Les Biopesticides : une recherche fondamentale vers une valorisation industrielle

Mireille Kallassy Awad

Professeur associé

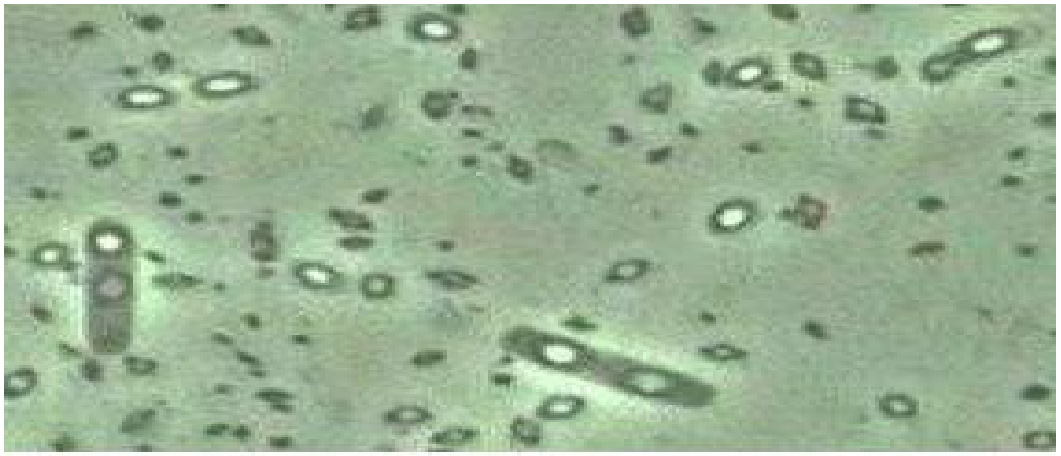
Faculté des sciences

Université Saint- Joseph

Le 8 février 2012

La bactérie ***Bacillus thuringiensis***

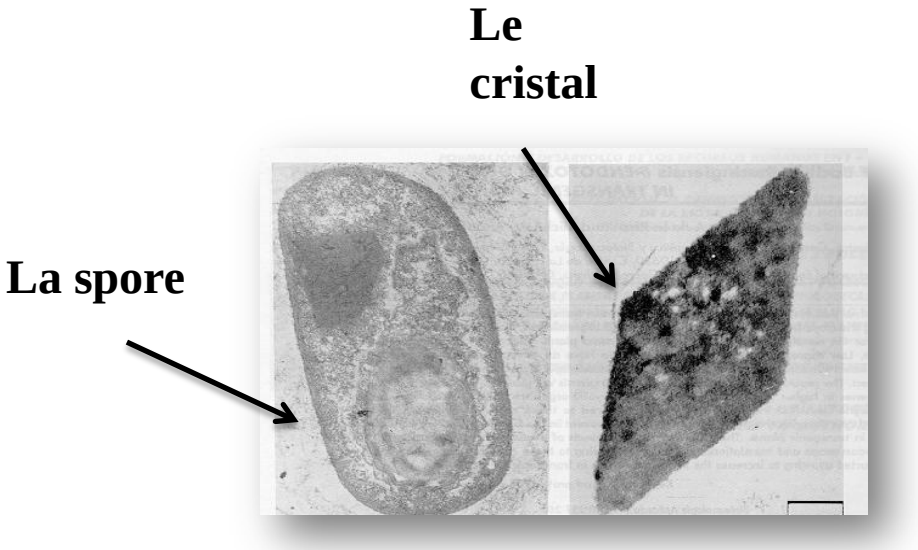
- Bactérie GRAM +
- Sporulante
- Isolée du sol, des insectes, de la poussière...
- Phase stationnaire du cycle de croissance → formation d'une inclusion cristalline- delta endotoxines ou toxines Cry

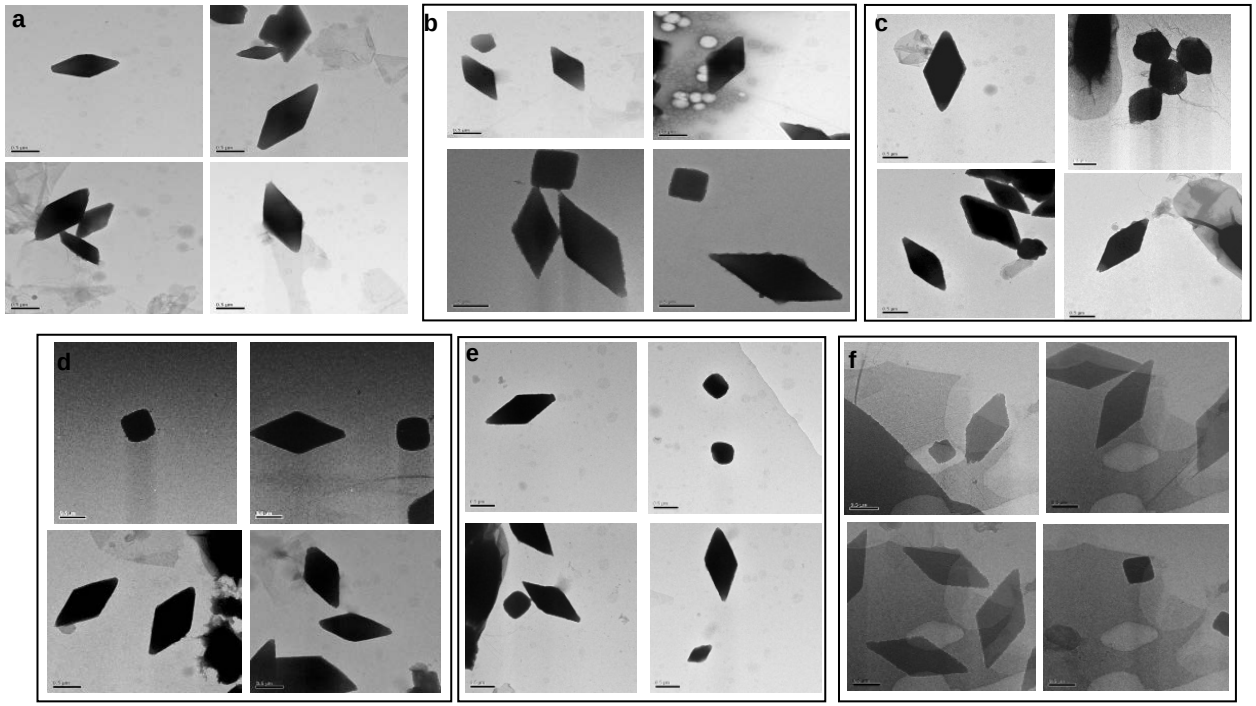


Bacillus thuringiensis vu au microscope contraste de phase.

L’inclusion cristalline

- Responsable de la toxicité des insectes
- Ce sont des protoxines actives contre un ordre et un groupe bien particulier d’insectes: diptères, lépidoptères, coléoptères et autres
- Une inclusion cristalline d’une souche quelconque: plusieurs protéines *Cry*
- Codées par les gènes *cry* localisés sur des plasmides conjugatifs





Photos showing the protein inclusions of Bt viewed by electronic microscopy of the folling strains ; a :HD1, b :Lip, c :B255, d :D6, e : D28, f: D33.

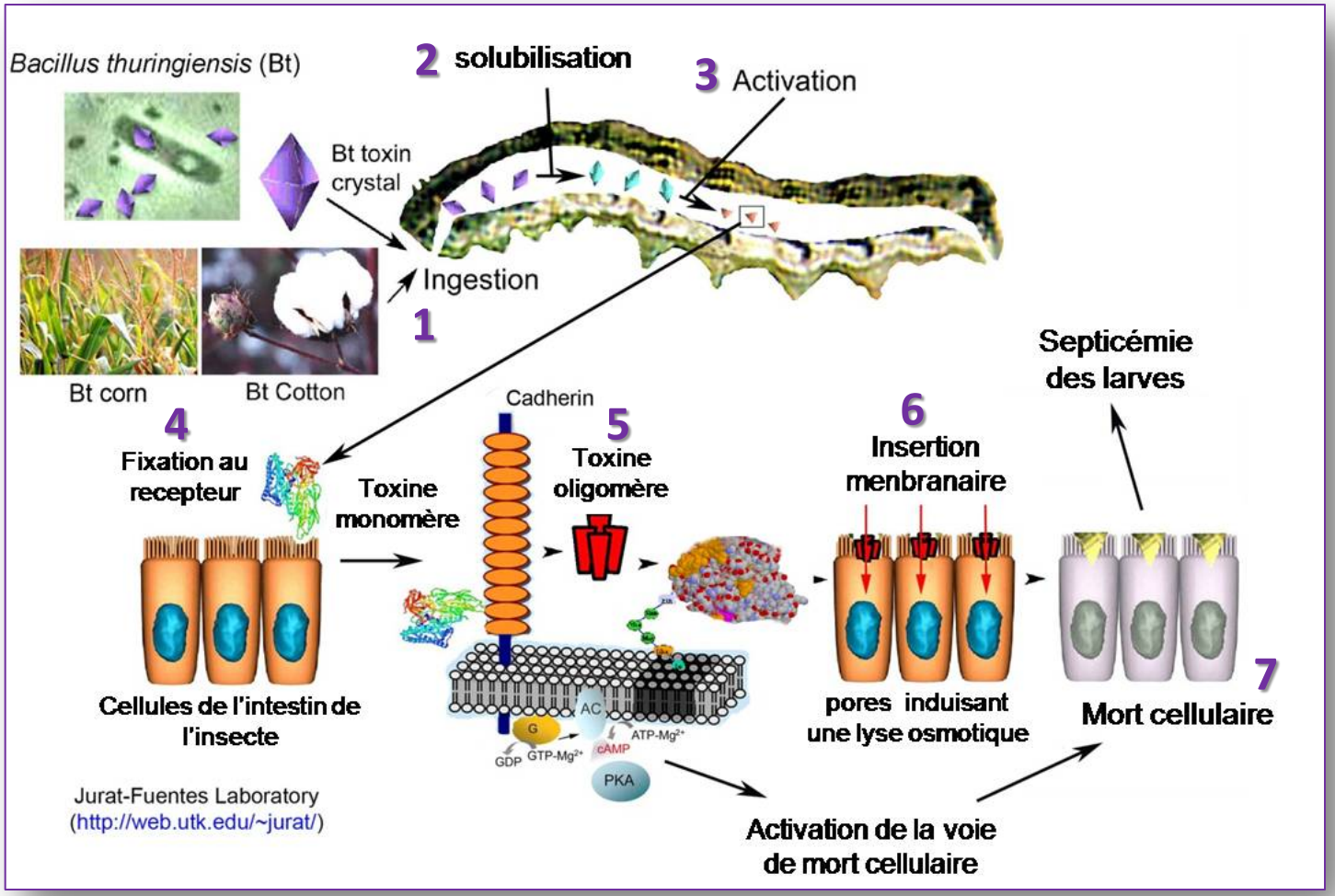
Microscopie électronique à transmission des cristaux des souches de *Bacillus thuringiensis* isolées du sol libanais

Les familles des gènes *cry*

Classes	cry genes	Crystalline inclusion	Insecticidal Activity	Bt Reference species
cry 1	A (Aa, Ab, Ac) B C D E F G I	Bipyramidal	Lepidopteran	*kurstaki* *aizawa*
cry 2	A B C	Cubique	Lepidopteran and dipteran	*kurstaki*
cry 3	A B	Irrégulière	Coleopteran	*tenebrionis*
cry 4	A B C D	Irrégulière	Dipteran	*israelensis*
cry 5- *cry 6*			Nematode	*jordanica*

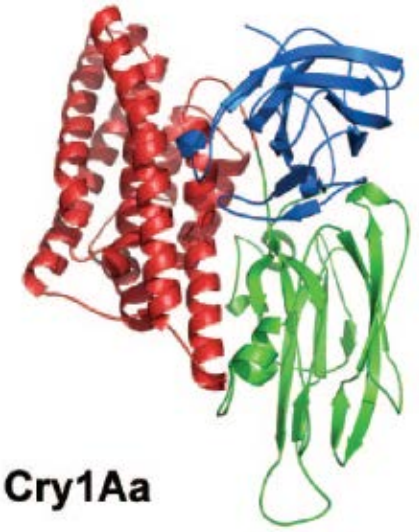
The largest
encoding 130-138 KDa

Mécanisme d'action des protéines de la famille des Cry1 chez les Lépidoptères



Structure des protéines *Cry1*

- **3 domaines:**
  - Domaine I :
    - » 6 hélices α + 1 hélice α centrale
    - » Responsable de la formation du pore membr
    - » résidus chargés négativement 33….. 253
  - Domaine II:
    - » 3 feuillets β antiparallèles
    - » résidus chargés positivement 265…461
  - Domaine III:
    - » 2 feuillets β antiparallèles
    - » résidus chargés positivement 463 … 609



Craig R. Pigott and David J. Ellar Rôle of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activité: MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, June 2007, p. 255–281

– Régions exposées des domaines II et III ⟹ fixation au récepteur et insertion dans la membrane

- Présence de boucles entre ces différents domaine

- B.t. a été enregistré aux Etats-Unis pour une utilisation comme pesticide en 1961 et réenregistré en 1998*

Utilisation en agriculture biologique

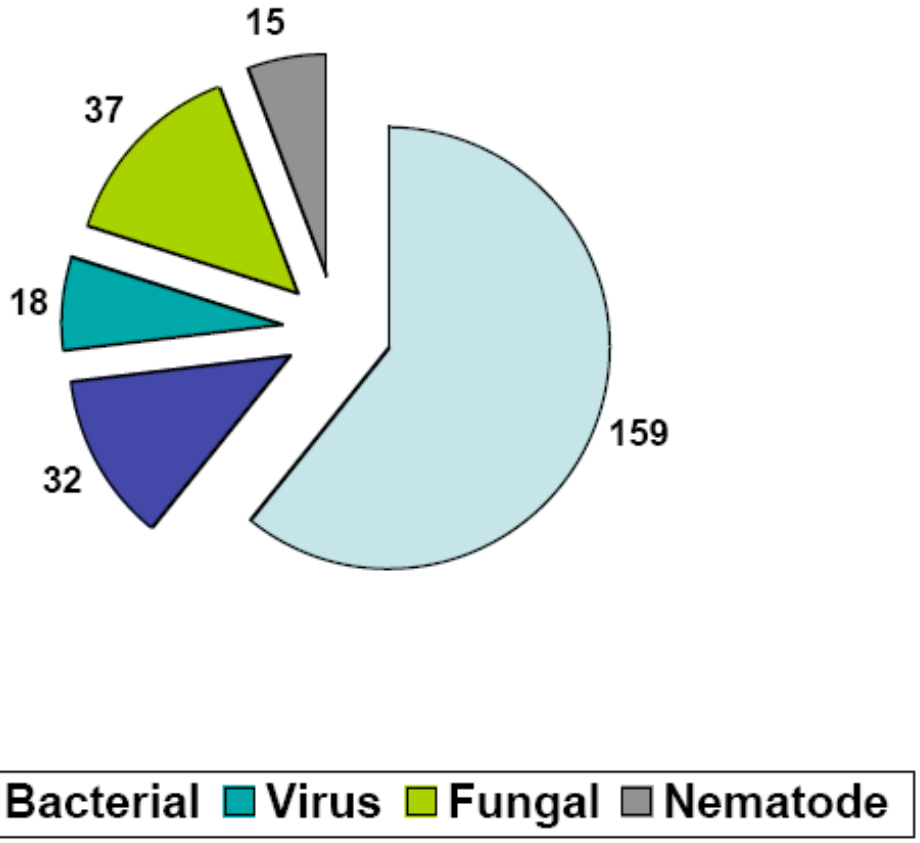
- ❖ Pesticides chimiques sont dangereux.
- ❖ Bt est une alternative et est sélectif

120 souches différentes sont isolées du sol libanais

* Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. R.; Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Molecular Biol*. **1998,** *62*, 775-806.

Global Biopesticide Market

$260MM estimated 2005 Sales
Projected to grow to $350–$400MM by 2015



Source: CPL Business Consultants, July 2006

Toxicité de *B. thuringiensis*

* Il est pratiquement non toxique pour les oiseaux et les poissons.
* Une toxicité très minimale aux abeilles (Il faut suivre les consignes d'application)
* A été testé sur les animaux et les hommes (par ingestion et inhalation).

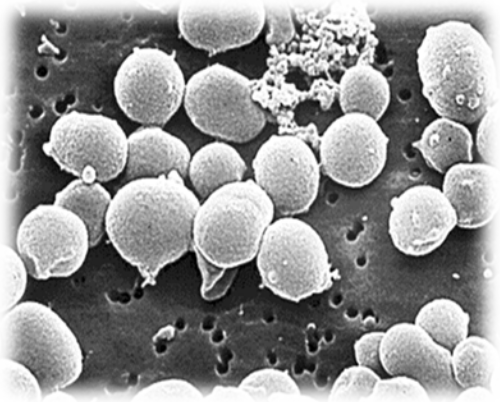
Que devient *Bacillus thuringiensis* dans l'environnement?

* Sur les surfaces végétales les produits de B.t. se dégradent rapidement (1).
* B.t. est modérément persistant dans le sol et ses toxines se dégradent rapidement (2, 3).
* B.t. n'est pas originaire de l'eau et n'est pas susceptible de se multiplier dans l'eau (3).

1. *Reregistration Eligibility Decision Document: Bacillus thuringiensis*; EPA-738-R-98-004; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, March 1998.
2. Kamrin, M. A. *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*; CRC: Boca Raton, FL, 1997; pp 535-539.
3. World Health Organization. *Bacillus thurinigiensis*, Environmental Health Criteria, 217. Geneva, Switzerland, 1999.

Indépendamment des delta-endotoxines, *B. thuringiensis* produit des métabolites extracellulaires :

• VIP (Vegetative Insecticidal Proteins)

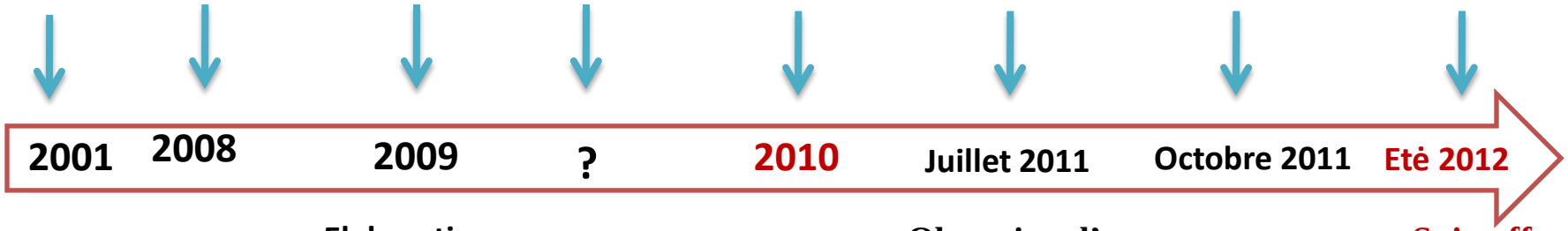


•Les bactériocines

•Les β-lactamases

•Les chitinases

Historique



Juin 2001
Début du projet

Thèses soutenues
- **en 2008**
- **en 2009**

Elaboration
de différentes collaborations
120 souches isolées

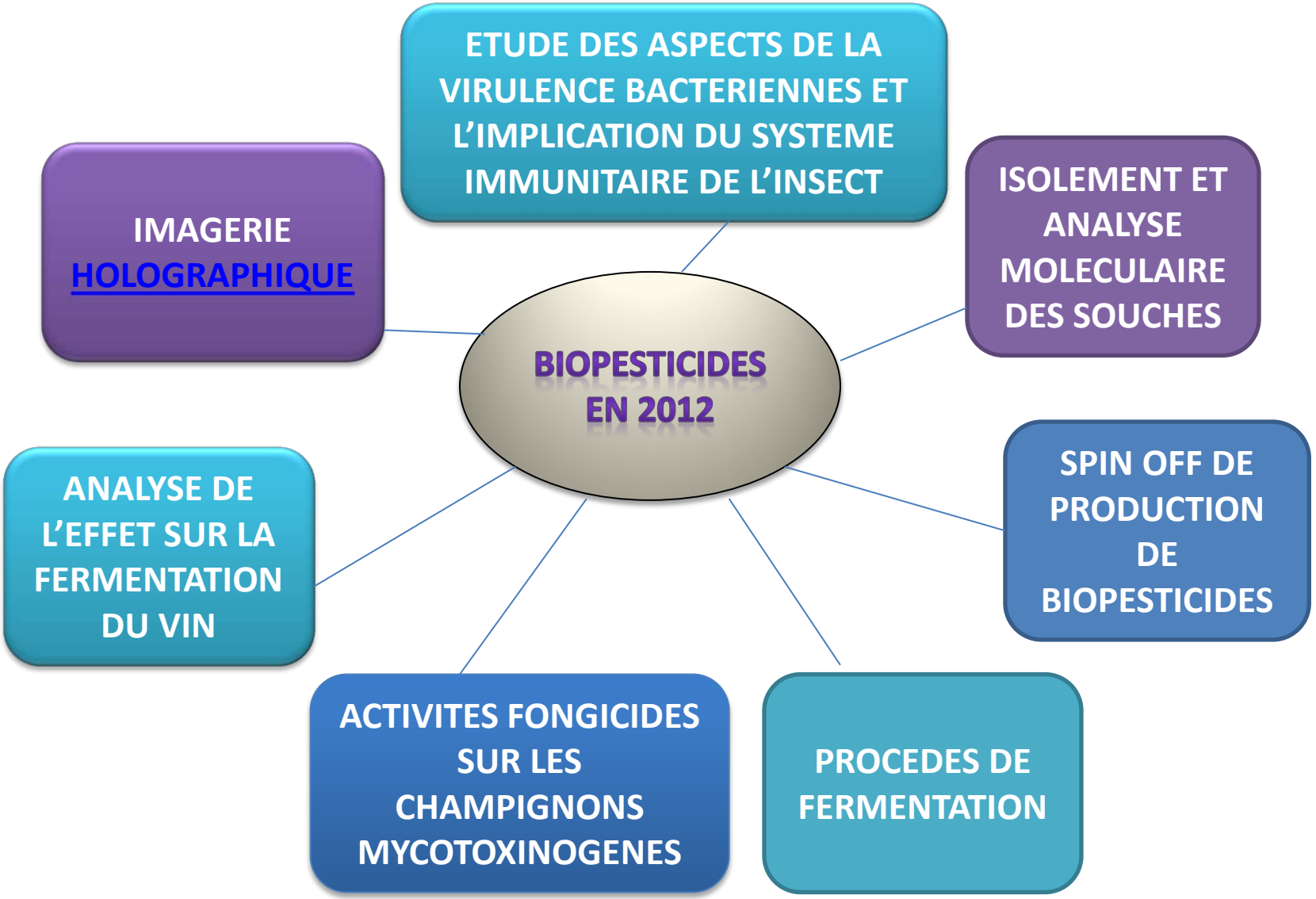
Obtention d'un financement

Spin off opérationnel

Actuellement
- **2 thèses en cours**
- **Début de la construction des grands fermenteurs**

Un concours de circonstances:
- **Création de la chaire d'innovation**
- **Soutien du conseil de la recherche**
- **Signature de l'accord cadre avec *aec***
- **Politique de la faculté**
- **Politique de l'université**
- **Partenariat avec *aec***
- **Collègues qui ont joué un rôle important**

Situation actuelle de la recherche sur les BIOPESTICIDES



Situation actuelle des BIOPESTICIDES à l'échelle industrielle

Cibles testées de la souche Lip

Helicoverpa armigera
Pyrale des choux

Thaumetopoea pityocampa
Processionnaire du pin

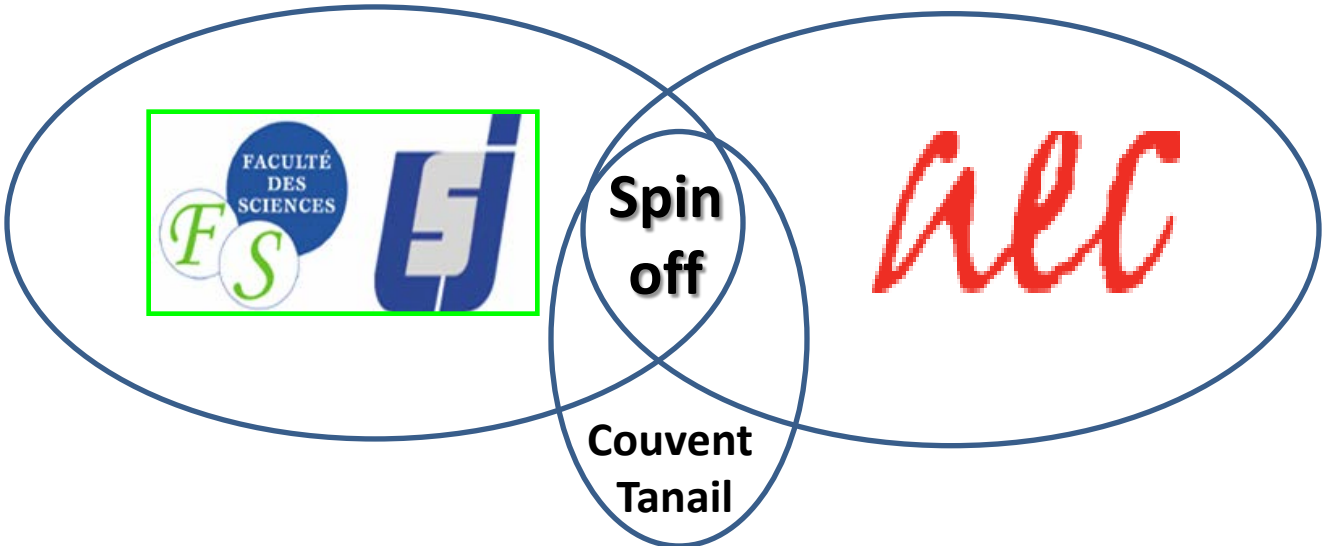
Prays Olea
Teigne de l'olivier

Ephestia kuehniella
Teigne de la farine

« Des biopesticides pour une alimentation plus saine au Liban » (juin 2011-décembre 2014)

Le projet comporte deux objectifs majeurs:

- le développement d'une production libanaise de biopesticides, en vue d'éviter l'importation et de réduire les coûts de ces produits ;
- la diffusion de l'utilisation des biopesticides dans les communautés d'agriculteurs au Liban.



Organisation

Spin off

* Construction et mise en place
* Optimisation de la production
* Production

Production
aec **+ USJ + Deir Tanail**

* Marketing du produit final
*Enregistrement
* Autorisation

Marketing
aec

Recherche et développement USJ+*aec*

USJ
* Recherche de souches
* Caractérisation moléculaire
* Tests et Recherche sur le fermenteur de 5 Litres
* Préparation des précultures pour inoculer les grands fermenteurs

aec
* Essais sur le terrain
* Sensibilisation des agriculteurs

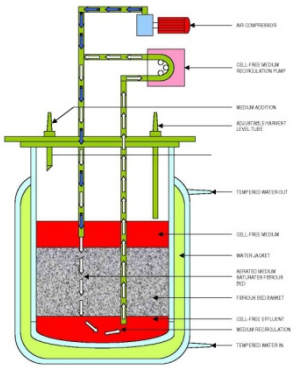
Culture de *B. thuringiensis* vers le scale up

LB: 3ml
T°: 30 °C
Une nuit

LB: 200µl/200ml
T: 37 °C
5-6 h

DO à 600nm

V = 0.05* V milieu simple/DO



Fermenteur de 5 Litres

Milieu complet:
3 litres
T: 30 °C, une nuit
Sous agitation

Fermenteur de 100
Litres, 1 nuit, 30 °C

Fermenteur de 1000
Litres, 3 Jours, 30°C

Photos du fermenteur de 5L

Photos des sessions de sensibilisation données par *aec* aux agriculteurs

Akkar

Kfarmabrakh

Marjehyoun

Remerciements

Les collègues de l'USJ

- *M. Georges Aoun*
- *M. Joseph Mezher*
- *M. Toufic Rizk*
- *M. Dominique Salameh*
- *M. Nicolas Louka*
- *Les collègues de la FS*

L'équipe de aec

- *M. Pierre Issa*
- *M. Fady Moujaes*
- *Loubna, Olivia, Abdo, Roland….*

Conseil de la recherche de l'USJ

Collaborateurs

-Collaborateurs en France

-INRA La minière: Unité Génétique Microbienne et Environnement:

- Christina Nielsen Leroux
- Didier Lereclus
- Vincent Sanchis

-Laboratoire Ecologie Microbienne des Insectes et interactions hôte-Pathogène, Montpellier 2

- Alain Givaudan
- Sophie Gaudriault

-L'Institut Charles Gerhardt Montpellier UMR 5253

- Joel Chopineau

-L'Institut Polytechnique de Toulouse

- Pierre Streihanno
- Cedric Brandam

-Collaborateurs en Tunisie

Centre de Biotechnologie de Sfax

ERI de Biotecnología y Biomedicina

Departamento de Genética, Fac. CC. Biológicas

- Slim Tounsi
- Samir Jaoua
- Souad Rouis
- Nabil Zouari

- Collaborateur en Algérie

Faculté de science à Tlemcen

-Faiza Elias

-Collaborateur en Espagne

ERI de Biotecnología y Biomedicina

Departamento de Genética, Fac. CC. Biológicas

Universitat de València

- Juan Ferre

-Collaborateur aux USA

State University of New York, at Postdam

- Fady Abdallah

Merci pour votre attention