](#). Bon nombres d'entreprises du secteur agroalimentaire se réfèrent à cette préconisation et ont mis en place des contrôles microbiologiques internes. Cependant, dans le cas précis des spores de *Bt* utilisées en agriculture pour traiter les cultures de fruits et légumes, il n'y pas de contrôle microbiologique car les produits ne sont pas transformés mais vendus crus (brutes) aux consommateurs. L'agriculture conventionnelle et biologique utilisant les spores de *Bt*, il est maintenant nécessaire d'améliorer les pratiques agricoles pour limiter la présence de spores sur les fruits et légumes. Les produits *Bt* font actuellement l'objet de discussions au sein de la Commission européenne, dans le cadre de leur demande de ré-approbation, et à ce titre, plusieurs Etats membres plaident pour des changements dans la réglementation de ces produits. Par exemple, imposer un délai avant récolte après traitement et des doses maximales utilisables.

Il y a aussi un biais de perception par les consommateurs des produits issus de l'agriculture biologique. L'idée qu'un produit "bio" est forcément "bon pour la santé" est fortement ancrée dans l'opinion publique. Par conséquent, les gens ne lavent pas systématiquement ou soigneusement les fruits et légumes "bio" avant de les manger, pensant qu'il n'y a pas de traitement phytosanitaire. Les allégations publicitaires autour du "bio=bon" sont en grande partie responsable de ce biais de perception. L'agriculture biologique est évidemment plus vertueuse et respectueuse de l'environnement que l'agriculture conventionnelle. Néanmoins, il est indispensable d'informer le consommateur que l'agriculture "bio" utilise aussi des produits phytosanitaires (appartenant à la [liste des produits de biocontrôle](#) autorisés en Agriculture Biologique) pour lutter contre les ravageurs et que parmi ces produits, il y a des bactéries (*Bt*), des virus ou d'autres microorganismes pouvant avoir des effets indésirables si ingérés en trop grande quantité par le consommateur. Il y a également deux agricultures biologiques avec des concepts économiques différents. Il y a l'agriculture "bio" intensive, produisant de grande quantité de fruits et légumes, souvent loin de leur lieu de vente et de consommation. Ce mode de culture doit être fortement rentable et utilise donc plus de produits phytosanitaires. Parallèlement, il y a la production "bio" locale, faisant suite à un choix philosophique ou à une prise de conscience de l'agriculteur. Ce sont en général des exploitations de petites tailles, avec une distribution locale. L'agriculteur "bio", de par sa prise de conscience, limite de lui-même le nombre de traitements et la quantité de produits utilisés. Cette démarche vertueuse est à souligner mais malheureusement la distinction n'est que trop rarement faite entre le fruit "bio" qui provient d'énormes exploitations à l'autre bout de la planète et le fruit "bio" produit par une petite exploitation locale. Quoi qu'il en soit, d'où que le produit provienne, qu'il soit "bio" ou pas, le meilleur conseil est de bien laver ses fruits et légumes.

## Références

**ANSES Saisine n° 2013-SA-0039.** (2013). 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. Saisine n°2013-SA-0039, <https://www.anses.fr/fr/system/files/DPR2013sa0039.pdf>.

- Bonis, M., Felten, A., Pairaud, S., Dijoux, A., Maladen, V., Mallet, L., Radomski, N., Duboisset, A., Arar, C., Sarda, X. et al.** (2021). Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of *Bacillus thuringiensis* associated with foodborne outbreaks in France. *PLoS One* **16**, e0246885.
- Bonis, M. and Gallet, A.** (2020). Risques pour la santé et la biodiversité liés à l'utilisation d'un bioinsecticide majeur. In *Biocontrôle: Éléments pour une protection agroécologique des cultures*, (ed. Quae), pp. 376.
- Carroll, L. M., Wiedmann, M. and Kovac, J.** (2020). Proposal of a Taxonomic Nomenclature for the *Bacillus cereus* Group Which Reconciles Genomic Definitions of Bacterial Species with Clinical and Industrial Phenotypes. *MBio* **11**.
- Casida, J. E. and Bryant, R. J.** (2017). The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry. *Toxicol Res (Camb)*. **6**, 755-763. doi: 10.1039/c7tx00198c. eCollection 2017 Nov 1.
- Damalas, C. A. and Koutroubas, S. D.** (2018). Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. *Agriculture* **8**, 13.
- EFSA and ECDC.** (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* **16**, e05500.
- EFSA BIOHAZ.** (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal* **14**, e04524.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D. and Koehler, T. M.** (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr.* **7(3)**. 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
- Hung, T. P., Truong, L. V., Binh, N. D., Frutos, R., Quiquampoix, H. and Staunton, S.** (2016). Fate of insecticidal *Bacillus thuringiensis* Cry protein in soil: differences between purified toxin and biopesticide formulation. *Pest Manag Sci.* **72**, 2247-2253. doi: 10.1002/ps.4262.
- Setlow, P.** (2014). Spore Resistance Properties. *Microbiol Spectr* **2(5)**. 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012.
- Shafi, J., Tian, H. and Ji, M.** (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **31**, 446-459.
- Willer, H. and Lernoud, J.** (2018). *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2018.*: FiBL, Frick, and IFOAM- Organics International - Bonn.