



information



formation



recherche



coopération
internationale

LARVICIDES POUR CONTRER LA TRANSMISSION DU VIRUS DU NIL OCCIDENTAL CHEZ LES HUMAINS

INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC

RAPPORT FINAL

LARVICIDES POUR CONTRER LA
TRANSMISSION DU VIRUS DU NIL
OCCIDENTAL CHEZ LES HUMAINS

DIRECTION DES RISQUES BIOLOGIQUES,
ENVIRONNEMENTAUX ET OCCUPATIONNELS

MARS 2002

AUTEURS

Pierre Chevalier, Ph.D.
Unité de recherche en santé publique
Centre de recherche du Pavillon CHUL

Louis St-Laurent, M.Sc.
Institut national de santé publique du Québec

Onil Samuel, B.Sc.
Institut national de santé publique du Québec

Daniel G. Bolduc, M.Env.
Institut national de santé publique du Québec

REMERCIEMENTS

Merci à M. Jacques Boisvert (Université du Québec à Trois-Rivières) pour ses commentaires suite à la lecture de ce rapport.

*Ce document est disponible en version intégrale sur le site Web de l'INSPQ : <http://www.inspq.qc.ca>
Reproduction autorisée à des fins non commerciales à la condition d'en mentionner la source.*

CONCEPTION GRAPHIQUE
Marie Pier Roy

DOCUMENT DÉPOSÉ À SANTÉCOM ([HTTP://WWW.SANTECOM.QC.CA](http://www.santecom.qc.ca))
COTE : INSPQ-2002-012

DÉPÔT LÉGAL – 2^e TRIMESTRE 2002
BIBLIOTHÈQUE NATIONALE DU QUÉBEC
BIBLIOTHÈQUE NATIONALE DU CANADA
ISBN 2-550-39330-9

© Institut national de santé publique du Québec(2002)

AVANT PROPOS

Les Québécois n'ont pas l'habitude de côtoyer les risques de transmission d'une maladie par des moustiques. Il n'est donc pas surprenant que l'avènement du virus du Nil occidental en Amérique du Nord éveille des inquiétudes chez certaines personnes. Pour d'autres Québécois, ce sont cependant les moyens qui pourraient être pris pour prévenir ou pour contrôler une épidémie qui suscitent la controverse. Aux États-Unis, la population et les intervenants de santé publique sont plus familiers avec l'utilisation de pesticides pour contrôler des moustiques responsables de la transmission d'une maladie. Ce n'est pas le cas au Québec où ce genre d'intervention n'a probablement jamais été mené. Certaines mesures de prévention sont plus familières aux Québécois comme l'emploi d'insectifuges personnels ou l'application du larvicide Bti (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*). Toutefois, d'autres techniques, notamment celles impliquant l'application d'insecticides chimiques, soulèvent des questions quant aux risques pour la santé humaine et pour l'environnement, de même qu'à propos de l'efficacité de ces moyens de contrôle pour enrayer la propagation ou la transmission du virus.

C'est dans ce contexte que le ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec a demandé à l'Institut national de santé publique du Québec de réaliser une évaluation des risques pour la santé humaine que pourraient représenter les moyens de prévention et de contrôle de la transmission du virus du Nil occidental. Cette étude a été effectuée grâce à une subvention du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec dans le cadre des travaux du Comité intersectoriel pour la prévention et le contrôle du virus du Nil occidental.

Le présent document fait partie d'un ensemble de cinq rapports scientifiques dont le premier porte sur l'épidémiologie du virus lui-même et les trois suivants sur les risques découlant des moyens de contrôle et de prévention (protection personnelle, larvicides, adulticides). Le cinquième document est un rapport synthèse.



Marc Dionne
Directeur
Direction des risques biologiques, environnementaux et occupationnels

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	1
2. LARVICIDES HOMOLOGUÉS AU CANADA	3
3. MÉTHOPRÈNE	5
3.1 PROFIL TOXICOLOGIQUE	5
3.1.1 Toxicité aiguë	5
3.1.2 Toxicité sub-chronique	6
3.1.3 Toxicité chronique et cancérogénicité	6
3.1.4 Mutagénicité	7
3.1.5 Effets sur la reproduction et tératogénicité	7
3.1.6 Métabolisme, expositions alimentaire et professionnelle	8
3.1.7 Effets sur la faune	8
3.1.8 En résumé	9
4. BACILLUS THURINGIENSIS (BT).....	11
4.1 TAXINOMIE, PHYSIOLOGIE ET PROPRIÉTÉS LARVICIDES DU BT	11
4.2 BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. ISRAELENIS (BTI)	13
4.3 MOBILITÉ ET PERSISTANCE ENVIRONNEMENTALE	13
4.3.1 En milieu atmosphérique	14
4.3.2 Sur la végétation	14
4.3.3 Dans l'eau	15
4.3.4 Dans le sol.....	16
4.3.5 En résumé	17
4.4 EFFETS CHEZ LES MAMMIFÈRES	17
4.4.1 Profil infectieux et pathogène.....	18
4.4.2 Multiplication et persistance.....	21
4.4.3 Effets synergiques.....	22
4.4.4 Effets sur des animaux immunodéprimés	23
4.4.5 En résumé	24

4.5	EFFETS CHEZ LES HUMAINS	24
4.5.1	Exposition expérimentale.....	24
4.5.2	Exposition pendant l'épandage – études épidémiologiques.....	25
4.5.3	Cas cliniques	27
4.5.4	Exposition suite à l'ingestion d'eau potable ou d'aliments contaminés	28
4.5.5	Cas des personnes immunodéprimées.....	29
4.5.6	En résumé.....	30
4.6	BACILLUS THURINGIENSIS ET BACILLUS CEREUS	30
4.8	AUTRES CONSTITUANTS DANS LES FORMULATIONS COMMERCIALES DE BT	32
5.	CONCLUSION	35
6.	BIBLIOGRAPHIE	37

1. INTRODUCTION

Dans le contexte de l'arrivée possible du virus du Nil occidental (VNO) au Québec, une évaluation préliminaire des insecticides homologués au Canada a été réalisée en 2000 afin de déterminer quels étaient notamment les larvicides offrant la meilleure innocuité et respectant le type d'application autorisée par l'Agence de Réglementation de Lutte Antiparasitaire (ARLA). Les larvicides figurant sur la liste des produits potentiels pouvant être utilisés, au besoin, par le ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS) lors d'un contrôle vectoriel sont le méthoprène et le Bti (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*). Il existe d'autres larvicides homologués au Canada, mais le MSSS n'envisage pas de les utiliser sur le territoire québécois.

En se basant sur le profil toxicologique ou infectieux des larvicides homologués au Canada, le présent document permet d'apprécier les risques potentiels pour la santé humaine associés à l'utilisation du méthoprène et du Bti pour contrôler la transmission du VNO. Un bref profil des autres larvicides est également tracé afin d'expliquer les principales raisons pour lesquelles ils n'ont pas été retenus.

Il est à noter qu'en 1995, à la demande du MSSS, le Comité de santé environnementale du Québec (CSE) avait produit un avis scientifique sur l'utilisation du *Bacillus thuringiensis* (Bt) en milieux forestier, agricole et urbain (Bolduc *et al.* 1995, Dionne *et al.* 1995, Lessard *et al.* 1996). Dans le contexte actuel, la mise à jour de cet avis s'est avérée essentielle. Il y a encore aujourd'hui peu de documents sur les effets sur la santé humaine et animale spécifiques au Bti. Le présent document repose ainsi sur l'innocuité du Bt en général et de ses différentes sous-espèces.

2. LARVICIDES HOMOLOGUÉS AU CANADA

Outre le méthoprène et le Bti comme ingrédients actifs homologués au Canada dans le contrôle des larves de moustiques, il y a également le diflubenzuron, le fenthion, le chlorpyrifos et le malathion (Ellis 2001). Un profil de ces larvicides est présenté afin d'énoncer succinctement les justifications ayant fait en sorte qu'ils n'ont pas été retenus dans le contrôle vectoriel contre le VNO sur le territoire québécois.

Considéré comme un inhibiteur de croissance pour les moustiques, le diflubenzuron interfère au niveau de la mue chez les larves en inhibant la synthèse de la chitine¹ destinée à protéger leur corps. Ce qui provoque des problèmes physiologiques, une dessiccation et, ultimement, un décès. Au Canada, le diflubenzuron est disponible sous forme de poudre. Ainsi, il doit être dissout dans de l'eau afin de préparer la solution larvicide qui sera ensuite appliquée. Or, il semble bien que la dissolution de cette poudre s'avère quelque peu difficile à réaliser. Par ailleurs, le diflubenzuron affecte également d'autres arthropodes (ex. crustacés) (Ellis 2001).

En ce qui concerne le fenthion, il est rarement utilisé comme larvicide en raison de sa toxicité envers les oiseaux. D'ailleurs, il semble bien qu'aucune municipalité canadienne n'emploie cet insecticide (Ellis 2001).

Quant au chlorpyrifos, son mécanisme de toxicité s'explique par sa capacité à inhiber les cholinestérases (NPTN 1999). Cet insecticide organophosphoré a été utilisé pendant plusieurs décennies comme larvicide chimique (Ellis 2001). Cependant, dans le cadre d'une réévaluation faite par l'ARLA, l'usage du chlorpyrifos sera sévèrement restreint dans un proche avenir, notamment en milieu résidentiel, à l'intérieur comme à l'extérieur (ARLA 2000, Ellis 2001). Il en est de même également pour les écoles et les terrains de jeux (ARLA 2000).

Disponible comme larvicide, le malathion est cependant peu utilisé à cette fin en raison de sa trop courte activité résiduelle en milieu aquatique (Ellis 2001). De plus, il faut mentionner que cet insecticide organophosphoré a un profil historique d'utilisation impliquant très souvent des cas d'intoxication aux États-Unis (Samuel et St-Laurent 2000). Mis à part les considérations toxicologiques, le malathion est corrosif pour les métaux et peut détériorer certains plastiques, caoutchoucs et autres revêtements. En raison de son odeur nauséabonde, son utilisation peut être considérée par le fait même moins acceptable par la population humaine (Samuel et St-Laurent 2000).

¹ Il s'agit d'une substance organique constituant la cuticule (membrane externe) notamment des insectes et des crustacés.

3. MÉTHOPRÈNE

Le méthoprène est utilisé notamment comme larvicide (ARLA 2001). Imitant l'action d'une hormone de régulation de la croissance chez certains insectes, il a la capacité d'agir sur le processus de maturation normal de l'insecte. Ainsi, le méthoprène perturbe développement normal de l'insecte en rendant impossible l'atteinte du stade adulte et, par conséquent, empêche ce dernier de se reproduire (Extoxnet 1996 et 2001, ARLA 2001).

Lorsqu'il est utilisé pour le contrôle des moustiques, le méthoprène est directement appliqué dans l'eau pour nuire au développement des larves; certaines formulations peuvent aussi être appliquées par voie aérienne (ARLA 2001). Son utilisation peut donc être combinée à d'autres mesures de contrôle des moustiques dans des programmes de lutte intégrée (Extoxnet 1996 et 2001). Au Canada, l'appellation commerciale du méthoprène est «Altosid®» (Ellis 2001). Il est disponible sur le marché sous forme de granules ou de pastilles (ARLA 2001).

3.1 Profil toxicologique

Basé sur les quelques études disponibles, dont la très grande majorité repose en fait sur des expériences menées sur des animaux de laboratoire, le profil toxicologique du méthoprène est présenté dans les sections suivantes et ce, en fonction du type de toxicité (en termes de dose et de durée d'exposition : aiguë, sub-chronique et chronique).

3.1.1 Toxicité aiguë

Le méthoprène est relativement non toxique lorsqu'il est ingéré ou inhalé et légèrement toxique par voie cutanée. D'ailleurs, aucune intoxication n'a été rapportée chez l'humain suite à une exposition accidentelle à ce produit. Cette faible toxicité aiguë s'exprime par les DL_{50}^2 orales très élevées observées expérimentalement chez les animaux. Chez le rat, elles varient de plus de 10 000 mg/kg à plus de 34 600 mg/kg alors que chez le chien, elles se situent entre 5000 et 10 000 mg/kg. Chez le lapin, les valeurs rapportées pour une application cutanée vont de plus de 2000 à 3500 mg/kg. Quant à la concentration létale par inhalation (CL_{50}) chez le rat, elle est supérieure à 210 mg/l (EPA 1991, Extoxnet 1996, Tomlin 1997).

Les données disponibles indiquent que le méthoprène n'est pas un irritant oculaire primaire, ni un irritant cutané. En effet, 0,1 ml de méthoprène technique n'a causé ni irritation oculaire, ni opacité de la cornée chez le lapin. Par ailleurs, l'application de 0,5 ml du même produit sur la peau rasée, abrasée ou intacte de cette espèce animale, n'a causé aucun symptôme irritatif et ce, pour une durée de 72 heures (EPA 1991).

² Les doses létales (DL_{50}) sont une mesure de la toxicité aiguë d'une substance. Il s'agit de la dose causant le décès chez 50% des animaux testés.

Dans le cadre de tests de sensibilisation cutanée chez les cochons d'Inde, le méthoprène a été administré par multiples injections intradermiques et une réaction positive a été observée. Cependant, des applications topiques subséquentes n'ont causé aucune réaction. De plus, des tests de sensibilisation effectués chez des volontaires selon la méthode normalisée de Draize se sont révélés négatifs (EPA 1991).

3.1.2 Toxicité sub-chronique

Le méthoprène a été administré oralement à des rats pendant plus de 90 jours à des taux de 0, 250, 500, 1000 ou 5000 ppm. Une augmentation significative du poids du foie a été observée chez les mâles et les femelles à la plus haute dose. Des effets rénaux similaires ont été constatés chez les mâles ayant reçu la plus forte dose. De plus, une dégénérescence des tubules rénaux a été notée chez plusieurs mâles aux deux doses les plus élevées. La dose sans effet observé pour cette étude a été de 500 ppm (EPA 1991).

Dans une autre étude, des chiens ont été exposés par leur régime alimentaire à des taux de méthoprène de 0, 250, 500 ou 5000 ppm durant 90 jours. Une augmentation significative du poids du foie a été observée chez les animaux des deux sexes à la plus forte dose. De plus, les niveaux de phosphatase alcaline sérique ont été plus élevés chez les mâles lors des mesures après 4, 8 et 13 semaines alors que chez les femelles, cet effet a été noté à 8 semaines seulement. La dose sans effet observé a été de 500 ppm (EPA 1991).

De l'Altosid® non dilué (concentration non spécifiée) a été appliqué à des taux de 0, 100, 300, 900 ou 2700 mg/kg/jour par voie cutanée sur des lapins rasés et ce, durant 30 jours. À l'exception de rougeurs observées sur la peau des animaux ayant reçu la plus forte dose, aucun effet systémique significatif relié au traitement n'a été noté. La dose sans effet observé a été fixée à 100 mg/kg/jour en raison d'une baisse de gain de poids corporel aux taux les plus élevés testés (EPA 1991).

Lors d'une étude par inhalation d'une durée de 21 jours chez le rat, la dose sans effet observé a été de 20 mg/l. Il s'agit de la plus forte dose testée (EPA 1991).

3.1.3 Toxicité chronique et cancérogénicité

Lors d'une étude alimentaire d'une durée de 2 ans chez les rats, du méthoprène (86,9% d'ingrédient actif) leur a été administré à des taux de 0, 250, 1000 ou 5000 ppm dans la nourriture, ce dernier taux équivaut à environ 250 mg/kg/jour (Exttoxnet 2001). Aucun effet relié au traitement n'a été noté concernant le poids corporel, la consommation de nourriture, le poids des organes ainsi que les paramètres hématologiques, sanguins et urinaires. Les examens macroscopiques à la nécropsie n'ont révélé aucune pathologie ou histopathologie. Aucune augmentation de l'incidence des tumeurs n'a été observée chez les groupes traités (EPA 1991).

Dans une autre étude, le méthoprène a été administré à des souris mâles et femelles pendant 18 mois à des taux de 0, 250, 1000 ou 2500 ppm *via* leur régime alimentaire. Aucune différence dans l'incidence des tumeurs, le poids corporel, la consommation de nourriture et le comportement n'a été observée entre le groupe témoin et le groupe expérimental. Cependant, à la nécropsie, les examens histopathologiques ont révélé une incidence élevée de pigmentation du foie au taux de 2500 ppm, équivalant à environ 357 mg/kg/jour (EPA 1991, Exttoxnet 2001). Cet effet a aussi été noté chez quelques souris à 1000 ppm (environ 143 mg/kg/jour) mais non dans les autres groupes. Une amylose a également été remarquée dans différents tissus chez tous les groupes, mais elle a été deux fois plus importante dans le groupe ayant reçu la plus forte dose. La dose sans effet observé pour cette étude a été de 250 ppm, soit environ 37,5 mg/kg/jour (EPA 1991, Exttoxnet 2001).

3.1.4 Mutagénicité

Un essai bactérien et une étude de dominance létale chez les rats n'ont démontré aucune évidence suffisante du potentiel mutagène du méthoprène (EPA 1991). Les seuls effets génétiques observés ont été l'inhibition de la synthèse de l'ADN des cellules ovariennes d'insectes et une mutation chez *Drosophila melanogaster* à des concentrations respectives de 100 µmol/l et de 100 mg/l de méthoprène (RTECS 2001).

3.1.5 Effets sur la reproduction et tératogénicité

Les données expérimentales semblent indiquer que le méthoprène ne représente pas un risque pour la reproduction. Aucun effet relié au produit n'a été noté lors d'une étude de reproduction réalisée sur trois générations des rats et ce, à une dose de 125 mg/kg/jour (Exttoxnet 1996). Une étude similaire rapporte une dose sans effet observé de 2500 ppm, soit le taux maximum testé (EPA 1991). Il est impossible toutefois de confirmer si les deux études sont reliées.

Une étude indique que le méthoprène ne cause pas de toxicité développementale chez le lapin à des taux aussi élevés que 2000 mg/kg lorsque administré entre les 7^e et 18^e jours de la gestation. Toutefois, des effets de toxicité maternelle tels qu'une baisse de gain de poids corporel et une augmentation de l'incidence du taux d'avortements spontanés ont été notés à cette dose. La dose sans effet observé lors de cette étude a été de 200 mg/kg/jour (EPA 1991). Dans une autre étude, une dose de 600 mg/kg/jour administré chez la souris entre les 7^e et 14^e jours de la gestation n'a causé ni toxicité maternelle, ni fœtotoxicité, ni tératogénicité. La dose sans effet observé pour cette étude a été de 600 mg/kg/jour. Chez le rat, aucun effet tératogène n'a été observé à une dose de 1000 mg/kg/jour (EPA 1991). D'autres études ont donné des résultats similaires chez le hamster, le mouton et le cygne (Heitland 2001).

Réalisées en laboratoire, des études ont démontré que le méthoprène posait un faible risque pour les amphibiens à des taux rencontrés dans l'environnement. Par contre, lorsque des embryons de crapaud sont mis en présence de produits de dégradation du méthoprène, causée par le rayonnement solaire ou l'action microbienne, les expositions semblent nuire de façon dramatique au développement normal des amphibiens (La Clair *et al.* 1998). Ces auteurs mentionnent que les taux de méthoprène et de ses produits de dégradation pouvant être détectés dans l'environnement suite à une utilisation normale de

ce produit s'avèrent faibles comparativement à ceux utilisés lors des expériences en laboratoire. Cependant, ils suggèrent que des produits de dégradation du méthoprène pourraient se concentrer dans l'environnement d'une façon qui n'est pas facilement reproductible en laboratoire.

3.1.6 Métabolisme, expositions alimentaire et professionnelle

Chez les mammifères dont le rat, la souris, le bouvillon et la vache, le méthoprène serait rapidement et presque totalement métabolisé puis éliminé, principalement dans les urines et les fèces (EPA 1991). Le méthoprène serait excrété inchangé dans les déjections du bétail en quantité suffisante pour conserver son effet larvicide dans le fumier (Exttoxnet 2001).

Sur la base d'une étude sub-chronique de 18 mois réalisée sur des souris et pour laquelle une dose sans effet de 37,5 mg/kg/jour a été notée, une dose de référence (DRf)³ de 0,4 mg/kg/jour a été retenue (EPA 1991). Aux États-Unis, il a été démontré que chez les humains l'apport alimentaire ne représentait en moyenne que 0,29% de cette DRf et aucun des sous-groupes sensibles retenus pour l'évaluation (comme les bébés et les enfants) n'avait un apport alimentaire dépassant la DRf (EPA 1991).

L'exposition non alimentaire ou professionnelle au méthoprène a également été évaluée. Puisque cette substance fait partie des catégories III et IV⁴, concernant la toxicité orale, cutanée ou respiratoire et que, de plus, il n'existe pas d'évidence d'effets neurotoxiques, cancérigènes ou sur la reproduction, l'Environmental Protection Agency (EPA 1991) n'a pas effectué d'estimation quantitative du risque lors d'une exposition professionnelle.

3.1.7 Effets sur la faune

Le méthoprène est légèrement toxique pour les oiseaux. La CL₅₀ rapportée pour une exposition de 5 à 8 jours est supérieure à 10 000 ppm pour le Canard colvert et le Colin de Virginie. La DL₅₀ par voie orale est de plus de 4640 ppm et plus de 2000 mg/kg pour le poulet et le Canard colvert respectivement (EPA 1991, Exttoxnet 1996 et 2001). Les effets non létaux pouvant affecter la survie des oiseaux apparaissent à des doses orales aiguës de 500 mg/kg (Exttoxnet 1996). Ces effets se traduisent par une lenteur, une réticence à bouger, une prostration et une incoordination, ce qui rend les oiseaux plus susceptibles à la prédation. Aucun effet n'a été observé lors de la reproduction du Colin de Virginie et du Canard colvert nourris à des taux constants de 30 ppm d'Altosid® (Exttoxnet 1996).

Le méthoprène est légèrement à modérément toxique pour les poissons (Exttoxnet 1996). La CL₅₀ pour une exposition rapportée de 96 heures est de 4,4 et 4,6 mg/l respectivement pour la truite et une espèce de crapêt-soleil et, supérieure à 100 mg/l pour l'achigan à grande bouche et la barbus de rivière. Les résidus de méthoprène pourraient avoir un léger potentiel de bio-accumulation chez le crapêt-soleil et l'écrevisse. Par ailleurs, le méthoprène s'avère très toxique pour certaines espèces d'invertébrés

³ La DRf se définit par la quantité d'un produit à laquelle une personne pourrait être exposée quotidiennement pendant sa vie entière (70 ans) sans entraîner de risque appréciable pour sa santé.

⁴ L'EPA a défini 4 catégories de toxicité pour les pesticides :

I : très toxique, II : relativement toxique, III : légèrement toxique et IV : très peu toxique.

marins, estuariens et dulcicoles telle la daphnie (*Daphnia magna*) pour laquelle une concentration effective (CE₅₀)⁵ de 89 ppb pour 48 heures d'exposition a été déterminée (EPA 1991). Pour d'autres espèces, il est peu toxique avec une CL₅₀ de plus de 100 mg/l pour la crevette d'eau douce (Exttoxnet 1996). L'Altosid® semble avoir très peu d'effets sur certains organismes aquatiques non ciblés tels que les libellules, les escargots et les têtards. Le produit a montré peu ou pas d'effet lorsque testé sur des vers de terre. Il est également non toxique pour les abeilles (Exttoxnet 1996).

3.1.8 En résumé

D'après les informations disponibles, il appert que le méthoprène est sans risque notable pour les mammifères et les humains. Ce qui semble se confirmer par l'absence de cas d'intoxication chez les humains dans la littérature médicale. Suite à des expériences réalisées sur des animaux de laboratoire visant à évaluer le profil toxicologique du méthoprène, celui-ci n'a effectivement pas provoqué d'effets toxiques importants. Ce produit présente ainsi un très faible potentiel de toxicité aiguë lorsqu'il est ingéré ou inhalé. D'ailleurs, il ne provoque pas d'irritations oculaires et cutanées. Le méthoprène démontre toutefois une faible toxicité cutanée, mais il n'est pas pour autant un sensibilisant cutané pour les humains. En effet, des tests de sensibilisation chez des volontaires se sont bel et bien révélés négatifs.

Suite à des tests réalisés sur des animaux de laboratoire, le méthoprène ne semblerait pas avoir d'effets sur la reproduction, ni d'effets mutagène, cancérigène et tératogène quoiqu'il y ait eu cependant une augmentation d'avortements constatée chez les lapins. En fait, les seuls effets génétiques notables ont été observés sur l'ADN des cellules ovariennes d'insectes, qui sont les organismes cibles du méthoprène.

En somme, s'il est utilisé selon les recommandations du fabricant, le méthoprène s'avère un larvicide sans risque notable pour les humains et les mammifères, notamment aux doses utilisées pour éradiquer les insectes ou aux concentrations résiduelles qui pourraient être retrouvées dans l'environnement.

⁵ La CE₅₀ est la concentration produisant un effet chez 50% de la population testée. Par exemple, dans le cas de *Daphnia magna*, les effets mesurés sont liés à la croissance ou à la mobilité des algues.

4. BACILLUS THURINGIENSIS (Bt)

Puisque l'ensemble des informations colligées dans le présent document sur le *Bacillus thuringiensis* (Bt) traitent collectivement d'autres sous-espèces, telle *kurstaki*, il a été jugé approprié de faire état de l'ensemble des connaissances à l'égard du Bt, notamment parce qu'aucune information ne permet de conclure à des effets différents sur les mammifères, y compris les humains. Dans le cadre de la lutte contre le VNO, il est à noter que seules les formulations contenant la sous-espèce *israelensis* (Bti) seraient utilisées, compte tenu de leur spécificité envers les moustiques.

4.1 Taxinomie, physiologie et propriétés larvicides du Bt⁶

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie en forme de bâtonnet (bacille), aérobie facultative, ubiquiste dans le sol et possédant la propriété particulière de synthétiser des protéines cristallisées durant la sporulation, lesquelles sont capables de donner naissance à des toxines qui tuent les larves de plusieurs espèces d'insectes. La présence de ces protéines cristallisées est par ailleurs la caractéristique majeure permettant de distinguer le Bt de *Bacillus cereus* qui peut induire diverses infections chez l'humain⁷.

Le Bt a été isolé pour la première fois au Japon au début du siècle, à partir de vers à soie infectés; une première description scientifique en a été faite en Allemagne en 1911. En 1916, l'activité larvicide a été clairement associée aux toxines produites par les cellules en phase terminale de sporulation, mais absentes des bactéries non sporulées (cellules végétatives). En 1998, 67 sous-espèces de *B. thuringiensis* avaient été répertoriées sur la base de l'analyse sérologique des antigènes associés aux flagelles (antigènes H) des cellules végétatives; il existerait par ailleurs plus de 40 000 isolats, dont 1 600 ont été répertoriées.

La caractéristique la plus distinctive du Bt est la synthèse des protéines cristallisées, désignées par le vocable «corps d'inclusion parasporal», plus simplement appelé «cristal» ou «cristaux». La formation de ce corps est concomitante à la sporulation qui est induite par des conditions environnementales ne permettant plus aux cellules végétatives de survivre (ex. manque de substrat nutritif). Un grand nombre de protéines cristallisées ont été identifiées et un cristal peut renfermer plusieurs types de protéines; en fait, plus de 14 gènes codant la synthèse de ces protéines ont été décrits. Les gènes codent pour la synthèse d'une famille de protéines apparentées ayant des propriétés larvicides (gènes «Cry») répartis dans quatre grandes classes, selon que la spécificité des protéines s'exprime à l'égard des Lépidoptères (CryI), des Lépidoptères et des Diptères (CryII), des Coléoptères (CryIII) ou des Diptères (CryIV).

⁶ Les informations de cette section sont tirées de: Bulla *et al.* (1980), Lüthy et Ebersold (1981), Thomas et Ellar (1983), Lacoursière et Boisvert (1994), Lessard *et al.* (1996), WHO (1999), Joung et Côté (2000).

⁷ Pour plus d'information à ce sujet, consulter la section 4.7.

Les protéines cristallisées sont collectivement désignées sous le vocable de δ -endotoxines (endotoxines delta) qui sont en fait des pro-toxines devant subir certaines modifications afin d'exprimer leur toxicité. Elles exercent leurs effets après avoir été solubilisées dans l'environnement alcalin de tube digestif de la larve de l'insecte; le besoin d'un milieu très basique (pH de plus de 10,0) explique notamment l'innocuité apparente du Bt ingéré par les mammifères dont le pH gastrique est, à l'opposé, très acide. La protéolyse des pro-toxines libère les fractions toxiques qui se lient à des récepteurs spécifiques situés sur les cellules des microvillosités épithéliales de la portion médiane de l'intestin (intestin moyen) de l'insecte. Il s'ensuit alors une déformation des cellules intestinales, une perforation épithéliale du tube digestif ainsi qu'un déséquilibre osmotique. La perte d'intégrité de l'épithélium provoque la paralysie du système digestif qui cause la mort de l'insecte suite à l'impossibilité de s'alimenter. De plus, les spores de certaines souches peuvent germer dans le corps de l'insecte et produire des cellules végétatives. C'est le cas du Btk qui peut déclencher une septicémie qui s'ajoute à la toxicité des cristaux.

B. thuringiensis peut également synthétiser d'autres toxines, dont la β -exotoxine (exotoxine bêta). Cette dernière diffère grandement de la δ -endotoxine: elle est de nature nucléotidique plutôt que protéique; elle est extracellulaire; sa synthèse n'est pas liée à la sporulation; elle est toxique pour les mammifères (15 μ g/g chez la souris par voie intrapéritonéale) bien que son absorption intestinale soit faible. Durant plusieurs années, l'apparition de cette toxine durant le procédé de fermentation a représenté un problème quant à l'innocuité des formulations commerciales. Toutefois, depuis les années 1970, les entreprises produisant le bio-insecticide maîtrisent mieux la fermentation et toutes les formulations commerciales doivent maintenant être exemptes de β -exotoxine pour être homologuées.

La préparation des formulations de Bt s'est rapidement développée à partir des années 1940 alors qu'était mise au point la méthode de la fermentation liquide aérobie en cuve profonde qui, tout en optimisant la production de cristaux, a rendu possible la commercialisation à l'échelle industrielle. Le procédé de fermentation est d'abord axé sur la production de cellules végétatives puis sur leur sporulation afin de favoriser la formation des corps d'inclusion parasporal. Les formulations commerciales contiennent donc ces deux éléments (cristaux et spores) ainsi que quelques cellules végétatives, des débris cellulaires, des restes de milieu de culture et des additifs qui sont ultérieurement ajoutés pour diverses raisons⁸.

Depuis les années 1950, le Bt a été utilisé massivement en Amérique du Nord contre plus de 40 insectes ravageurs dans les champs, les forêts, les vergers, les vignobles, les parcs et les jardins. Dans les premières formulations, diverses sous-espèces et souches étaient présentes, mais à compter de 1961, la sous-espèce *kurstaki* (Btk) a été spécifiquement mise à l'essai contre les Lépidoptères. Sur le marché canadien, il existe une quinzaine de formulations contenant cette sous-espèce qui sont commercialisées par une dizaine de compagnies productrices. Le Btk est surtout utilisé pour le contrôle des insectes ravageurs en milieu forestier (notamment les Lépidoptères), comme la Tordeuse des bourgeons de l'épinette, bien que son utilisation croît en agriculture, notamment pour lutter contre les Lépidoptères ravageurs des crucifères comme les choux et les brocolis. La sous-espèce *tenebrionis* (Btt) a été découverte au début des années 1980 en Allemagne. Elle permet de contrer l'action des

⁸ Pour plus d'information sur les formulations commerciales, consulter la section 4.8.

larves de Coléoptères, telle le Doryphore de la pomme de terre. Trois autres sous-espèces sont actuellement produites commercialement: *aizawai*, *morrisoni* et *israelensis* (Joung et Côté, 2000).

4.2 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti)

La sous-espèce *israelensis* a été découverte en 1976 dans le désert du Negev en Israël, mais elle a été subséquemment identifiée dans plus de 15 pays (Joung et Côté 2000). Il n'existe aucun rapport faisant état d'une présence naturelle, ne découlant pas d'un épandage, au Québec ou au Canada, situation attribuable à l'absence de recherches systématiques à cet égard (Lacoursière et Boisvert 1994). De manière générale, les cristaux du Bti sont toxiques pour les larves du sous-ordre des Nématocères (un sous-groupe de l'ordre des Diptères), plus spécifiquement envers les insectes de la famille des *Culicidae* (moustiques), des *Simuliidae* (mouches noires) ainsi qu'une grande partie des *Chiromonidae* qui comprennent notamment les moucheron (le Bti n'a aucune activité larvicide contre les Lépidoptères et les Coléoptères) (Lacoursière et Boisvert 1994).

Le principal vecteur du VNO est composé de moustiques appartenant au genre *Culex* (famille des Culicidés) (Rappole *et al.* 2000), les espèces *Culex. pipiens* et *Culex. restuans* ayant été plus particulièrement impliquées dans la transmission de l'infection dans le nord-est des États-Unis (CDC 2001). *C. pipiens* est une espèce introduite en Amérique du Nord par les premiers immigrants européens, au début de la colonisation, dont la répartition géographique, au Québec, ne dépasse guère la zone tempérée (le long d'une ligne allant du Témiscamingue jusqu'à la ville de Québec). Quant à *C. restuans*, une espèce indigène, son aire de distribution est beaucoup plus vaste, allant jusqu'à la zone subarctique à la hauteur de la baie d'Hudson (Maire et Aubin 1980). Dans ce contexte, les formulations commerciales contenant le Bti sont les plus appropriées pour lutter contre les larves des deux espèces de *Culex* pouvant véhiculer le virus.

Les produits commerciaux à base de Bti contiennent les toxines sous forme de cristaux, des spores de la bactérie, des débris cellulaires et divers additifs. Les produits commerciaux se retrouvent généralement sous quatre formes : poudre, granules, briquettes et liquide (Lacoursière et Boisvert 1994). Ils sont appliqués directement en milieu aquatique par voie terrestre (ex. à partir d'un réservoir portatif sur le dos des applicateurs) ou aérienne (ex. granules largués par un aéronef) selon le type de milieu à traiter, sa superficie et son accessibilité. Au Québec, le Bti généralement employé pour le contrôle des larves de moustiques est sous forme liquide et est déposé directement dans l'eau stagnante.

4.3 Mobilité et persistance environnementale

La mobilité et la persistance dans l'environnement d'un micro-organisme sont des facteurs dont il faut tenir compte puisqu'ils peuvent moduler son pouvoir pathogène potentiel. Cette section se veut un court résumé des principales informations connues à cet effet à l'égard du Bt. Il faut cependant noter que les informations relatives à la dispersion environnementale découlent presque exclusivement de l'emploi du *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) contre les ravageurs en milieu forestier et non de l'emploi du *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) pour lutter contre les insectes piqueurs. Par ailleurs, il est à noter que la présence de Bt dans les aliments est discuté à la section 4.5.4.

4.3.1 En milieu atmosphérique

Des facteurs comme la vitesse et la direction du vent, de même que l'humidité relative et la topographie locale jouent un rôle clé dans la dispersion et la contamination environnementales d'un pesticide. Par ailleurs, la quantité utilisée ou épanchée ainsi que le diamètre des particules du produit atomisé dans l'air sont des paramètres importants dont il faut tenir compte pour évaluer la dispersion (Letarte 1985, Otvos et Vanderveem 1993, Teschke *et al.* 2001).

Durant les années 1980, principalement de 1984 à 1987, le personnel du ministère des Ressources naturelles du Québec a mesuré les concentrations de Btk dans l'air suite aux pulvérisations contre la Tordeuse des bourgeons de l'épinette. Des concentrations de Btk supérieures à la limite de détection (1 ufc/m^3)⁹ ont été observées sporadiquement à une distance variant entre 1 et 3 km de la zone traitée pendant la période d'épandage, la majorité des échantillons (85% en 1985 et 95% en 1987) se révélant toutefois négatifs (Major *et al.* 1985 et 1986, Dugal et Major 1987, Dugal 1988). Dans le cadre d'une situation similaire à celle du Québec, Teschke *et al.* (2001) ont évalué la concentration du Btk dans l'environnement atmosphérique suite à un programme de pulvérisation contre la spongieuse en Colombie-Britannique. Ils estiment la demi-vie atmosphérique du Btk à 3,3 heures compte tenu du patron de disparition qui épouse une courbe logarithmique dans les premiers jours. Cette demi-vie est supérieure à celle qu'il est possible de déduire des observations de Dugal *et al.* (1986) ainsi que de SOPFIM et SNC-Lavalin (1992) qui ont montré qu'entre 67 et 91% de la concentration initiale du Btk était présente dans l'air 30 minutes après l'épandage alors qu'elle diminuait à moins de 2%, 90 à 120 minutes après l'arrosage. Bastille *et al.* (1985), sur la base de données recueillies dans le cadre des pulvérisations de Btk contre la Tordeuse des bourgeons de l'épinette, affirment que le bacille pourrait être véhiculé par l'air plusieurs mois après les pulvérisations, assertion compatible avec les observations de Teschke *et al.* (2001).

Il est toutefois difficile de conclure à une contamination généralisée suite à une utilisation du biopesticide puisque de Amorim *et al.* (2001) ont mis en évidence la présence du Btk dans l'air ambiant de la région de Victoria (Colombie-Britannique) antérieurement à un programme d'épandage forestier. Selon ces auteurs, l'utilisation de plus en plus répandue du Bt en agriculture ainsi qu'en horticulture constitue une source de contamination atmosphérique dont il faut tenir compte.

4.3.2 Sur la végétation

Les facteurs les plus importants qui influent sur la persistance du Bt sur la végétation sont les précipitations et le rayonnement ultraviolet (Otvos et Vanderveen 1993) ainsi que l'humidité atmosphérique (Surgeoner et Farkas 1990). Le Bt a été retrouvé sur une grande variété de conifères et d'arbres à feuilles décidues ainsi que sur les cultures légumières et fruitières (WHO 1999).

⁹ ufc signifie unités formant une colonie, soit les bactéries ou les spores capables de germer sur un milieu de culture approprié.

Pinnock *et al.* (1971) ont rapporté la présence du Btk durant une période de 22 jours sur des feuilles de chênes alors que Niccoli et Pelagatti (cités dans Otvos et Vanderveen, 1993) font état d'une persistance de 8 jours du Btk et du Bti sur le feuillage de divers arbres. Après un épandage, Reardon et Haising (1984) ont récolté des cristaux actifs de Btk pendant 8 jours sur les feuilles de l'épinette blanche et pendant 16 jours sur le sapin baumier, alors que des spores viables ont été retrouvées après 12 mois sur l'épinette blanche. Cette dernière observation est comparable avec celle de Smith et Barry (1998) qui font état d'une persistance des spores pendant 12 mois sur des arbres (principalement des chênes, des érables et des épinettes) suite à une application aérienne de Bt pour combattre la spongieuse. Plusieurs de ces mesures mettent cependant en évidence l'importance de distinguer entre la persistance des spores et celle des cristaux.

En ce qui concerne la persistance sur des végétaux comestibles, Bidochka *et al.* (1987) ont isolé du Btk, provenant probablement d'une préparation commerciale, sur des raisins californiens vendus dans un marché de la Saskatchewan. En Colombie-Britannique, Noble *et al.* (1992) ont retrouvé des spores de Btk dans 50% des échantillons prélevés sur des brocolis, des épinards et des poivrons importés de Californie, certains de ces légumes portant une étiquette mentionnant des méthodes culturales sans utilisation de pesticides. Par ailleurs, après avoir appliqué expérimentalement du Bt sur des feuilles de chou, Pedersen *et al.* (1995) ont noté une diminution rapide du nombre de spores au cours des premiers jours (demie-vie de 16 heures) bien qu'une période de 28 jours ait été requise pour une disparition presque totale du bacille.

Il est reconnu qu'une exposition à la lumière directe réduit rapidement l'activité du mélange spores-cristaux (Cantwell et Franklin 1966). En général, les spores et les cristaux sont sensibles à certaines longueurs d'onde UV, de l'ordre de 300 à 400 nm tel que démontré par Morris (1983) ainsi que Pusztai *et al.* (1991). Cohen *et al.* (1991) ont mesuré une diminution de la toxicité du Btk, de l'ordre de 80% après 3 heures d'irradiation à 300 – 350 nm et de 95% après 12 heures.

4.3.3 Dans l'eau

En plus de la dérive inhérente à l'épandage du Bt en milieu forestier ou agricole, le bacille peut être appliqué directement dans l'eau ou épandu au-dessus de milieux aquatiques (ex. lacs, cours d'eau, marais) afin de lutter contre divers insectes piqueurs comme les moustiques et les mouches noires, ce qui accroît la contamination du milieu aquatique. Cette pratique est typique des pays tropicaux où la lutte contre des moustiques, vecteurs de micro-organismes pathogènes, doit se faire pour protéger les populations humaines.

Des études relatives à l'évolution temporelle des spores de Btk dans les cours d'eau ont démontré que la concentration du bioinsecticide diminuait rapidement durant les premières heures après son application, bien que des spores étaient toujours détectables dans les mois suivants (Dugal *et al.* 1985, Dostie *et al.* 1986 et 1988a). Dans ce contexte, Dostie *et al.* (1986) de même que Dugal *et al.* (1985) ont retrouvé des spores, correspondant toutefois à moins de 1% des concentrations initiales, respectivement 4 et 11 mois après l'épandage. D'autres travaux confirment ces résultats, soit que le Btk peut persister dans les cours d'eau pendant plusieurs mois (Dostie *et al.* 1988b et 1989). Cette

persistance s'expliquerait par un apport constant de spores par lessivage du sol forestier suite au ruissellement provoqué par la pluie ou la fonte des neiges (Dugal *et al.* 1985). 1988b).

Dans les sédiments, le Bti perd rapidement son activité toxique envers les larves de moustiques (Ohana *et al.* 1987). Cette perte de l'activité toxique est attribuable à l'adsorption des cristaux sur les particules sédimentées. Leur remise en suspension, suivi d'un lavage, permet de retrouver l'activité larvicide; ces observations ont également été rapportées par Dupont et Boisvert (1986).

Delisle *et al.* (1986) ont noté la présence du Btk dans une usine de traitement d'eau potable dont les sources d'approvisionnement étaient situées à une distance variant de 5 à 9 km des secteurs traités. Une situation similaire a été notée par de Amorim *et al.* (2001) qui ont retrouvé jusqu'à $3,9 \times 10^5$ ufc/l dans les réservoirs d'eau potable de la ville de Victoria avant le début d'un programme d'épandage. Toutefois, puisque moins de 3% des colonies de Btk isolées appartenaient au même sérotype que celui utilisé dans la formulation commerciale, les auteurs estiment que la contamination serait due à d'autres sources pouvant découler d'utilisations agricoles ou horticoles. de Amorim *et al.* (2001) ont également montré que le Bt pouvait persister pendant au moins un an dans l'eau potable.

4.3.4 Dans le sol

La lithosphère constitue le réservoir naturel de *B. thuringiensis*, comme l'ont démontré Martin et Travers (1989) qui ont identifié cette espèce dans 70% de plus d'un millier d'échantillons de sol prélevés sur les cinq continents; la sous-espèce la plus fréquemment identifiée était *israelensis* (20% des échantillons contenant du Bt) suivi de la sous-espèce *kurstaki* (6,6%). Par ailleurs, sur un peu plus de mille échantillons de sols agricoles, forestiers et urbains prélevés à la grandeur de l'Espagne, Iriarte *et al.* (1998) ont trouvé du Bt dans 30% d'entre eux, les sous-espèces les plus fréquemment retrouvées ayant été *aizawai* (22%), *kurstaki* (13%) et *konkukian* (11%). Au Canada et au Québec, la répartition du Bt dans le sol n'a pas fait l'objet de recherches. Au Québec, Cardinal et Marotte (1987) ont retrouvé du Btk dans 85% des échantillons de sol forestier alors que Delisle *et al.* (1991) en ont identifié dans 28% des échantillons analysés; dans les deux cas cependant, on suppose que cette présence découlait d'épandages antérieurs et ne pouvait pas refléter une répartition naturelle. Delisle *et al.* (1991) rapportent toutefois que les études effectuées par le ministère des Forêts du Québec n'ont pas pu mettre en évidence une présence naturelle de Bt, à l'instar de McBride et Coyle (cités dans Addison 1993) qui ont noté l'absence de souches naturelles en Nouvelle-Écosse.

Petras et Casida (1985) ont mesuré une diminution par un facteur de 10 du nombre de spores de Bt dans un sol en milieu naturel 2 semaines après une application puis un maintien de la concentration résiduelle pendant au moins 8 mois. Au Québec, il a été démontré que les spores du Btk pouvait persister jusqu'à au moins 7 ans après un programme de pulvérisation (Bégin *et al.* 1994). Aux États-Unis, dans une forêt de sapins de Douglas, de chênes et d'érables, Smith et Barry (1998) ont évalué une persistance du bioinsecticide pendant 5 années consécutives. Sekijima (cité dans Bégin *et al.* 1994) ont suivi la persistance d'un isolat de la sous-espèce *thuringiensis* appliqué à la surface d'un champ de mûres. Trois à quatre mois après l'inoculation, la concentration avait diminué par un facteur de 100 (10^5 ufc/g), concentration persistant pendant 12 à 16 mois.

Une étude de Parent et Bégin (1994) a montré qu'à la suite d'une double application de bio-insecticide (contenant du Btk), il n'y a pas eu d'augmentation du nombre de spores dans un sol forestier. En tenant compte des limites imposées par les méthodes d'échantillonnage et d'analyses utilisées, ainsi que des conditions atmosphériques, l'étude montre que les quantités de spores retrouvées après chaque épandage ont été similaires et ont demeuré aux mêmes concentrations; il n'y avait donc pas d'accumulation constante des spores dans le sol. Ces résultats sont en accord avec les observations de Aizawa *et al.* (cité dans Dulmage et Aizawa 1982) qui ne rapportent aucune accumulation de spores suite à des applications répétées de Btk. Les auteurs expliquent que le sol ne retiendrait qu'une quantité limite de spores, sans toutefois en expliquer la cause.

Krieg (cité dans Addison 1993) mentionne que les composés humiques d'un sol organique exerceraient un effet inhibiteur sur la multiplication des spores du Bt. Cette observation est confirmée par la mise en évidence d'une inhibition de leur survie en présence de matières organiques ou de composés humiques (Saleh *et al.* 1970a, Addison 1993). Dans ce contexte, des études ont démontré que la germination des spores dans un sol forestier acide, tel que celui qui caractérise les forêts de résineux du Québec, est peu probable puisqu'ils doivent être dans un environnement édaphique dont le pH est relativement neutre et que les bactéries (cellules végétatives) tolèrent peu les sols acides (Saleh *et al.* 1970b, Otvos et Vanderveen 1993). Akiba *et al.* (cité dans Bégin *et al.* 1994) confirment cette assertion dans une étude concernant l'effet du pH sur la croissance du Btk, introduit dans le sol, qui cesse lorsque le pH devient inférieur à 4,8, situation retrouvée dans les sols de forêts conifériennes et qui expliquerait l'absence de Bt dans plusieurs sols forestiers canadiens.

4.3.5 En résumé

Les nombreuses études effectuées quant à la dispersion environnementale du Bt, notamment le Btk, montrent que le micro-organisme est susceptible d'être présent dans l'ensemble des composants de la biosphère (air, eau et sol), avant des pulvérisations, mais en plus grande concentration suite aux applications anthropiques. Cette «contamination» doit cependant être évaluée dans la perspective d'une présence naturelle de nombreuses souches de Bt dans l'environnement et du fait que les souches commerciales utilisées dans les pulvérisations, si elles peuvent persister longtemps, ne semblent cependant pas être en mesure de proliférer.

4.4 Effets chez les mammifères

L'effet du Bt a été testé chez divers groupes d'animaux, invertébrés et vertébrés, aquatiques et terrestres. Toutefois, dans l'optique du présent document, seuls les effets sur les mammifères terrestres sont présentés. Une revue succincte des effets sur les autres groupes est notamment faite par Joung et Côté (2000) et WHO (1999).

4.4.1 Profil infectieux et pathogène

L'évaluation expérimentale du pouvoir infectieux et pathogène des formulations de Bt ne repose que sur un nombre limité de recherches indépendantes. De plus, la validité et l'interprétation des premières évaluations sur l'innocuité du Bt sont compliquées par la présence des β -exotoxines¹⁰ toxiques pour les mammifères (Joung et Côté 2000). Selon les lignes directrices de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'évaluation de l'innocuité des agents bactériens doit inclure des épreuves de toxicité par voies orale, intrapéritonéale, respiratoire et cutanée, puis comprendre également des tests d'allergie, d'hypersensibilité ainsi que des expositions oculaires et de mutagénicité *in vitro* (WHO 1981). Aux États-Unis, depuis 1989, plusieurs types d'études de toxicité sont requises dans le cadre du processus d'homologation des formulations de Bt au regard de trois types d'exposition: intrapéritonéale ou intraveineuse (pour simuler une exposition maximale), orale (exposition par ingestion) et pulmonaire (exposition par inhalation). Par ailleurs, depuis 1989, le nombre de micro-organismes utilisés dans les tests est calculé par le décompte des unités formant une colonie (ufc), soit les bactéries ou les spores capables de germer et de former une colonie sur un milieu de culture approprié, plutôt que sur l'évaluation du nombre de spores seulement. Cette approche permet de déterminer plus exactement le nombre de micro-organismes viables dans une préparation sans égard à la forme, sporulée ou cellule végétative (McClintock *et al.* 1995). Dans les études effectuées avant 1989, les données étaient habituellement rapportées en nombre de spores uniquement et le format de ces données a été respecté dans la revue de littérature qui suit.

Injections intrapéritonéales ou intraveineuses, expositions diverses

Les évaluations de toxicité par injection sont requises pour simuler les cas d'exposition maximale. Depuis 1989, le protocole d'homologation américain impose l'utilisation d'une dose unique de 10^7 ufc/animal, l'observation subséquente des effets et de la mortalité ainsi que l'évaluation de la persistance du bacille dans l'organisme (McClintock *et al.* 1995).

Fisher et Rosner (1959) ont évalué les effets d'un produit appelé Thuricide (contenant quelques 10^{10} spores viables de Btk/g) sur des souris et des rats. Après injection intrapéritonéale à 5 souris, ils ont noté la mort de l'une d'elles après 6 heures, alors que chez les quatre autres divers malaises (non précisés par les auteurs) ont été observés. Les symptômes ont cependant été attribués aux additifs plutôt qu'aux micro-organismes. Ils ont par ailleurs introduit une dose de 10^{12} spores/kg de poids corporel dans l'estomac de rats sans observer de symptômes de toxicité alors que l'examen de quelques organes n'a pas révélé la présence de lésions histopathologiques.

Des cristaux purifiés des sous-espèces *israelensis* (Bti) et *kurstaki* (Btk) ont été administrés par voies orale, sous-cutanée et intraveineuse chez des souris, puis mis en présence de cellules d'érythrocytes (cheval, mouton et humain) et de culture de tissus (souris et porc) sans aucune manifestation toxique (Thomas et Ellar 1983). Dans un deuxième temps, après avoir solubilisé les cristaux dans une solution alcaline de Na_2CO_3 (pH de 9,5 à 10,5), les toxines libérées se sont avérées toxiques suite à une injection intraveineuse et sous-cutanée (doses de 15 à 30 μg de solution contenant les cristaux /g de poids corporel), les animaux étant morts durant une période de 2 à 12 heures. Il importe ici de préciser que

¹⁰ Pour plus d'information sur les β -exotoxines, consulter la section 4.1.

l'administration de cristaux solubilisés dans une solution alcaline vise à recréer le milieu basique du système digestif des insectes qui permet l'expression du potentiel toxique des δ -endotoxines (Drobniewski 1994). Thomas et Ellar (1983) ont aussi montré que l'injection intraveineuse de cristaux solubilisés en milieu alcalin (doses de 15 à 30 $\mu\text{g/g}$ de poids corporel) s'est avérée létale en quelques heures et que cette solution basique détruisait les cellules épithéliales ainsi que les érythrocytes.

Siegel *et al.* (1987) ont procédé à des injections intracérébrales de spores de Bti et de Btk, viables et autoclavées (non viables), sans cristaux, à des rats (concentrations de 10^4 et 10^7 spores/ml dans le liquide d'injection). Avec une concentration de 10^7 spores viables/ml, une mortalité notable a été enregistrée (19/24 pour le Bti et 5/6 pour le Btk) alors qu'elle était très faible avec les spores inactivées (1/24 pour le Bti et 0/6 pour le Btk). Les auteurs précisent cependant que l'injection intracérébrale de n'importe quelle bactérie non pathogène ou de spores viables pouvant germer est susceptible d'être létale et ils n'attribuent pas spécifiquement la mortalité au Bt.

Ingestion

Hadley *et al.* (1987) ont administré des préparations commerciales (Dipel et Thuricide) à des moutons pendant 5 mois. À chaque jour, les animaux ont reçu, par le biais de leur alimentation, quelques 10^{12} spores de la sous-espèce *kurstaki* (Btk). Les auteurs ont noté la présence de diarrhée chez deux moutons recevant le Dipel alors qu'un animal ayant reçu le Thuricide a eu des vomissements pendant une semaine. Toutefois, au terme de l'expérience, aucune différence significative a été observée entre le poids des moutons recevant des spores de Btk et ceux du groupe témoin. Des spores ont cependant été retrouvées dans le sang et le rumen de plusieurs animaux (concentrations non précisées), confirmant ainsi leur persistance. Un examen histologique a permis de déceler des anomalies chez deux animaux, soient une hyperplasie lymphoïde dans le colon et le cæcum dans un cas, ainsi qu'une lésion pulmonaire, sans que cela puisse être attribuable au Btk.

Quant à Siegel *et al.* (1987), ils ont effectué plusieurs expériences permettant d'évaluer la toxicité du Bt, notamment par l'administration orale de 4×10^7 spores de Bti, sans les cristaux, à deux groupes de rats (spores viables et spores autoclavées). Cette ingestion ne s'est pas traduite par une symptomatologie particulière. Par ailleurs, McClintock *et al.* (1995) rapportent les résultats d'une étude d'une durée de 2 ans pendant laquelle une préparation commerciale de Btk a été donnée à des rats par le biais de leur alimentation, à raison de 8400 mg/kg de poids corporel par jour. Au terme de l'expérimentation, les seuls effets observés ont été une diminution de la masse des femelles, de la 100^e à la 104^e semaine.

Inhalation

Dans une chambre contenant du Btk sous forme de poudre de Thuricide (3×10^{10} spores) sous forme d'aérosol dans l'air, Fisher et Rosner (1959) ont forcé 10 souris à inhaler cette bruine pendant quatre périodes quotidiennes de 15 minutes durant 6 jours sans observer de symptômes cliniques ou des changements histologiques lors de l'examen *post mortem*. de Barjac *et al.* (1980) ont exposé 10 souris à une concentration de 2×10^8 spores de Bti pendant 12 minutes. Après 12 jours, l'autopsie des poumons n'a révélé aucun signe particulier.

Plus récemment, Hernandez *et al.* (1999) ont cependant mis en évidence des infections pulmonaires causées par le Bt pouvant conduire à la mort des souris ayant reçu entre 10^4 et 10^8 spores/animal. Les souches mises en cause appartiennent cependant à la sous-espèce *konkukian* (sérovar H34), originellement isolée dans un abcès humain¹¹ ainsi qu'aux sérotypes 3a3b et H14 utilisés dans des préparations commerciales de bioinsecticide. Après instillation intranasale de concentrations variant de 10^4 à 10^7 spores/animal, les auteurs ont constaté une inflammation locale et une persistance d'une dizaine de jours, alors qu'à une concentration de 10^8 spores, ils ont observé entre 80 et 100% de mortalité selon la souche utilisée. Il est cependant proposé que le choc toxique ayant conduit à la mort aurait pu être causé par une entérotoxine létale pour les souris, typique de *Bacillus cereus* une espèce proche de *B. thuringiensis*¹² (Penn et Klotz 1998, Snyderman 1998). L'interprétation de ces résultats doit cependant être faite dans le contexte où, à une concentration de 10^7 spores par animal, qui est la dose recommandée pour les tests de toxicité, aucune mortalité est survenue. Quant à Salamitou *et al.* (2000), ils ont procédé à l'instillation intranasale de concentrations allant jusqu'à 10^8 spores et 10^7 bactéries viables chez des souris. Ils ont observé des mortalités avec 10^8 spores, confirmant ainsi l'étude de Hernandez *et al.* (1999) qui a démontré l'absence d'effet létal d'une concentration ne dépassant pas 10^7 spores/animal.

Selon Siegel (2001), la transposition de l'ensemble de ces résultats à l'humain est difficile à faire à cause des concentrations utilisées qui dépassent largement ce que pourrait respirer une personne en faisant notamment ressortir qu'une dose de 10^6 spores/bactéries chez une souris de 20 g équivaut à une dose de 5×10^9 chez un humain de 100 kg. Siegel (2001) rappelle que Elliott *et al.* (1988)¹³ ont mesuré, à l'aide d'appareils personnels portatifs portés par des travailleurs forestiers et des personnes vivant à proximité de zones traitées, une exposition maximale de 5600 ufc chez les travailleurs et de 1600 ufc pour les autres personnes. Ces concentrations sont environ 100 millions de fois moindre (sur une base spores ou bactéries/kg poids corporel) que les concentrations intranasales employées par Hernandez *et al.* (1999) ainsi que Salamitou *et al.* (2000).

Expositions cutanée et sous-cutanée

Après avoir scarifié la peau de 4 lapins, Fisher et Rosner (1959) ont appliqué une concentration de $2,2 \times 10^6$ spores de Btk par animal sans noter des signes d'inflammation ou d'infection. de Barjac *et al.* (1980) ont appliqué $5,1 \times 10^7$ spores de Bti sur la peau de 10 souris sans noter une quelconque inflammation. Par ailleurs, après avoir scarifié la peau de lapins, ces auteurs n'ont relevé aucun signe particulier suite à l'application de 50 mg de Thuricide. Ils ont également procédé à une injection sous-cutanée de Bti (concentration de l'ordre de 10^8 spores) à 20 souris ainsi qu'à 10 cochons d'Inde sans pouvoir observer une manifestation pathologique quelconque.

¹¹ Pour plus d'information sur ce cas, consulter la section 4.5.3.

¹² La similitude entre ces deux espèces bactériennes est décrite à la section 4.7.

¹³ Pour plus d'information sur cette étude, consulter la section 4.5.2.

Par ailleurs, l'injection sous-cutanée de 10^9 spores/animal de Bti chez deux groupes de souris (le premier recevant des spores viables, l'autre des spores autoclavées) ne s'est pas traduite par la présence de symptômes (Siegel *et al.* 1987). La présence de Bti dans les tissus a cependant été confirmée puisque des spores viables ont été retrouvées dans tous les animaux du groupe expérimental (recevant les spores viables). La présence d'un abcès au site d'injection de tous les animaux des deux groupes a été attribuée à des constituants thermostables non identifiés plutôt qu'au Bt.

Dans leur revue de littérature, McClintock *et al.* (1995) indiquent ne pas avoir trouvé de publication faisant état d'une toxicité quelconque à l'égard de lapins soumis à une exposition cutanée de diverses espèces de Bt. Ils soulignent le cas de l'application de 2500 mg de Thuricide (équivalent à $3,4 \times 10^{11}$ spores/kg de poids corporel) qui a donné lieu à aucune manifestation. La conclusion qui s'impose est que l'application cutanée ou sous-cutanée de diverses espèces de *B. thuringiensis*, sur une peau intacte ou irritée, n'entraîne pas de réactions toxiques, ou infectieuses.

Exposition oculaire

de Barjac *et al.* (1980) ont appliqué une culture de Bti ($3,7 \times 10^7$ spores) dans les yeux de 6 lapins sans noter la présence d'irritation ou de conjonctivite. Siegel *et al.* (1987) ont appliqué 50 mg d'une formulation commerciale de Bti à des rats pendant 9 jours alors que six autres animaux ont reçu 50 mg d'une culture pure de Bti (obtenue en laboratoire) durant la même période. L'application de la solution commerciale n'a pas entraîné de symptômes alors que celle de la culture provenant du laboratoire s'est traduite par des irritations oculaires et de sévères congestions conjonctivales. Les auteurs n'ont cependant pas attribué ce résultat au Bti, mais plutôt à la nature de la formulation provenant du laboratoire qui était sous la forme d'une pâte sèche et abrasive, comparativement à la préparation commerciale constituée d'une fine poudre non abrasive. Quelques années plus tard, Siegel et Shaddock (1990a) ont inoculé les yeux de 12 lapins avec une préparation commerciale de Bti contenant $5,4 \times 10^6$ spores sans noter d'irritation ou une pathologie particulière.

4.4.2 Multiplication et persistance

Hansen (cité dans Forsberg *et al.* 1976) a rapporté une persistance d'au moins 4 semaines de spores de Btk dans la rate et le foie chez la souris ($1,2$ à $2,6 \times 10^5$ organismes/g de tissus) après injection intraveineuse d'une solution de Dipel (dose équivalente à 10^8 spores viables). Chez des souris ayant reçu du Bti par voie intrapéritonéale (équivalent à $3,4 \times 10^7$ spores/animal), de spores viables ont persisté dans la rate pendant une période de 37 et 49 jours pour les sous-espèces *kurstaki* et *israelensis* respectivement (Siegel *et al.* 1987). Une expérience similaire, avec injection intrapéritonéale de $5,4 \times 10^7$ spores/ml d'une solution contenant du Bti, a montré que la bactérie était toujours présente, en concentrations voisines à celle administrée, 80 jours après l'injection (Siegel et Shaddock 1990a). Dans ce cas, les auteurs estiment qu'il y a probablement eu multiplication, mais ils ont constaté que l'inoculum ayant servi à l'injection contenait aussi des cellules végétatives, ce qui aurait constitué un biais important expliquant les résultats.

L'ingestion d'une préparation commerciale de Btk à des rats pendant 6 jours, par l'intermédiaire de l'alimentation, a permis de constater que les micro-organismes étaient encore présents dans les fèces d'un animal après 42 jours (Laferrière et Bastille 1987). Quant à la persistance oculaire, elle a été vérifiée par Siegel et Shaddock (1990a) qui ont appliqué deux formulations commerciales dans les cul-de-sac conjonctivaux de 12 lapins pendant 2 semaines; des spores viables étaient toujours présentes après 41 jours. Par ailleurs, en utilisant une autre formulation commerciale de Bti, à une concentration de $5,4 \times 10^7$ ufc/ml, Siegel et Shaddock (1990b) ont constaté une persistance d'une semaine même après une intense irrigation de l'œil avec de l'eau. La persistance suite à l'inhalation a aussi été évaluée par Siegel *et al.* (1987) qui ont fait respirer à des rats 2×10^6 spores viables/ml d'une solution de Bti sous forme d'aérosol pendant 30 minutes. La concentration pulmonaire maximale a été notée 3 heures après l'exposition (10^4 bactéries par poumons), une absence totale étant enregistrée après 3 jours. Ces observations suggéreraient une élimination rapide du Bti des poumons, comparativement à d'autres organes où la persistance peut être de plusieurs dizaines de jours.

En ce qui concerne la redistribution de *B. thuringiensis* dans les tissus et organes, suite à divers types d'exposition, elle pourrait s'expliquer par le fait que les spores inoculées dans une région ou un tissu peuvent être véhiculées par le système lymphatique et pénétrer dans la circulation sanguine après leur passage dans le foie (Siegel *et al.* 1987, Siegel et Shaddock 1990a). Par contre, les micro-organismes inhalés seraient confinés aux poumons, sans redistribution (Siegel *et al.* 1987).

Som *et al.* (1986) ont démontré que les spores de plusieurs variétés de Bt sont incapables de se multiplier dans le système digestif de la souris. Dans leur revue de littérature, Otvos et Vanderveen (1993) confirment ces résultats en rapportant que les spores (et les cristaux) survivent vraisemblablement à leur passage dans le système digestif des mammifères, mais elles sont incapables de sporuler et de se transformer en cellules végétatives.

4.4.3 Effets synergiques

Il existe très peu de données concernant le phénomène de synergie entre *B. thuringiensis* et d'autres micro-organismes. Warren *et al.* (1984) font état d'un tel phénomène entre le Bti et *Acinetobacter calcoaceticus anitratus* dans le contexte d'un cas clinique humain¹⁴. Il est postulé que des protéases de *A. calcoaceticus* auraient pu provoquer une activation des toxines de Bti, situation cependant jugée exceptionnelle par Drobniowski (1994). Quant à Green *et al.* (1990), ils font état de la possibilité que le Btk puisse agir à titre de micro-organisme opportuniste, pouvant contribuer à l'aggravation d'une autre infection, ou comme co-pathogène¹⁵.

Plus récemment, Hernandez *et al.* (2000) ont mis en évidence un effet synergique marqué entre le virus de l'Influenza et une souche de la sous-espèce *konkukian* (sérotypage H34), préalablement isolée chez un humain suite à une blessure¹⁶ ainsi que la souche 3a3b (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), utilisée commercialement. Après avoir inoculé à des souris le virus de l'Influenza A (à des concentrations correspondant à 2 et 4% de la DL₅₀) et les deux souches de Bt (10^2 , 10^4 et 10^7 spores)

¹⁴ Pour plus d'information sur ce phénomène de synergie, consulter la section 4.5.3.

¹⁵ Pour plus d'information à ce sujet, consulter la section 4.5.3.

¹⁶ Pour plus d'information sur ce cas, consulter la section 4.5.3.

par instillation intranasale, les auteurs ont noté des mortalités importantes (allant de 20 à 100% selon la souche de Bt et la concentration en spores). En contre-partie, l'instillation des souches de Bt ou du virus seul n'a induit aucune mortalité. Les auteurs estiment donc que le Bt s'est comporté comme un agent de surinfection.

4.4.4 Effets sur des animaux immunodéprimés

Les résultats expérimentaux obtenus avec des animaux immunodéprimés ont été essentiellement obtenus chez des souris par voie intrapéritonéale. Siegel *et al.* (1987) ont procédé à une injection de $3,4 \times 10^7$ spores/animal d'une solution commerciale de Bti à 42 souris avec thymus¹⁷ (euthymiques). Trois souris sont mortes en début d'expérience, situation qui serait toutefois attribuable à des blessures causées par l'injection. Quelques 49 jours après l'injection, toutes les autres souris étaient vivantes alors que le Bti était présent dans leur rate. Parallèlement, les auteurs ont injecté la même dose à 42 souris sans thymus (athymiques), ce qui s'est traduit par la mort de 36 animaux, cinq à 10 heures plus tard, sans que l'autopsie puisse cependant en révéler la cause exacte. Siegel *et al.* (1987) ont aussi injecté $2,6 \times 10^7$ spores d'une poudre commerciale «lavée»¹⁸ de Bti à 30 souris athymiques sans enregistrer de mortalité 36 jours plus tard. Pour expliquer ces résultats paradoxaux (mortalité et survie dans des conditions similaires), les auteurs proposent que le lavage des solutions commerciales pourraient avoir éliminé divers sous-produits ou des exotoxines. À titre de confirmation, Siegel et Shadduck (1990b) ont injecté à 24 souris athymiques $2,7 \times 10^7$ spores d'une solution commerciale lavée de Bti. Aucune mortalité a été enregistrée, mais le bacille a été éliminé plus rapidement chez les souris euthymiques.

La souche virulente de la sous-espèce *konkukian* (sérovir H34), isolée par Hernandez *et al.* (1998)¹⁹ s'est révélée capable de provoquer une importante infection ainsi qu'une myonécrose²⁰ chez des souris immunodéprimées (avec du cyclophosphamide) suite à une application cutanée de 10^7 ufc/animal. Cette souche, naturellement présente dans le sol, n'est cependant pas utilisée dans la formulation de bio-insecticides.

Par ailleurs, la mortalité des souris rapportée par Hernandez *et al.* (2000), dans le cadre d'un effet synergique en présence d'une infection au virus de l'Influenza²¹, pourrait avoir été causée par un effet d'immunodépression provoqué par le virus, rendant ainsi les animaux très vulnérables aux toxines des souches testées. La thèse impliquant le caractère d'immunodépression dans la mortalité des animaux est soutenue par le fait qu'un groupe traité avec un antibiotique, l'amantadine, n'a pas été affecté par la présence concomitante du virus et du Bt. Selon les auteurs, il pourrait être risqué de procéder à un épandage de Bt si des personnes immunodéprimées se trouvaient à proximité des secteurs traités ou s'il existait une situation d'épidémie grippale.

¹⁷ Le thymus est un organe lymphoïde rétrosternal dont le volume décroît après les années. Il est impliqué dans les processus immunitaires.

¹⁸ La poudre a été mise en suspension dans une solution saline tamponnée; le processus a été répété à cinq reprises avant d'être utilisée.

¹⁹ Pour plus d'information, consulter la section 4.5.3.

²⁰ Il s'agit d'une nécrose musculaire.

²¹ Pour plus d'information à propos de cet effet synergique, consulter la section 4.4.3.

Siegel (2001) estime qu'il faut être très prudent dans l'interprétation de l'ensemble de ces résultats en vue de leur transposition aux humains. Par exemple, il mentionne que la persistance de spores ou de bactéries dans l'organisme ne doit pas être assimilée à une infection et qu'une dose infectante de 10^6 ufc chez une souris de 20 g équivaut à 5×10^9 ufc chez un humain de 100 kg. Selon lui, les interprétations de plusieurs études sont ambiguës et laissent croire que le *Bacillus thuringiensis* est une espèce pathogène «opportuniste» sans préciser le sens que l'on devrait accorder à ce terme dans un cadre plus général.

4.4.5 En résumé

Principalement effectués avec des animaux de laboratoire (ex. rats et souris), les essais expérimentaux font état d'une gamme variée de conséquences, allant de l'absence totale de réaction à une importante mortalité. L'ingestion et l'exposition cutanée ou sous-cutanée n'ont généralement pas engendré d'effets notables. Quant à l'inhalation, elle peut se traduire par des réactions pathologiques importantes, voire la mort, mais seulement lorsque les doses de spores utilisées sont très importantes et dépassent très largement celles auxquelles les humains seraient normalement exposés. Il importe par ailleurs de noter que, expérimentalement, un effet synergique marqué a été noté entre le Bt et le virus de l'Influenza chez des souris, causant la mort de plusieurs animaux. Finalement, avec des animaux immunodéprimés, l'injection de spores de Bt a un effet létal. Cela est une conséquence directe de l'absence totale de protection immunologique chez ces animaux, démontrant ainsi que l'innocuité des préparations de Bt est tributaire d'un système immunitaire fonctionnel.

4.5 Effets chez les humains

Les personnes qui travaillent à la production de Bt ou qui sont impliquées dans son épandage peuvent surtout être exposées par contact cutané ou inhalation. Quant aux populations qui vivent à proximité des zones d'épandage, elles peuvent être exposées au Bt consécutivement à la dérive des aérosols. En ce qui concerne l'usage du Bt en agriculture, il peut entraîner notamment une contamination des denrées alimentaires. Les voies de contamination potentielle sont donc nombreuses et, dans ce contexte, un certain nombre d'études ont été effectuées afin d'en vérifier les effets.

4.5.1 Exposition expérimentale

L'exposition expérimentale, faisant appel à des volontaires, est plutôt rare puisque seulement deux publications en font état. Fisher et Rosner (1959) ont été les premiers à vérifier expérimentalement les effets du Btk sur les humains en utilisant 18 volontaires qui ont ingéré quotidiennement une importante quantité de Thuricide (équivalant à 3×10^9 spores viables) pendant 5 jours. Des examens médicaux exhaustifs, effectués jusqu'à 5 semaines après l'exposition, n'ont démontré aucun effet et, de plus, les analyses plasmatiques et urinaires n'ont pas permis de déceler des variations anormales. L'absence de symptômes cliniques ou de malaises peut s'expliquer par le fait que la δ -endotoxine est inactivée par le pH acide de l'estomac (Drobniewski 1994). Une autre étude expérimentale s'est traduite par des manifestations pathologiques importantes. L'ingestion, par des volontaires, de la sous-espèce *galleriae* avec des aliments (concentration de 10^5 à 10^9 cellules/g d'aliment) a entraîné divers symptômes gastro-intestinaux : nausées, vomissements, crampes, diarrhées et fièvre. Ces symptômes

auraient cependant pu être causés par la β -exotoxine présente dans la préparation utilisée pour contaminer les aliments dans cette étude (WHO 1999).

4.5.2 Exposition pendant l'épandage – études épidémiologiques

Elliott *et al.* (1988) ont évalué la concentration atmosphérique de Btk à laquelle divers groupes étaient exposés suite à un épandage contre la spongieuse. Après avoir équipé des personnes avec un échantillonneur d'air portatif, ils ont mesuré une concentration allant jusqu'à 10^4 spores/m³ dans l'environnement immédiat des travailleurs les plus exposés, alors qu'elle a été de l'ordre de 10^3 spores/m³ pour la population indirectement exposée, en périphérie des zones d'épandage.

Dans le cadre d'un programme de contrôle de la Tordeuse des bourgeons de l'épinette, Bastille *et al.* (1984) ont vérifié les conséquences possibles de la dérive du Btk, tant chez les travailleurs exposés qu'au sein de la population limitrophe aux secteurs traités dans la région de Rivière-du-Loup (Québec). Aucun symptôme particulier a été rapporté malgré la présence de bacilles dans l'environnement (atmosphère, eau et sol) hors des zones traitées. Bastille *et al.* (1985) ont constaté la présence du Btk dans l'intestin de certains travailleurs ainsi que chez des écoliers vivant à proximité d'un secteur traité 3 mois après la période d'épandage, confirmant ainsi l'ingestion du micro-organisme. Les auteurs ont par ailleurs noté la présence de la bactérie dans les voies respiratoires supérieures chez des personnes côtoyant de près les travailleurs exposés (famille immédiate), ce qui mettrait en évidence une contamination par contact direct (personne à personne) ou suite à une exposition indirecte par les vêtements, par exemple. Cette hypothèse a aussi été soulevée par Elliott *et al.* (1988) qui ont noté la présence du Bt dans une résidence située à plus de 75 km d'une zone d'épandage, mais habitée par une personne dont le travail l'obligeait à fréquenter cette zone.

La confirmation de la présence de spores ou de bactéries circulant dans l'organisme humain, à l'aide du dosage des anticorps dans le sang, a été démontrée par Bastille *et al.* (1985) qui ont recherché la présence d'immunoglobulines chez 28 travailleurs subissant diverses expositions (techniciens de laboratoire et travailleurs attitrés à la préparation de l'insecticide) dans la région de Rivière-du-Loup (Québec). Des anticorps, surtout des IgM, ont été retrouvés en concentration notable chez seulement 5 personnes et la formation d'immunoglobulines était liée à l'intensité et à la fréquence de l'exposition. Laferrière et Bastille (1987) ont comparé les réponses immunologiques à une solution de Btk chez des travailleurs exposés au cours des années 1984 à 1986. Ils ont constaté que les réactions immunologiques engendrées étaient plus faibles que celles induites par les bactéries et, que ces anticorps persistaient quelques mois. Une autre étude de nature immunologique a aussi été effectuée chez des populations humaines exposées au Btk pendant les pulvérisations aériennes contre la Tordeuse des bourgeons de l'épinette en Gaspésie, dans les années 1980 (Letarte 1985). Elle mettait en cause 38 travailleurs préposés à l'une ou l'autre des étapes de la pulvérisation, 80 résidents permanents vivant près des lieux d'arrosage et 80 personnes-contrôle habitant en milieu urbain et qui n'auraient jamais été exposées au Bt. Les analyses ont démontré que près du tiers des travailleurs (n=12) avait des anticorps contre le Bt après les arrosages. Cependant, chez les résidents en périphérie ainsi que chez ceux du milieu urbain, le nombre de personnes avec de tels anticorps était très faible et comparable dans chacun des groupes (n=2 dans chaque cas). Cette situation s'expliquerait, dans le premier cas, par la fréquentation de lieux d'arrosages et, dans le deuxième groupe, par ce que les auteurs qualifient d'immunité naturelle.

Green *et al.* (1990) ont effectué une étude épidémiologique (surveillance passive) en Oregon lors de l'épandage forestier de Btk dans des zones peuplées (80 000 personnes en 1985 et 40 000 personnes en 1986). Les résultats de cette analyse n'ont pas permis de mettre en évidence des problèmes de santé attribuables au Bt, à l'exception de 3 cas cliniques litigieux et d'un travailleur exposés à une quantité importante de la formulation commerciale utilisée²².

Noble *et al.* (1992) ont étudié l'effet de l'exposition de travailleurs et d'une population vivant dans le voisinage d'une zone largement traitée par l'insecticide Foray 48B (contenant du Btk) dans le cadre d'un vaste programme d'éradication de la spongieuse dans la région de Vancouver (Colombie-Britannique). Cette importante étude épidémiologique a considéré les aspects suivants: micro-organismes ingérés par le biais des aliments pendant et après l'épandage, suivi médical des travailleurs exposés, recours à un groupe «sentinelle» de médecins dans le cadre d'une surveillance active par téléphone, fréquence des visites dans les cliniques médicales et les hôpitaux ainsi que diverses analyses effectuées à la suite du prélèvement d'échantillons cliniques. L'information provenant de 26 000 appels téléphoniques, de 1140 visites en clinique médicale, de 3500 personnes admises à l'urgence des hôpitaux et de 120 travailleurs exposés au Btk a été colligée de même que les résultats de laboratoire de plus de 400 échantillons. Une absence de risque accru de symptômes ou de maladies pouvant être associés à la présence du Btk a pu être démontrée. Les échantillons prélevés dans le nez des travailleurs les plus exposés (concentration dans l'air ambiant de la zone traitée variant de 3×10^3 à 6×10^6 spores/m³), se sont avérés positifs quant à la présence du Btk. Dans la plupart des cas, la présence de spores a été notée durant une période de 14 à 30 jours après l'exposition. Il importe cependant de noter que plusieurs travailleurs se sont plaints de divers symptômes durant la période d'épandage²³.

À l'occasion d'un programme d'éradication de la spongieuse, effectué en 1999 dans la région de Victoria (Colombie-Britannique), de Amorin *et al.* (2001) ont montré que la souche de Btk prélevée dans les voies nasales de volontaires était présente avant la période d'épandage, mais augmentait de manière significative durant cette période chez les personnes vivant à l'intérieur de la zone traitée. Par contre, au terme du programme d'épandage, il n'y avait plus de différence significative entre les personnes vivant à l'intérieur et à l'extérieur de la zone traitée. Par ailleurs, aucune manifestation clinique pouvant être reliée à la présence du Bt n'a été rapportée.

En étudiant trois groupes de travailleurs agricoles, Bernstein *et al.* (1999) ont conclu que le degré d'exposition déterminait l'intensité des réactions immunologiques. Le premier groupe était constitué de 48 personnes récoltant divers fruits et légumes fréquemment traités au Bt, le deuxième groupe comprenait 44 personnes faiblement exposées, parce que travaillant à au moins 5 km des zones avec épandage, alors que 34 travailleurs (3^e groupe) étaient considérés comme modérément exposés parce qu'ils manipulaient, pour l'emballage, les végétaux traités au Bt. Les auteurs ne rapportent aucun symptôme ou allergie pouvant être liés à l'exposition. Cependant, dans le groupe le plus exposé, près de 50% des travailleurs ont eu une réaction d'hypersensibilité localisée suite à un test cutané (allergie atopique), contre moins de 15% dans les deux autres groupes. De plus, après 1 mois sans exposition au Bt, la présence du bacille a été notée dans les voies nasales de 66% des personnes du premier groupe

²² Pour plus d'information sur ces cas, consulter la section 4.5.3.

²³ Pour plus d'information sur ces cas, consulter la section 4.5.3.

alors qu'il était de moins de 10% dans les deux autres groupes. Les auteurs précisent que la sensibilisation au Bt, responsable des réactions au test cutané, se ferait surtout par l'intermédiaire de débris de cellules végétatives plutôt que par les spores. Cette assertion est supportée par l'étude de Tayabali et Seligy (2000), lesquels ont montré que des réactions cytotoxiques provoquées par le Bt à l'égard de diverses lignées cellulaires humaines sont plus fréquentes en présence de bactéries (cellules végétatives).

Il importe finalement de faire état des analyses effectuées au Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ). À la demande du ministère de la Santé et des Services sociaux, le LSPQ a mis sur pied en 1996 un programme de surveillance des infections au Bt en collaboration avec l'Institut de recherche en biotechnologie. Les centres hospitaliers du Québec ont fait parvenir au LSPQ, de janvier 1996 jusqu'à la fin de 2000, les souches de *Bacillus* sp. présumées *cereus* isolées dans leurs laboratoires. Les souches reçues ont été caractérisées afin de déterminer s'il pouvait plutôt s'agir de *Bacillus thuringiensis* et, le cas échéant, d'en préciser la variété. Aucune souche de Bti n'a été identifiée parmi les 89 isolats reçus, seules trois souches de Btk ayant été trouvées en 1995 et 1996. Pour ces trois cas, il a été conclu, avec les médecins traitants, que le Bt n'était pas la cause de l'infection, leur présence résultant probablement d'une contamination des spécimens en laboratoire (Lorange 2001).

4.5.3 Cas cliniques

Samples et Buettner (1983) ont rapporté le cas d'un travailleur agricole ayant reçu dans l'œil une éclaboussure de l'insecticide Dipel contenant du Btk. Malgré une irrigation à l'eau et un traitement aux antibiotiques, une irritation oculaire s'est produite, ce qui a entraîné un traitement aux corticostéroïdes. Un ulcère cornéen s'est développé 10 jours après l'incident, mais il s'est résorbé 2 semaines plus tard à la suite de traitements appropriés. L'étiologie de l'infection n'a pas été clairement identifiée et ne peut pas être spécifiquement attribuable au Bt puisque des bactéries viables sporulées n'ont pas été identifiées dans le frottis de l'œil effectué lors de l'apparition de l'ulcère. C'est le seul cas rapporté d'une pathologie oculaire notable impliquant une solution de Bt. Selon Drobniewski (1994), les similitudes entre les espèces *B. thuringiensis* et *B. cereus*, cette dernière étant reconnue comme un micro-organisme pathogène potentiel de l'œil, nécessitent une attention particulière lorsqu'un problème oculaire semble découler de la présence du Bt. Un examen plus poussé devrait être effectué afin d'avoir la certitude de ne pas être en présence de *B. cereus*²⁴.

Dans le cadre de leur programme de surveillance passive effectué en Oregon à la suite de traitements aériens au Btk, Green *et al.* (1990) ont rapporté l'isolement du bacille à partir d'échantillons provenant de 55 personnes suite à des examens cliniques pour diverses pathologies. Dans 52 cas, les auteurs proposent que le Bt n'aurait été qu'un contaminant et non l'agent causal des infections diagnostiquées. Dans les trois autres cas, le rôle du bacille n'a pas été élucidé puisque ces personnes souffraient de problèmes de santé importants antérieurs à la période de pulvérisation et étaient considérées comme immunodéprimées. En ce qui concerne les travailleurs, un seul a développé une dermatite, du prurit et de l'érythème après avoir reçu des éclaboussures de la solution de Bt au visage.

²⁴ Pour plus d'information à ce sujet, consulter la section 4.7.

Lors de leur étude de la région de Vancouver, dans le cadre du programme de pulvérisations aérienne et terrestre avec des solutions commerciales contenant de BtK contenant des additifs, Noble *et al.* (1992) ont rapporté diverses manifestations cliniques signalées par environ 63% des travailleurs au sol. Les manifestations les plus fréquentes ont été: irritation de la peau et gerçure des lèvres (34%), assèchement de la bouche et de la gorge (29%), écoulement nasal (27%), rougeur des yeux (20%) et problèmes respiratoires mineurs comme la toux (20%). Les symptômes se sont avérés transitoires et liés au degré d'exposition, certains travailleurs étant plus présents sur le terrain à cause du temps supplémentaire effectué.

Un cas d'infection au Bti (6×10^8 spores/ml dans le liquide contaminant), qui a donné lieu à une lymphangite²⁵, a été rapporté suite à une injection hypodermique accidentelle dans la main d'un travailleur de laboratoire (Warren *et al.* 1984). Cependant, en plus du Bti, le liquide contenait aussi des spores d'*Acinetobacter calcoaceticus anitratus* (6×10^8 spores/ml); le genre *Acinetobacter* regroupe des espèces agissant surtout à titre d'agents infectieux opportunistes, typiques des infections nosocomiales (Nerad *et al.* 1998). Des tests subséquents, effectués en injectant le filtrat (sans bactéries) provenant du bouillon de culture des micro-organismes à des lignées de cellules de mammifères ont permis de mettre en évidence une réaction toxique modérée avec le filtrat du Bt, mais une forte réaction de nécrose avec le mélange bactérien. Des essais effectués avec des animaux ont montré que l'injection du filtrat de bouillon de culture de l'une ou l'autre des bactéries n'induisait aucune réaction suite à une injection intrapéritonéale alors que l'injection simultanée des deux micro-organismes entraînait des réactions toxiques importantes. Ces observations tendent à confirmer l'absence d'un pouvoir pathogène du Bt, mais laisse entrevoir une possibilité de surinfection en présence d'un autre micro-organisme pathogène.

Une souche de Bt, la sous-espèce *konkukian* (sérovir H34) a été isolée d'un important abcès du genou et de la cuisse chez un jeune militaire blessé suite à l'explosion d'une mine (Hernandez *et al.* 1998). Après avoir effectué des essais chez des souris immunodéprimées²⁶, les auteurs concluent que la souche isolée pouvait être à l'origine de l'infection. La probabilité qu'elle soit répandue dans l'environnement est cependant très faible (Hernandez *et al.* 1999).

4.5.4 Exposition suite à l'ingestion d'eau potable ou d'aliments contaminés

Dans certains pays asiatiques, du Bti a été inoculé dans des réservoirs d'eau potable dans le cadre de programmes de contrôle contre les moustiques et aucune réaction a été rapportée chez les humains. En Afrique, une situation similaire existe puisque des cours d'eau sont régulièrement aspergés d'insecticide à base de Bti sans que l'on fasse état de problèmes de santé possiblement liés à cette situation (WHO 1999).

²⁵ Il s'agit d'une inflammation des vaisseaux lymphatiques.

²⁶ Pour plus d'information sur cette étude, consulter la section 4.4.4.

En ce qui concerne les aliments, une recherche a permis de mettre en évidence la présence de la sous-espèce *kurstaki* dans divers types de produits alimentaires (pâtes, pain et lait) qui ne provenaient pas de secteurs soumis à des épandages de Bt (Damgaard *et al.* 1996). La contamination était relativement importante (ex. de 10^3 à 10^4 ufc/g de pâtes) mais les auteurs ont été incapables d'identifier la source, précisant que la contamination pourrait découler d'un épandage agricole au Bt. La plupart des souches isolées étaient cependant capables de synthétiser une entérotoxine similaire à celle du *B. cereus* responsable d'empoisonnement alimentaire.

En testant une dizaine de formulations commerciales de bioinsecticides contenant du Bt, Daamgard (1995) a démontré la capacité de toutes ces souches à produire une toxine diarrhéique (ou toxine intestino-nécrotique) du même type que celle synthétisée par *B. cereus*, bien qu'à des concentrations moindres. Selon l'auteur, si des spores de Bt sont capables de donner naissance à des bactéries viables, une infection suivie d'une symptomatologie de type gastro-intestinale est théoriquement possible. L'incapacité des spores de Bt de germer dans le système digestif des mammifères a toutefois été démontrée à quelques reprises, ce qui laisse croire que leur ingestion ne représente pas un risque notable pour la santé humaine (WHO 1999). Jackson *et al.* (1995) ont cependant relevé la présence de *B. thuringiensis* dans les selles de quatre personnes souffrant de gastro-entérite dans une institution de soins prolongés au Canada. Dans trois cas, seul *B. thuringiensis* a été identifié alors que dans un autre cas *B. cereus* a également été présent. Les auteurs soulignent le rôle possible du Bt dans l'étiologie de la gastro-entérite tout en notant cependant que la proximité phylogénétique des deux espèces est un facteur de confusion quant au rôle de *B. thuringiensis*²⁷. De plus, selon Siegel (2001), puisque les lysotypes des souches de Bt prélevées dans les selles étaient différents de ceux isolés dans les aliments, il est plutôt plausible d'attribuer l'éclosion au virus Norwalk, aussi identifié chez l'un des malades.

À la lumière de ces données, il appert que le rôle de *Bacillus thuringiensis* dans l'étiologie de malaises gastro-intestinaux n'a pas encore été démontré. Sa capacité de provoquer une toxi-infection alimentaire n'a pas été démontré, mais elle ne peut pas être rejetée dans des circonstances exceptionnelles.

4.5.5 Cas des personnes immunodéprimées

Le programme de surveillance mené par Noble *et al.* (1992), dans le cadre de l'évaluation des effets des pulvérisations du Btk dans la région de Vancouver, a inclus une surveillance des personnes immunodéprimées ou atteintes de maladies affectant gravement le système immunitaire. Ils n'ont pas été en mesure de mettre en évidence une infection causée par le Btk chez ces personnes. Dans le cadre d'une étude similaire effectuée en Oregon, Green *et al.* (1990) ont identifié trois cas d'infections chez des personnes immunodéprimées à divers degrés, mais il n'a pas été possible de statuer sur le rôle du Btk. Les auteurs affirment cependant que de telles personnes constitueraient probablement le groupe le plus à risque pour le développement d'une infection suite à la contamination par le Bt.

²⁷ Pour plus d'information sur la similitude de ces deux espèces bactériennes, consulter la section 4.7.

Damgaard *et al.* (1997) ont isolé diverses souches de *B. thuringiensis* dans des infections survenues chez des grands brûlés (30 à 70% de la surface corporelle), considérés comme des personnes immunodéprimées. Il a été mis en évidence que la bactérie provenait de l'eau utilisée pour baigner les personnes lors de leur arrivée à l'hôpital. Les souches isolées n'ont toutefois démontré aucune activité larvicide, indiquant ainsi qu'elles ne provenaient pas de formulations de bio-insecticides; la présence de la δ -endotoxine a cependant été démontrée par électrophorèse sur gel. Les bacilles avaient d'abord été considérés comme appartenant à l'espèce *B. cereus*, situation qui serait fréquente en milieu hospitalier où l'on ne recherche pas les caractères spécifiques à *B. thuringiensis*, soit la présence des cristaux dans les cellules végétatives. Cela met en évidence l'importance d'une identification adéquate des micro-organismes et le fait que des infections imputées à *B. cereus* pourraient être causées par *B. thuringiensis*²⁸.

4.5.6 En résumé

L'exposition humaine au Bt provoque invariablement l'apparition d'anticorps contre ce bacille, situation par ailleurs tout à fait naturelle dans les circonstances. Par ailleurs, outre le cas exceptionnel d'un ulcère cornéen, d'un cas de lymphangite et du développement d'un abcès au genou, il n'existe aucun cas de pathologie humaine grave documenté pouvant résulter de l'exposition au Bt. De plus, dans deux des trois cas précités, le rôle étiologique du Bt n'a jamais été clarifié, l'ulcère cornéen ayant pu résulter d'une infection par *Bacillus cereus*, la lymphangite ayant pu découler d'un effet synergique avec *Acinetobacter calcoaceticus*, alors que l'abcès au genou a été consécutive à une grave blessure infectée par une souche «sauvage» de Bt, *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian*, non utilisée commercialement. Toutes les études expérimentales, avec des volontaires, ainsi que les données épidémiologiques obtenues à partir de populations de dizaines de milliers de personnes exposées n'ont pas permis de mettre en évidence un effet attribuable à l'insecticide. Même les personnes immunodéprimées exposées ne semblent pas avoir souffert d'une réaction notable. Des observations effectuées en milieu hospitalier chez des grands brûlés ont mis en évidence la participation de *Bacillus thuringiensis* à l'infection de certaines de ces personnes, mais dans tous les cas les souches ne sont pas révélées provenir d'un produit commercial, étant dépourvues d'effet larvicide.

4.6 *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*

Les liens phylogénétiques étroits qui unissent ces deux espèces ont fait l'objet de plusieurs études depuis les années 1970. La présente section est un résumé de l'état des connaissances et s'inscrit dans ce document à titre d'information complémentaire à l'égard de la protection de la santé publique.

Parmi les espèces du genre *Bacillus* ayant un pouvoir pathogène chez l'humain, *B. cereus* est probablement la plus fréquemment isolée en milieu clinique. Bien que l'on rapporte des infections oculaires et systémiques opportunistes (pouvant conduire à une septicémie), ce bacille est surtout connu pour être responsable d'intoxications gastro-intestinales (Drobniewski 1993). La bactérie peut sécréter deux entérotoxines, l'une qualifiée d'émétique qui est thermostable (à 120°C pendant au moins 90 minutes) et résistante à la protéolyse, alors que l'autre est appelée exotoxine diarrhéique (ou intestino-nécrotique). Dans le premier cas, le riz est principalement à l'origine de l'intoxication alors

²⁸ Pour plus d'information à ce sujet, consulter la section 4.7.

que les aliments protéiques à base de viande ou de lait sont plus souvent associés au développement de l'entérotoxine diarrhéique (Drobniewski 1993, Snyderman 1998). Bien que la cuisson puisse en principe détruire le bacille et les toxines, il a été démontré que l'on retrouvait des bactéries capables de produire les entérotoxines dans des aliments cuits contenant notamment des nouilles, des épices et des légumes (Rusul et Yaacob 1995).

Sur la base de l'analyse de l'ARNr (acide ribonucléique ribosomal), une étude menée sur le genre *Bacillus* a pu mettre en évidence cinq groupements distincts. Dans ce cadre expérimental, les espèces *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* font non seulement partie du même groupe, mais dans l'ensemble du genre (environ 70 espèces), ce sont celles qui ont la plus grande similitude phylogénétique (Ash *et al.* 1991). Cette observation a été confirmée par Bourque *et al.* (1995) sur la base d'une évaluation fondée sur l'analyse des sous-unités 16S à 23S de l'ARNr. Par ailleurs, en se basant notamment sur l'analyse de 15 gènes responsables de la synthèse de diverses enzymes, Carlson *et al.* (1994) ont proposé de considérer *B. cereus* (Bc) et *B. thuringiensis* comme étant deux sous-espèces appartenant à la même espèce. Cette similitude entre les deux espèces a aussi été confirmée par une analyse des lysotypes effectuée avec des bactériophages (Ahmed *et al.* 1995). De plus, selon Helgason *et al.* (2000a), la seule caractéristique distinctive qui existe entre Bc et Bt est la présence de gènes plasmidiques responsables de la formation du corps d'inclusion parasporal chez le Bt (endotoxine delta); en cas de perte de ces plasmides, il devient alors difficile de distinguer ces deux micro-organismes.

Plusieurs bacilles présents dans les aliments et initialement identifiés comme étant *B. cereus* se sont plutôt révélés être *B. thuringiensis* après une identification plus poussée (Rusul et Yaacob 1995). Plusieurs auteurs ont d'ailleurs signalé la confusion qui existe quant à l'identification précise de l'espèce impliquée, tant dans des intoxications alimentaires (Jackson *et al.* 1995) que systémiques (Damgaard *et al.* 1997). Au-delà de cette confusion d'identification, on souligne le risque d'intoxication strictement lié à l'ingestion de *B. thuringiensis* puisque la présence d'entérotoxines a été formellement démontrée chez plusieurs souches de Bt, tant d'origine naturelle (Damgaard *et al.* 1996, Perani *et al.* 1998) que chez celles utilisées dans des formulations commerciales de bio-insecticides (Damgaard 1995). Plus récemment, Helgason *et al.* (2000b) ont montré que Bc et Bt étaient conjointement associés à des infections buccales, notamment chez des personnes ayant des périodontites.

Dans le contexte des cas cliniques rapportés, des connaissances sur les liens phylogénétiques entre *B. cereus* et *B. thuringiensis* ainsi que d'une confusion potentielle quant à l'identification du véritable bacille responsable de certaines infections ou intoxications, l'emploi de l'insecticide à base de Bt devrait se faire en tenant compte d'un potentiel pathogène de ce dernier (WHO 1999, Tayabali et Seligy 2000). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) précise d'ailleurs que les normes de plusieurs pays européens concernant la contamination des aliments par *B. cereus* (10^4 à 10^5 micro-organismes/g d'aliment) devraient aussi inclure la présence du Bt puisque les méthodes usuelles d'identification ne permettent pas de les différencier adéquatement (WHO 1999).

Ces observations montrent que la similitude entre les espèces *B. thuringiensis* et *B. cereus* engendre une confusion quant à l'étiologie du Bt dans certaines gastro-entérites. Des études laissent cependant entendre que le Bt pourrait être effectivement impliqué dans le déclenchement de symptômes gastro-intestinaux, notamment suite à la découverte de la production d'entérotoxines par plusieurs souches. Contrairement à l'exposition cutanée et à l'inhalation qui n'engendrent pas de réactions pathologiques chez l'humain, l'ingestion aurait un pouvoir pathologique potentiel. Il reste toutefois à le démontrer hors de tout doute et à mettre en évidence des cas d'intoxication alimentaire réellement causés par le *Bacillus thuringiensis*.

4.8 Autres constituants dans les formulations commerciales de Bt

Outre les spores et les cristaux, les formulations commerciales de Bt contiennent essentiellement deux grands groupes de composés : des résidus et composés organiques divers issus du processus de fermentation ainsi que des additifs (aussi appelés adjuvants ou composés inertes) introduits pour favoriser la dissémination et l'action des spores et des cristaux.

Les spores de *Bacillus thuringiensis* sont obtenues par fermentation dans un milieu de culture approprié assurant une production optimale des cristaux. On y retrouve habituellement une source azotée (sous forme d'acides aminés ou de polypeptides), du glucose ou de l'amidon et des éléments minéraux. Les bactéries viables qui sont introduites dans le milieu de culture sporulent lorsque les éléments nutritifs sont épuisés. À la suite de la fermentation, le matériel particulaire (contenant les spores, les cristaux, des débris cellulaires et du matériel organique insoluble) est séparé du milieu de culture par filtration ou centrifugation. Après un séchage partiel, une pâte est obtenue. Celle-ci constitue la matière active utilisée dans la confection des préparations commerciales (Lacoursière et Boisvert 1994). En plus des spores et des cristaux contenant la pro-endotoxine delta, cette pâte contient également des résidus issus de la fermentation qui sont essentiellement des sucres et des acides aminés non utilisés par les micro-organismes, des débris cellulaires, des métabolites secondaires (composés organiques complexes formés de protéines, de lipides et de polysaccharides) engendrés par la croissance microbienne ainsi que des traces de diverses substances utilisées dans le processus de fermentation, comme des agents tensio-actifs (anti-moussant) (Seligy *et al.* 1997).

En ce qui concerne les additifs ajoutés par les entreprises qui commercialisent le Bt, il est habituellement impossible d'en connaître l'identification exacte, cette composition étant protégée par le secret industriel (Lessard *et al.* 1996). Malgré cette restriction, la nature globale des principaux additifs utilisés pour préparer les formulations est connue : des agents de conservation permettant d'accroître la stabilité du bio-insecticide; des adhésifs améliorant l'adhérence de la formulation au feuillage des plantes; des agents de protection contre le rayonnement UV permettant de réduire la photodégradation; des agents dispersants pour favoriser la dispersion de la formulation sur la surface des plantes traitées (MENV 1999). À ces composés, s'ajoutent aussi des émulsifiants et des agents anti-moussant facilitant la manipulation, le mélange et l'application du bioinsecticide; des produits stabilisateurs (comme des agents antioxydant ou antibactérien) favorisant le maintien de l'intégrité biologique jusqu'à la date de péremption indiquée; des agents permettant de rendre plus attrayant le produit pour les insectes visés (Lacoursière et Boisvert 1994).

van Netten *et al.* (2000) semblent être les seuls à avoir publié une étude sur l'identification des composés volatils d'une formulation commerciale. En utilisant le Foray 48B, formulé avec du Btk, ils en ont identifié 38 par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Parmi les principaux composés volatils identifiés, notons les suivants: des sydnones, qui sont des dérivés de l'acide acétique et de composés de type N-nitrosophényl-glycine, ayant des propriétés photochromiques (Merck 1989) probablement responsables de la couleur de la formulation; du triméthyl-phosphine, un dérivé de la phosphine (PH_3 – un gaz réactif et toxique résultant de la décomposition de la matière organique azotée), possiblement responsable de l'odeur caractéristique du Foray 48B; de l'hydroxytoluène butylé (BHT), un antioxydant fréquemment utilisé dans les aliments (Santé Canada 1996) dont l'innocuité a cependant été remise en cause à la fin des années 1980, parce que soupçonné de jouer un rôle dans la cancérogénèse (Doucet-Leduc 1991); de l'acide benzoïque, largement utilisée en alimentation à titre d'agent anti-microbien (Chipley 1983). Les auteurs (van Netten *et al.* 2000) font remarqué que seulement cinq des composés identifiés se retrouvent sur la liste de l'Environmental Protection Agency (EPA) qui comprend plus de 2000 additifs pouvant être utilisés dans la formulation des pesticides; ils laissent entendre qu'une certaine incertitude sur l'identification des produits, résultant notamment de la dégradation des composés initialement introduits dans la formulation, pourrait expliquer cette observation. Ils ont par ailleurs tenté de retracer ces composés volatils dans l'environnement atmosphérique immédiat d'un lieu d'épandage sans y parvenir. Selon eux, ces substances ne seraient donc pas présentes dans l'air suite à un épandage et ne représenteraient pas un danger notable.

Afin d'être homologuée, tous les ingrédients entrant dans une formulation commerciale de Bt sont évalués. Selon les responsables de l'homologation, les additifs sont présents en très faibles concentrations lors d'applications sur le terrain, doses auxquelles elles ne pourraient pas engendrer des effets toxiques pour l'être humain (CSE 1995). Cependant, additifs contenus dans les formulations commerciales ont démontré une capacité d'irritation oculaire, cutanée ou respiratoire (Lessard *et al.* 1996). C'est pourquoi plusieurs études attribuent à ces substances certains effets observés tant chez les animaux de laboratoire que chez les humains²⁹. Dans ce contexte, où il est impossible d'obtenir la liste des additifs utilisés dans les formulations commerciales, la preuve de leur innocuité ne repose que sur les données confidentielles fournies en vue du processus d'homologation gouvernemental.

²⁹ Pour plus d'information sur ces effets, consulter les sections 4.4 et 4.5.

5. CONCLUSION

Pouvant être utilisé dans le contrôle vectoriel afin d'assurer la protection de la santé publique contre le virus du Nil occidental (VNO) sur le territoire québécois, selon les informations disponibles, s'il est employé selon les recommandations du fabricant, le méthoprène s'avère un larvicide sans risque notable pour les mammifères et les humains, notamment aux doses utilisées pour éradiquer les insectes ou aux concentrations résiduelles qui pourraient être retrouvées dans l'environnement.

Quant au *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), ses propriétés en font un produit de choix pour contrôler la transmission du VNO. De plus, selon les informations actuelles, l'utilisation des insecticides à base de *Bacillus thuringiensis* ne présente pas de risques notables pour la santé publique. Les formulations employées au Québec ne semblent pas contenir d'organismes pathogènes ni de substances toxiques aux doses appliquées sur le terrain. Toutefois, comme dans tout programme d'épandage de pesticides, la population en général, dont les personnes allergiques, les hypersensibles et les immunodéprimés, doivent éviter d'être exposées durant l'application du produit. Le respect des règles de sécurité pour restreindre l'exposition de la population et pour la protection individuelle des applicateurs est primordial. Le respect des restrictions inscrites sur l'étiquette du fabricant, l'application de l'insecticide selon les règles de l'art par des professionnels certifiés et formés à cette fin, de même qu'une utilisation non abusive permettent un usage du Bt qui est sécuritaire pour la population publique. L'usage du Bti dans le contrôle vectoriel du VNO demeure une alternative plus qu'intéressante à la pulvérisation d'insecticides chimiques.

6. BIBLIOGRAPHIE

ABBOTT LABORATORIES. 1992. *B.t. Products Manual – Worldwide Biotechnology Leadership*. 135p.

ADDISON, J.A. 1993. Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: a review. *Canadian Journal of Forest Research*, 23: 2329-2342.

AHMED, R., P. SANKAR-MINSTRY, S. JACKSON, H.-W. ACKERMANN et S.S. KASATIYA. 1995. *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 636-640.

ARLA (AGENCE DE RÉGLEMENTATION DE LA LUTTE ANTIPARASITAIRE). 2000. *Note sur la réévaluation : Chlorpyrifos*. REV2000-05. Le 28 septembre 2000. [En ligne] <http://www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla>

ARLA (AGENCE DE RÉGLEMENTATION DE LA LUTTE ANTIPARASITAIRE). 2001. *Fiche technique sur l'utilisation du méthoprène dans les programmes de lutte contre les moustiques*. [En ligne] <http://www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/francais/appregis/appregis-f.html> /(Page consultée le 04 juin 2001)

ASH, C., J.A.E. FARROW, S. WALLBANKS et M.D. COLLINS. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences (1991). *Letters in Applied Microbiology*, 13: 202-206.

BASTILLE, A., M. LAFERRIÈRE, J.-C. LECLERC et A. NADEAU. 1985. *Programme de surveillance médico-environnementale des pulvérisations aériennes d'insecticides biologiques Bacillus thuringiensis var. kurstaki contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette*, 1985. Département de Santé Communautaire Rivière-du-Loup. 66p.

BASTILLE, A., Y. NOILY, R. BOUDREAU, G. BOULIANE, A. NADEAU et L. PATRY. 1984. *Programme de surveillance médico-environnementale des pulvérisations aériennes d'insecticides biologiques Bacillus thuringiensis var. kurstaki contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette*, 1984. Département de Santé Communautaire Rivière-du-Loup. 64p.

BÉGIN, L. 1992. *Réflexions sur l'introduction de micro-organismes génétiquement manipulés dans l'environnement*. Ministère des Forêts du Québec. 33p. + annexes.

BÉGIN, L., P. CARDINAL et P.-M. MAROTTE. 1994. *Comportement du Bacillus thuringiensis dans le sol forestier (revue de la littérature)*. Ministère des Ressources naturelles, gouvernement du Québec. 19p.

- BERNSTEIN, I.L., J.A. BERNSTEIN, M. MILLER, S. TIERZIEVA, D.I. BERNSTEIN, Z. LUMMUS, M.K. SELGRADE, D.L. DOERFLER et V.L. SELIGY. 1999. Immune responses in farm workers after exposures to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107: 575-582.
- BIDOCHKA, M.J., L.B. SELINGER et G.G. KHACHATOURIANS. 1987. A *Bacillus thuringiensis* isolate found on grapes imported from California. *Journal of Food Protection*, 50: 857-858.
- BOLDUC, D.G., G. DELAGE, M. DIONNE, A. NANTEL, D. BOUDREAULT et S. LESSARD. 1995. L'insecticide *Bacillus thuriengiensis* et la santé humaine. *BISE*, (6) 5: 1-3.
- BOURQUE, S.N., J.R. VALERO, M.C. LAVOIE et R.C. LÉVESQUE. 1995. Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1623-1626.
- BRITISH COLUMBIA MINISTRY OF HEALTH. 1992. *Bacillus thuringiensis*. 12p.
- BULLA, L.A., D.B. BECHTEL, K.J. KRAMER, Y.I. SHETHNA, A.I. ARONSON et P.C. FITZ-JAMES. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, octobre: 147-204.
- CANTWELL, G.C. et B.A. FRANKLIN. 1966. Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8: 256-258.
- CARDINAL, P. et P.-M. MAROTTE. 1987. *Persistance des spores de Bacillus thuringiensis dans le sol forestier suite aux pulvérisations aériennes contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec, en 1984*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 40p.
- CARLSON, C.R., D.A. CAUGANT et A.-B. KOLSTØ. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1719-1725.
- CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). 2001. *Epidemic/epizootic West Nile virus in the United States: revised guidelines for surveillance, prevention and control*. Gouvernement des États-Unis. 111p. [En ligne] www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/ressources/wnv-guidelines-apr-2001.pdf
- CHIPLEY, J.R. 1983. Sodium benzoate and benzoic acid. Dans: Branen, A.L. et P.M. Davidson (éditeurs), *Antimicrobials in foods*, Marcel Dekker Inc. pp.11-36
- COHEN, E., H. ROZEN, T. JOSEPH, S. BRAUN et L. MARGULIES. 1991. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* from ultraviolet irradiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 343-351.

CSE (COMITÉ DE SANTÉ ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC). 1995. *Avis de santé publique sur l'utilisation du pesticide biologique Bacillus thuringiensis en milieu forestier agricole et urbain*. Avis préparé à l'intention du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec. 10p.

DAMGAARD, P.H. 1995. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12: 245-250.

DAMGAARD, P.H., P.E. GRANUM, J. BRESCIANI, M.V. TORREGROSSA, J. EILENBERG et L. VALENTINO. 1997. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 18: 47-53.

DAMGAARD, P.H., H.D. LARSEN, B.M. HANSEN, J. BRESCIANI et K. JORGENSEN. 1996. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Letters in Applied Microbiology*, 23: 146-150.

de AMORIN, G.V., B. WHITTOME, B. SHORE et D.B. LEVIN. 2001. Identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1-like bacteria from environmental and human samples after aerial spraying of Victoria, British Columbia, Canada, with Foray 48B. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1035-1043.

de BARJAC, H., I. LARGET, L. BÉNICHOU, V. COSMAO, G. VIVIANI, H. RIPOUTEAU et S. PAPION. 1980. *Test d'innocuité sur les mammifères avec du sérotype H14 de Bacillus thuringiensis*. Organisation mondiale de la santé, Genève (document WHO/VBC/80.761).

DELISLE, S., G. PARENT et R. DOSTIE. 1986. *Surveillance des prises d'eau potable réalisée dans le cadre du suivi environnemental des pulvérisations aériennes d'insecticides contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec, en 1986*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 20p.

DELISLE, S., R. DOSTIE et L. BÉGIN. 1991. *Persistance du Dipel 132 dans le sol forestier*. Ministère des Forêts, gouvernement du Québec. 8p.

DIONNE, M., D. BOUDREAULT, G. DELAGE, A. NANTEL et D.G. BOLDUC. 1995. *Avis de santé publique sur l'utilisation du pesticide biologique Bacillus thuringiensis en milieu forestier, agricole et urbain*. Comité de santé environnementale du Québec. 10 p.

DOSTIE, R., S. DELISLE et P.-M. MAROTTE. 1988a. *Distribution des spores de Bacillus thuringiensis en eau courante*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 15p.

DOSTIE, R., S. DELISLE et P.-M. MAROTTE. 1988b. *Persistance des spores de Bacillus thuringiensis en eau courante à la suite de pulvérisations contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec, en 1985*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 12p.

DOSTIE, R., S. DELISLE et P.-M. MAROTTE. 1989. Persistance des spores de *Bacillus thuringiensis* en milieu aquatique. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 26p.

DOSTIE, R., G. PARENT, S. DELISLE et P.-M. MAROTTE. 1986. *Comportement du Bacillus thuringiensis en milieu lotique à l'extérieur des aires traitées*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 43p.

DOUCET-LEDUC, H. 1991. *La contamination des aliments*. Modulo Éditeur, Québec. 248p.

DROBNIEWSKI, F.A. 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6: 324-338.

DROBNIEWSKI, F.A. 1994. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 101-109.

DUGAL, J. 1988. *Concentrations d'insecticides biologiques dans l'air de certaines municipalités à la suite des pulvérisations aériennes contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette en 1987*. Direction de la conservation, ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 22p.

DUGAL, J. et L. MAJOR. 1987. *Résidus d'insecticides dans l'air de certaines municipalités suite aux pulvérisations aériennes contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette en 1986*. Direction de la conservation, ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 22p.

DUGAL, J., L. MAJOR, P. CARDINAL et S. DELISLE. 1985. *Étude de la persistance des insecticides biologiques dans les eaux naturelles en milieu forestier*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 29p.

DUGAL, J., L. MAJOR et G. ROUSSEAU. 1986. *Concentrations d'insecticides biologiques dans l'air à l'intérieur des aires traitées*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 19p.

DULMAGE, H.T. et K. AIZAWA. 1982. *Distribution of Bacillus thuringiensis in nature*. Dans: Kurstak, E. (éditeur), *Microbial and viral pesticides*, pp. 209-237.

DUPONT, C. et J. BOISVERT. 1986. Persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxic activity in the environment and interaction with natural substrates. *Water, Air, and Soil Pollution*, 29: 425-438.

ELLIOTT, L.J., R. SOKOLOW, M. HEUMANN et S.L. ELEFANT. 1988. An exposure characterization of a large scale application of a biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Applied Industrial Hygiene*, 3: 119-122.

ELLIS, R. 2001. *Municipal Mosquito Control Guidelines*. Prairie Pest Management. Document préparé pour Santé Canada. Version April 2001. 54p.

EPA (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1991. *Reregistration eligibility document: isopropyl (2E, 4E)-11-methoxy-3,7,11-trimethyl-2,4-dodecadienoate (referred to as methoprene)*. List A Case No. 0030, 40p.

EXTOXNET (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK). 1996. *Pesticide information profiles: methoprene*. [En ligne] <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/methoprene.htm> /(Page consultée le 16 novembre 2001)

EXTOXNET (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK). 2001. *Pesticide information profiles : methoprene*. [En ligne] <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/haloxfop-methylparathion/methoprene-ext.html> /(Page consultée le 16 novembre 2001)

FISHER, R. et L. ROSNER. 1959. Toxicology of the microbial insecticide Thuricide. *Agricultural and Food Chemistry*, 7: 686-688.

FORSBERG, R.L., S.C. HENDERSON, E. HENRY et J.R. ROBERTS. 1976. *Bacillus thuringiensis: its effects on environmental quality*. Conseil national de recherche du Canada. 134p.

GREEN, M., M. HEUMANN, R. SOKOLOV, L.R. FOSTER, R. BRYANT et M. SKEELS. 1990. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-86. *American Journal of Public Health*, 80: 848-852.

HADLEY, W.M., S.W. BURCHIEL, T.D. MCDOWELL, J.P. THILSTED, C.M. HIBBS, J.A. WHORTON, P.W. DAY, M.B. FRIEDMAN et R.E. STOLL. 1987. Five-month oral (diet) toxicity-infectivity study of *Bacillus thuringiensis* insecticides in sheep. *Fundamental and Applied Toxicology*, 8: 236-242.

HEITLAND, G.W. (Ed.). 2001. *Tomes® system, Meditext® Medical management*. Micromedex, Englewood, Colorado (Delivery method CD-ROM).

HELGASON, E., O.A. ØKSTAD, D.A. CAUGANT, H.A. JOHANSEN, A. FOUET, M. MOCK, I. HEGNA et A.-B. KOLSTØ. 2000a. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2627-2630.

HELGASON, E., D.A. CAUGANT, I. OLSEN et A.-B. KOLSTØ. 2000b. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1615-1622.

HERNANDEZ, E., F. RAMISSE, J.-P. DUCOUREAU, T. CRUEL et J.-D. CAVALLO. 1998. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2138-2139.

HERNANDEZ, E., F. RAMISSE, T. CRUEL, R. LE VAGUERESSE et J.-D. CAVALLLO. 1999. *Bacillus thuringiensis* serotype H34 isolated from human and insecticidal strains serotypes 3a3b and H14 can lead to death of immunocompetent mice after pulmonary infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 24: 43-47.

HERNANDEZ, E., F. RAMISSE, P. GROS et J.-D. CAVALLLO. 2000. Super-infection by *Bacillus thuringiensis* H34 or 3a3b can lead to death in mice infected with the influenza A virus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 29: 177-181.

IRIARTE, J., Y. BEL, M.D. FERRANDIS, R. ANDREW, J. MURILLO, J. FERRÉ et P. CABALLERO. 1998. Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 97-106.

JACKSON, S.G., R.B. GOODBRAND, R. AHMED et S. KASATIYA. 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Applied Microbiology*, 21: 103-105.

JOUNG, K.-B. et J.-C. CÔTÉ. 2000. *Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien Bacillus thuringiensis*. Centre de recherche et de développement en horticulture (St-Jean-sur-Richelieu, Québec). Agriculture et Agroalimentaire Canada. 17p. Accessible à: <http://res2.agr.ca/stjean/crdh.htm>.

LA CLAIR, J.J., J.A. BANTHE et J. DUMONT. 1998. Photoproducts and metabolites of a common insect growth regulator produce developmental deformities in *Xenopus*. *Environmental Science and Technology*, 32: 1453-1461.

LACOURSIÈRE, J.O. et J. BOISVERT. 1994. *Le Bacillus thuringiensis israelensis et le contrôle des insectes piqueurs au Québec*. Laboratoire de recherche sur les arthropodes piqueurs, Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières. 74p.

LAFERRIÈRE, M. et A. BASTILLE. 1987. Étude immunologique impliquant les composantes de l'insecticide biologique *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Département de Santé Communautaire Grand-Portage. 21p.

LESSARD, S., D.G. BOLDUC, D. BOUDREAULT et R.LARUE. 1996. *L'insecticide Bacillus thuringiensis et la santé publique*. Document de support à l'avis de santé publique. Comité de santé environnementale du Québec, Conseil des directeurs de santé publique du Québec. 70p.

LETARTE, R. 1985. *Suivi médical chez des populations mises en contact de Bacillus thuringiensis lors d'arrosages aériens dans la péninsule gaspésienne (1985)*. Syndicat des Producteurs de bois du Bas-Saint-Laurent, Service canadien des forêts, Université Laval. 82p.

LORANGE, M. 2001. Surveillance des infections à *Bacillus thuringiensis*. Laboratoire de santé publique du Québec, Gouvernement du Québec. 5p.

- LÜTHY, P. et H.R. EBERSOLD. 1981. The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Pharmaceutical Therapy*, 13: 257-283.
- MAIRE, A. et A. AUBIN. 1980. Les moustiques du Québec (*Diptera: culicidae*). *Mémoires de la Société Entomologique du Québec*. 107p.
- MAJOR, L. G. ROUSSEAU et P. CARDINAL. 1986. *Concentrations d'insecticides biologiques dans l'air de sept municipalités situées au voisinage des aires traitées*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 33p.
- MAJOR, L. G. ROUSSEAU et B. LAMONTAGNE. 1985. *Concentrations d'insecticides biologiques dans l'air de deux agglomérations urbaines de la région 01*. Division Ministère de l'Énergie et des Ressources, gouvernement du Québec. 53p.
- MARTIN, P.A.W. et R.S. TRAVERS. 1989. Worldwide distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2437-2442.
- McCLINTOCK, J.T., C.R. SCHAFFER et R.D. SJOBLAD. 1995. A comparative study of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science*, 45: 95-105.
- MENV (MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT DU QUÉBEC). 1999. *Questions posées par le ministère de l'Environnement du Québec à l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) à propos du b.t.i. (Bacillus thuringiensis var. israelensis) et des impacts de ces traitements contre les insectes piqueurs et réponses reçues*. Service des pesticides et des eaux souterraines. 7p.
- MERCK. 1989. *The Merck index*. Merck & Co. 11th Edition. 2303p.
- MERETOJA, T., G. CARLBERG, U. GRIPENBERG, K. LINNAINNAA et M. SORSA. 1977. Mutagenicity of *Bacillus thuringiensis* exotoxin. I. mammalian tests. *Hereditas*, 85: 105-112.
- MORRIS, O.N. 1983. Protection of *Bacillus thuringiensis* from inactivation by sunlight. *The Canadian Entomologist*, 115: 1215-1227.
- NERAD, J.L., M.T. SEVILLE et D.R. SNYDMAN. 1998. Miscellaneous gram-négative bacilli: *Acinetobacter*, *Cardiobacterium*, *Actinobacillus*, *Chromobacterium*, *Capnocytophaga* and others. Dans: Gorbach, S.L., J.G. Bartlett et N.R. Blacklow (éds.) *Infectious Diseases*, W.B. Saunders Company. pp. 1871-1887.
- NOBLE, M.A., P.D. RIBEN et G.J. COOK. 1992. *Microbiological and epidemiological surveillance programme to monitor the health effects of Foray 48B BTK spray*. Department of Pathology, Department of Health Care and Epidemiology, University of British-Columbia, University Hospital (Vancouver), pagination multiple.

NPTN (National Pesticide Telecommunications Network). 1999. *Chlorpyrifos (General Fact Sheet)*. Document préparé pour U.S. Environmental Protection Agency. United States. 4p.

OHANA, B., J. MARGALIT et Z. BARAK. 1987. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* under simulated field conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 828-831.

OTVOS, I.M. et S. VANDERVEEN. 1993. *Environmental report and current status of Bacillus thuringiensis var. kurstaki use for control of forest and agriculture insect pests*. Forêts Canada. 81p.

PARENT, G. et L. BÉGIN. 1994. *Quantité de Bacillus thuringiensis var. kurstaki dans le sol forestier, après deux applications effectuées en 1989*. Ministère des Forêts, gouvernement du Québec.

PEDERSEN, J.C., P.H. DAMGAARD, J. EILENBERG et B.M. HANSEN. 1995. Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in an experimental cabbage field. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 118-125.

PENN, C.C. et S.A. KLOTZ. 1998. *Bacillus anthracis* and other aerobic spore formers. Dans: Gorbach, S.L., J.G. Bartlett et N.R. Blacklow (éds.) *Infectious Diseases*, W.B. Saunders Company. pp. 1747-1750.

PERANI, M., A.H. BISHOP et A. VAID. 1998. Prevalence of β -exotoxin, diarrhoeal toxin and specific δ -endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 160: 55-60.

PETRAS, S.F. et L.E. CASIDA Jr. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(6):1496-1501.

PINNOCK, D.E., R.J. BRAND et J.E. MILSTEAD. 1971. The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. *Journal of Invertebrate Pathology*, 18: 405-411.

PUSZTAI, M., P. FAST, L. GRINGORTEN, H. KAPLAN, T. LESSARD et P.R. CAREY. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochemistry Journal*, 273: 43-47.

RAPPOLE, J.H., S.R. DERRICKSON et Z. HUBALEK. 2000. Migratory birds and spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Emerging Infectious Diseases*, 6: 319-328.

REARDON, R.C. et K. HAISING. 1984. Efficacy and field persistence of *Bacillus thuringiensis* after ground application to Balsam fir and White spruce in Wisconsin. *The Canadian Entomologist*, 116: 153-158.

RTECS® (REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES). 2001. National Institute for Occupational safety and Health, Cincinnati (Delivery Method CD-ROM), Micromedex, Englewood, Colorado.

- RUSUL, G. et N.H. YAACOB. 1995. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. *International Journal of Food Microbiology*, 25: 131-139.
- SALAMITOU, S., F. RAMISSE, M. BREHELIN, D. BOURGUET, N. GILOIS, M. GOMINET, E. HERNANDEZ et D. LERECLUS. 2000. The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology*, 146: 2825-2832.
- SALEH, S.M., R.F. HARRIS et O.N. ALLEN. 1970a. Recovery of *Bacillus thuringiensis* var, *thuringiensis* from field soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15: 55-59.
- SALEH, S.M., R.F. HARRIS et O.N. ALLEN. 1970b. Fate of *B. thuringiensis* in soil: effect of soil pH and organic amendement. *Canadian Journal of Microbiology*, 16: 677-680.
- SAMPLES, J.R. et H. BUETTNER. 1983. Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*). *American Journal of Ophtalmology*, 95: 258-260.
- SAMUEL, O. et L. ST-LAURENT. 2000. *Avis concernant le choix d'un adulticide pour le contrôle des insectes afin de contrer la transmission du virus du Nil occidental au Québec*. Centre d'expertise en toxicologie humaine, Institut national de santé publique du Québec. 30p.
- SANTÉ Canada. 1996. *Dictionnaire de poche sur les additifs alimentaires*. Ministère de la Santé, Gouvernement du Canada. 35p.
- SELIGY, V.L., R.W. BEGGS, J.M. RANCOURT et A.F. TAYABALI. 1997. Quantitative bio-reduction assays for calibrating spore content and viability of commercial *Bacillus thuringiensis* insecticides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18: 370-378.
- SIEGEL, J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 13-21.
- SIEGEL, J.P. et J.A. SHADDUCK. 1990a. Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis israelensis*. dans De Barjac, H. et D.J. Sutherland (Eds), *Bacterial Control of Mosquitos & Black Flies*. Rutgers University Press, New-Brunswick. pp. 202-217.
- SIEGEL, J.P. et J.A. SHADDUCK. 1990b. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mammals. *Journal of Economic Entomology*, 83: 347-355.
- SIEGEL, J.P., J.A. SHADDUCK et J. SZABO. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. *Journal of Economic Entomology*, 80: 717-723.
- SMITH, R.A. et J.W. BARRY. 1998. Environmental persistence of *Bacillus thuringiensis* spores following aerial application. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 263-267.

SNYDMAN, D.R. 1998. *Food poisoning*. Dans: Gorbach, S.L., J.G. Bartlett et N.R. Blacklow (éds.) *Infectious Diseases*, W.B. Saunders Company. pp. 768-781.

SOM, N.C., B.B. GHOSH et M.K. MAJUMDAR. 1986. Effect of *Bacillus thuringiensis* and insect pathogen *Pseudomonas aeruginosa* on mammalian gastrointestinal tract. *Indian Journal of Experimental Biology*, 24: 102-107.

SOPFIM et SNC-LAVALIN. 1992. *Étude d'impact sur le Programme quinquenal (1993-1997) de pulvérisations aériennes d'insecticides pour lutter contre certains insectes forestiers. Tome 1: tordeuse des bourgeons de l'épinette*. Société de protection des forêts contre les insectes et les maladies, pagination multiple.

SURGEONER, G.A. et M.J. FARKAS. 1990. *Review of Bacillus thuringiensis var. kurstaki (Btk) for use in forest pest management programs in Ontario with special emphasis on the aquatic environment*. Department of Environmental Biology, University of Guelph, Ontario. 86p.

TAYABALI, A.F. et V.L. SELIGY. 2000. Human cell exposure assays of *Bacillus thuringiensis* commercial insecticides: production of *Bacillus cereus*-like cytolytic effects from outgrowth of spores. *Environmental Health Perspectives*, 108: 919-930.

TESCHKE, K., Y. CHOW, K. BARTLETT, A. ROSS et C. van NETTEN. 2001. Spatial and temporal distribution of airborne *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* during an aerial spray program for gypsy moth eradication. *Environmental Health Perspectives*, 109: 47-54.

THOMAS, W.E. et D.J. ELLAR. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cell Science*, 60: 181-197.

TOMLIN, C.D.S. (Ed). 1997. *The pesticide manual, a world compendium*, 11th edition. The British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, Grande-Bretagne, pp. 817-819.

van NETTEN, C., K. TESCHKE, V. LEUNG, Y. CHOW et K. BARTLETT. 2000. The measurement of volatile constituents in Foray 48B, an insecticide prepared from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *The Science of the Total Environment*, 263: 155-160.

WARREN, R.E., D. RUBENSTEIN, D.J. ELLAR, J.M. KRAMER et R.J. GILBERT. 1984. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: protoxin activation and safety. *The Lancet*, March 24: 678-679.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 1981. Mammalian safety of microbial agents for vector control: a WHO memorandum. *Bulletin of World Health Organization*, 59: 857-863.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 1999. *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Health Criteria* 217, International Programme on Chemical Safety. 105p.