

# Lutte contre des bactéries phytopathogènes : élaboration de nouvelles stratégies respectueuses de l'Environnement

Damien GRIZARD (PhD) (Conseil stratégique)

[damien.grizard@gene-greentk.com](mailto:damien.grizard@gene-greentk.com)



# La société

**Gene  
&  
GreenTK**



- ❖ Spin-off issue de Aix-Marseille Université
- ❖ Créée en 2013
- ❖ PME au sens communautaire
- ❖ Staff : 7



- ❖ Incubation dans l'IHU Méditerranée Infection



- ❖ Soutiens : BPI, DG, Région Sud, H2020A
- ❖ Projets : RAPID (2014), i-Lab (2015), ASTRID (2018), PIA3 (2019)
- ❖ > 20 articles, 3 brevets, 2 marques



- ❖ Intégration partielle au groupe Proxis Développement

**VesuBACT**

*Anti-virulence bactérienne et  
anti-biofilm*

**VesuTOX**

*Décontamination des agents chimiques*



# R&D

- ❖ Accès à des plateformes analytiques :
  - Séquençage/bio-informatique
  - Chromatographie, spectrométrie de masse, protéomique
  - Microscopie
  - Labos NSB2 et NSB3
  - Insectarium

❖ Network :



# INDUSTRIALISATION

- ❖ Fermenteurs de 1 L à 1,5 m<sup>3</sup>
- ❖ Centrifugeuses continues/discontinues et UF
- ❖ Lyophilisateur pilote
- ❖ Mélangeur de poudre, ensacheuse et stockage 4°C/-18°C



# L'équipe



**Conseil Scientifique**  
Prof. Eric Chabrière



**Président et Dir. Scientifique**  
Dr. David Daudé



**Conseil stratégique**  
Dr. Damien Grizard

RECHERCHE



**Dr. Laure Plener**  
Responsable laboratoire



**Dr. Pauline Jacquet**  
Chercheuse Biochimie



**Dr. Raphaël Billot**  
Chercheur Biotech

DEVELOPPEMENT



**Isabelle Te**  
Responsable Développement



**Dr. Floriane Gaucher**  
Chercheuse Microbiologie

THESES



**Mélanie Gonzales**  
Doctorante Région Sud



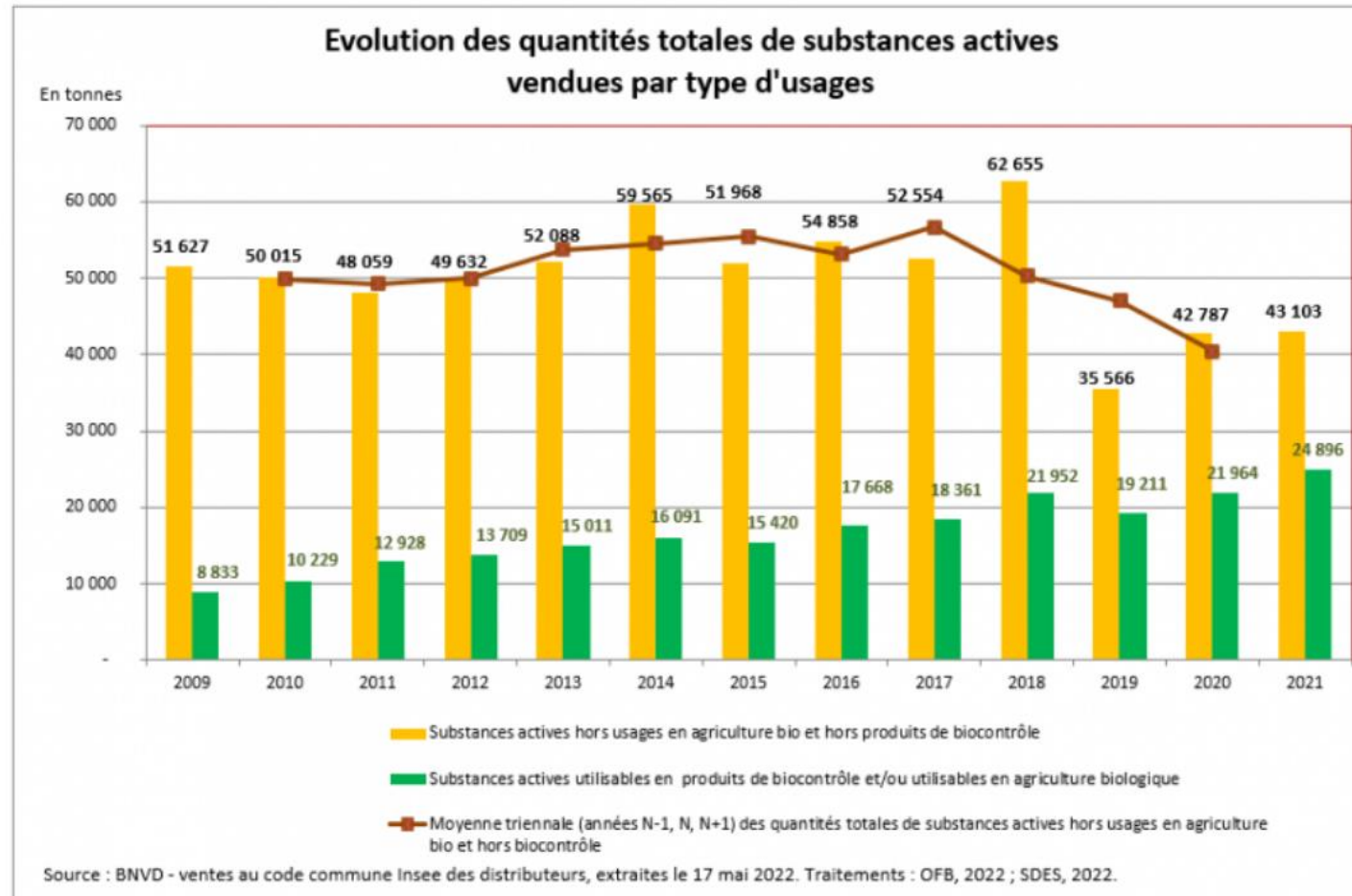
**Baptiste Kergaravat**  
Doctorant CIFRE

# Des problématiques globalisées:

- Souveraineté alimentaire
- Alternatives aux phytosanitaires
- Transition écologique



# Progression des leviers alternatifs, mais...



- ≈50 % des SA vendues utilisables en AB/biocontrôle
- **Mais**, CA biocontrôle = 274 M€ (13 % du Marché de la protection)



- Faible création de valeur vs « le conventionnel »
- Des segments peu adressés : herbicides + fongicides < 23 %
- Bcq. de commodités : 70 fongicides et 30 molluscicides respectivement à base de soufre et phosphate ferrique



**Nouvelles stratégies & ruptures technologiques**



# Nouvelles substances actives (SA) en Agriculture

Emergence de protéines & peptides recombinants

## Fertilisation & Biostimulation

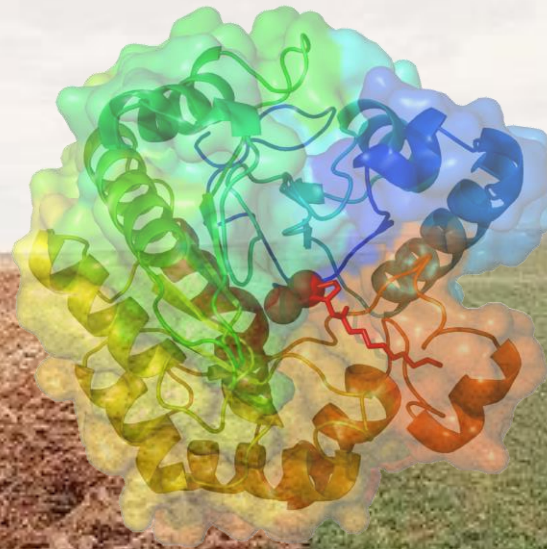
- **Plant Health Care (UK) Ltd**  
PROACT/AMM 122 091 4/Harpine  $\alpha\beta$

## Protection phytosanitaire

- **Biotalys**  
Evoca contre Botrytis et Oidium
- **Micropep**  
Résistance aux stress abiotiques/biotiques et herbicides
- **Novozymes/FMC**  
Enzymes contre la rouille du soja
- **PeptydeBio**  
Antimicrobial peptides (AMPs) contre *Botrytis cinerea*
- **Proteus by Seqens**  
Fongizyme contre *Botrytis cinerea*
- **Vestaron**  
Spear et Lepotec/insecticides

# Cas de VesuBACT

Brouillage des communications de phytopathogènes  
bactériens par une lactonase recombinante





# Innovation plébiscitée



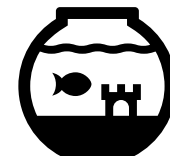
Préservation des ressources



Biodiversité



Aliments durables



Qualité de l'eau



Alternative aux pesticides  
et antibiotiques  
Moins d'antibiorésistance



Nouvelle **thèse CIFRE**  
n°2021/0683



# A l'origine, l'identification d'un besoin phytosanitaire

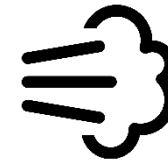
Nombre limité de solutions homologuées contre les bactérioses

Nombre limité



(cf. jambe noire = maladie orpheline)

Consommatrices de ressources non renouvelables



Traitement à la vapeur  
**Energivore**  
(5 000 L fioul/ha)

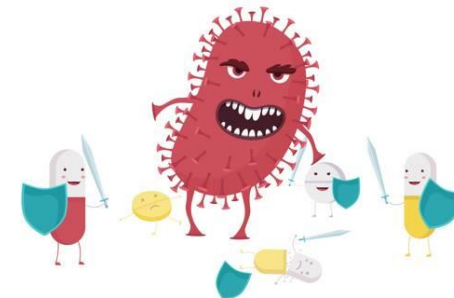
Ecocides, persistants et candidats à substitution



Cuivre



Eventuellement responsables de multi-résistante



Streptomycine et oxytétracycline aux US

# Principales bactérioses à gram négative

- ❖ Feux et chancres bactériens sur fruitiers
- ❖ Pourriture, nervation, tâche, flétrissement en cultures légumières
- ❖ Jambe noire de la pomme de terre


Dépérissement possible des arbres  
Fruits, feuilles ou racines impropres à la consommation

## Liste non exhaustive des phytopathogènes


*Acidovorax valerianellae*  
*Erwinia amylovora*  
*Dickeya dianthicola* et *D. solani*  
*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*  
*Pectobacterium atrosepticum* et *P. carotovorum*  
*Xanthomonas campestris*

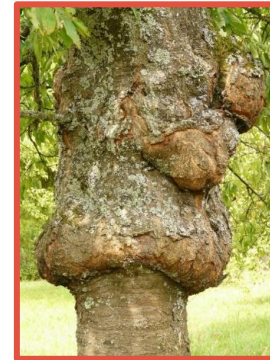
**Feu bactérien :**  
**Règlements UE 2016/2031 et 2019/2072**  
**Arrêté préfectoral du 28 06 2019 en Occitanie**



**Jambe noire**   
*P. atrosepticum*



**Feu bactérien**   
*E. amylovora*



**Chancres bactériens**   
*P. syringae*



**Pourriture molle**   
*D. dadantii*

## Regain avec :

- L'arrêt du Métam-sodium et Mancozèbe
- Potentiellement, les crises climatiques

↗ Coût de production de 30 à 40 % sur mâche  
(↗ charge opérationnelle et ↘ rotations)



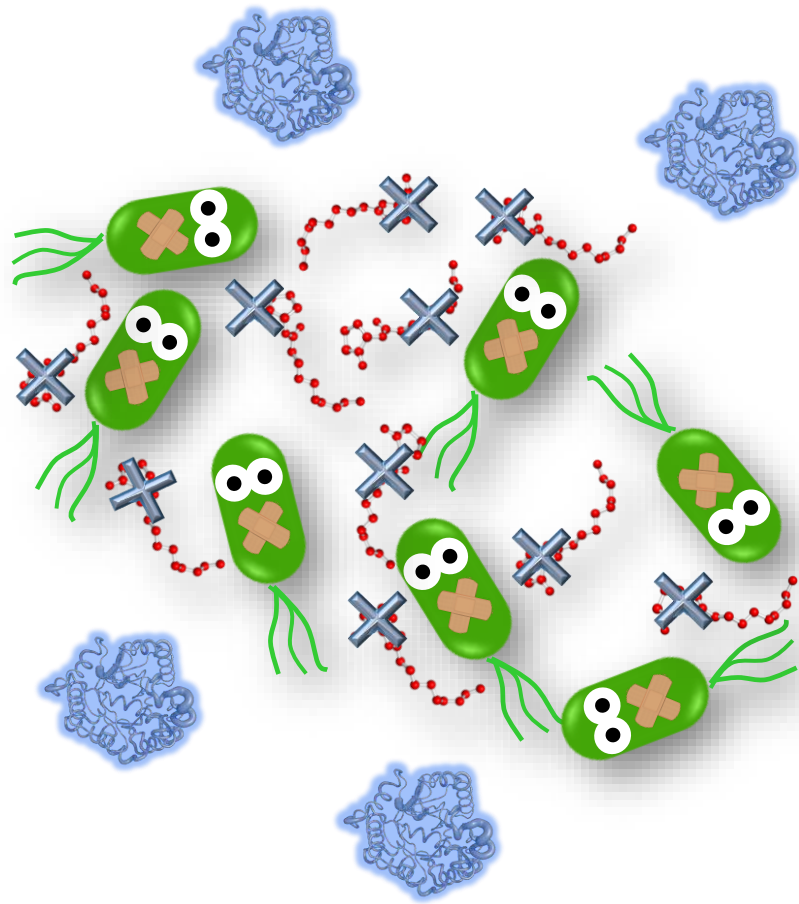
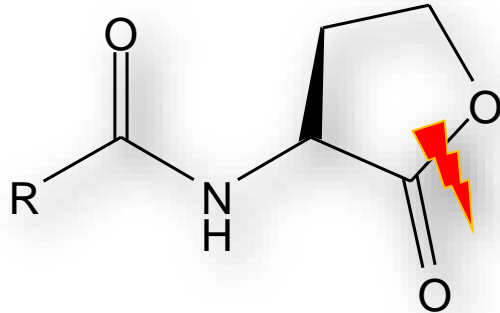
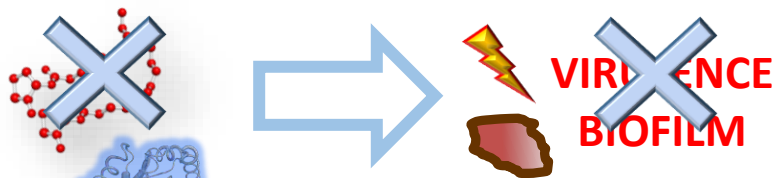


# Action préventive envisageable *via* l'activité Quorum Quenching des lactonases

Rendre les bactéries inoffensives sans les tuer

« *Killing the message  
not the messenger* »

- ∨ Pression de sélection
- ∨ Résistance



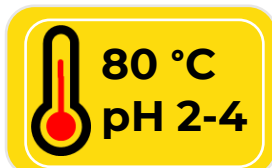
# Choix d'enzymes hyper-thermostables issues de l'archée extrêmophile *Saccharolobus solfataricus*

Résistance accrue

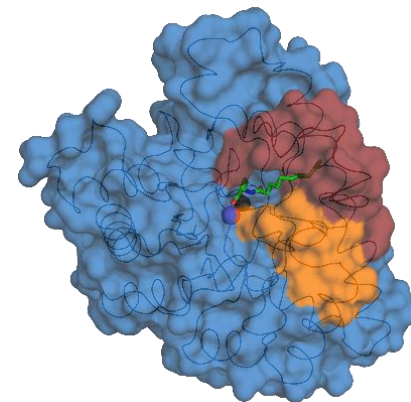
$$T_m = 106^\circ\text{C}$$

Sources chaudes du  
Vésuve

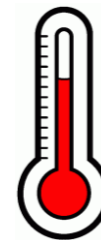
Conditions extrêmes



Archée thermophile



Compatible avec les  
contraintes industrielles  
& au champ



Température



Solvants, pH



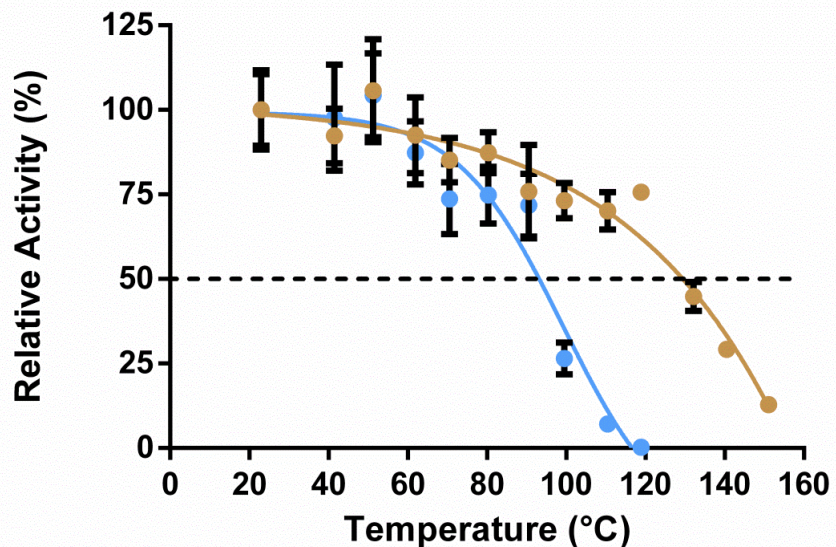
Durée de vie



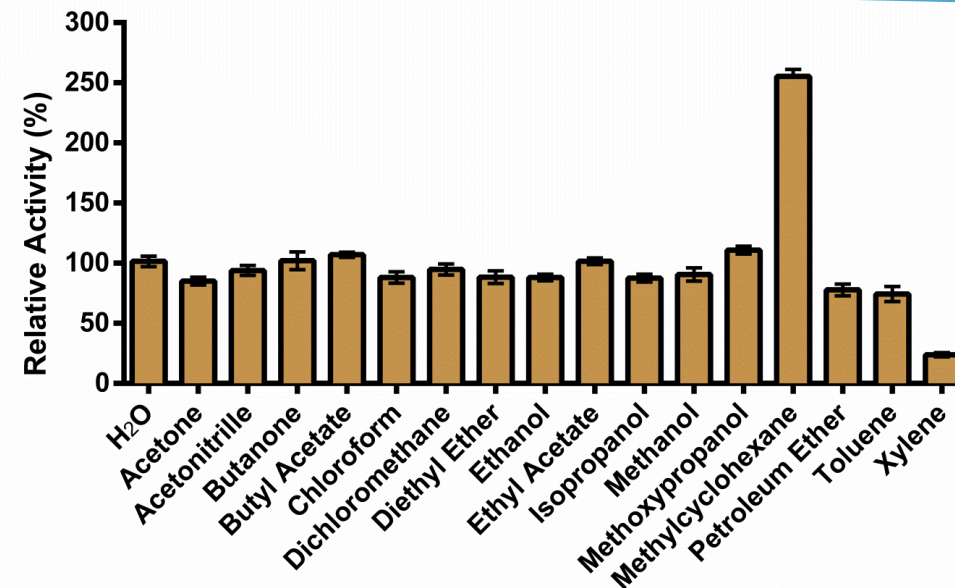
Détergents,  
Stockage,  
Stérilisation...



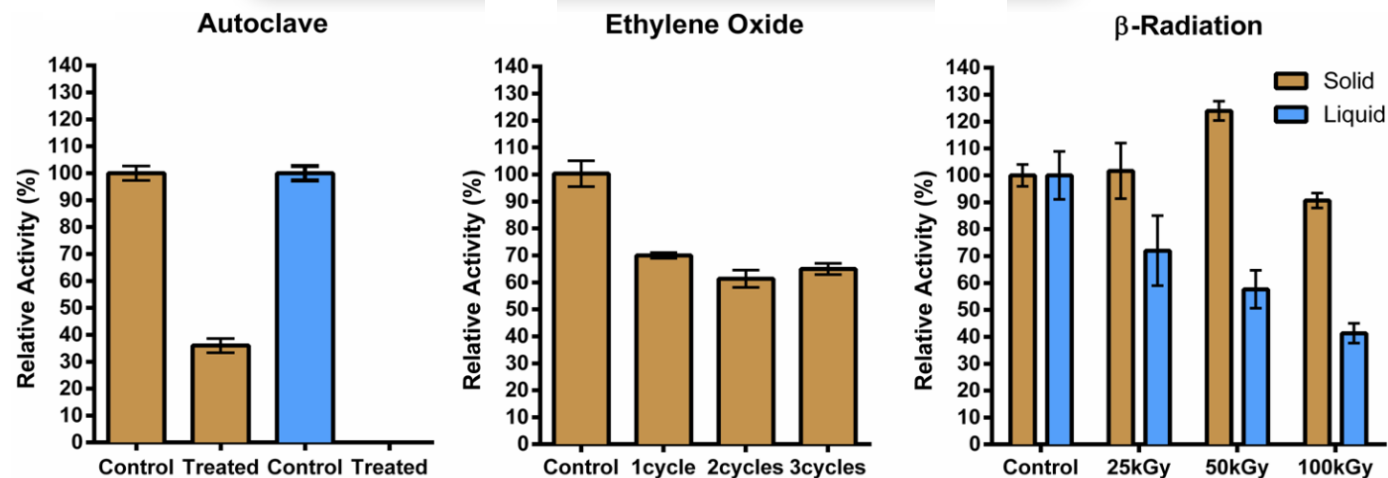
# Robustesse de VesuBACT en chiffres



**Hyperthermostabilité**



**Compatible avec les solvants**



**Stérilisation**

# Génération d'un catalogue de plusieurs milliers de variants par mutagenèse dirigée

## Caractérisation et criblage à haut débit nécessaires

Design

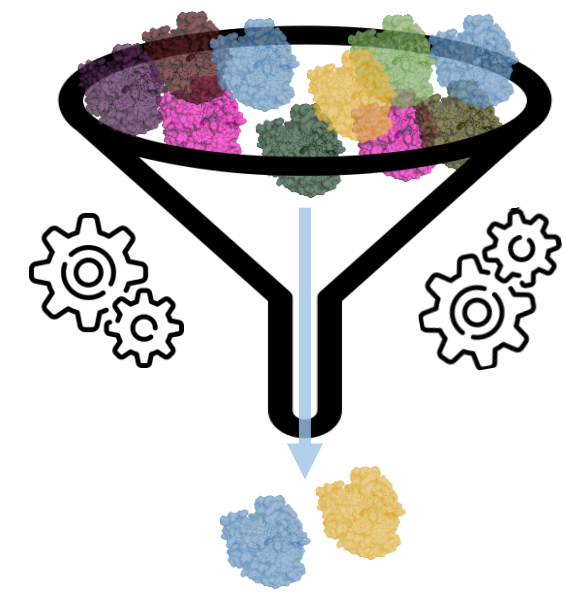
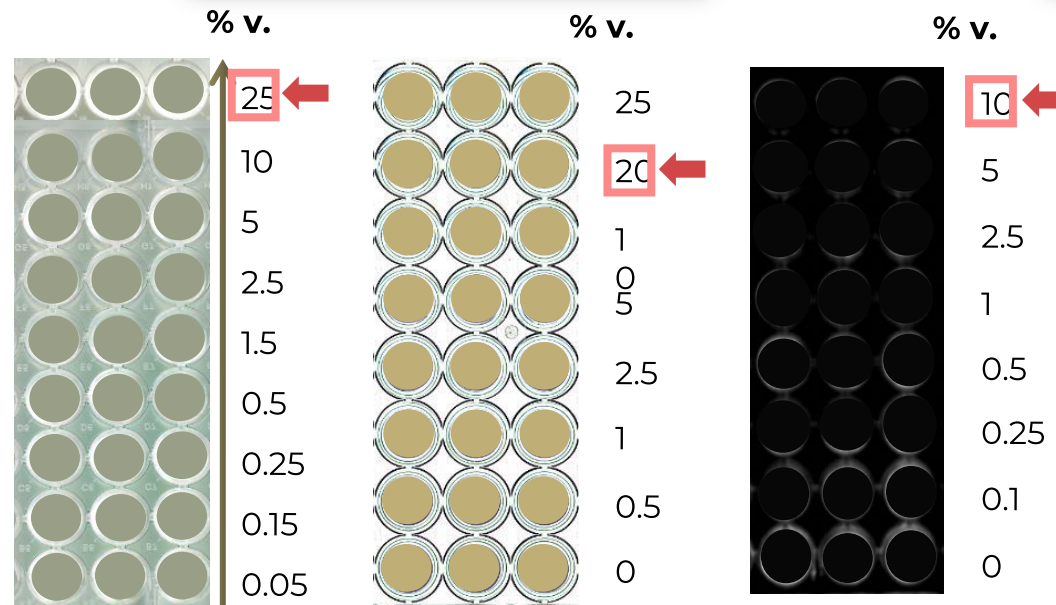
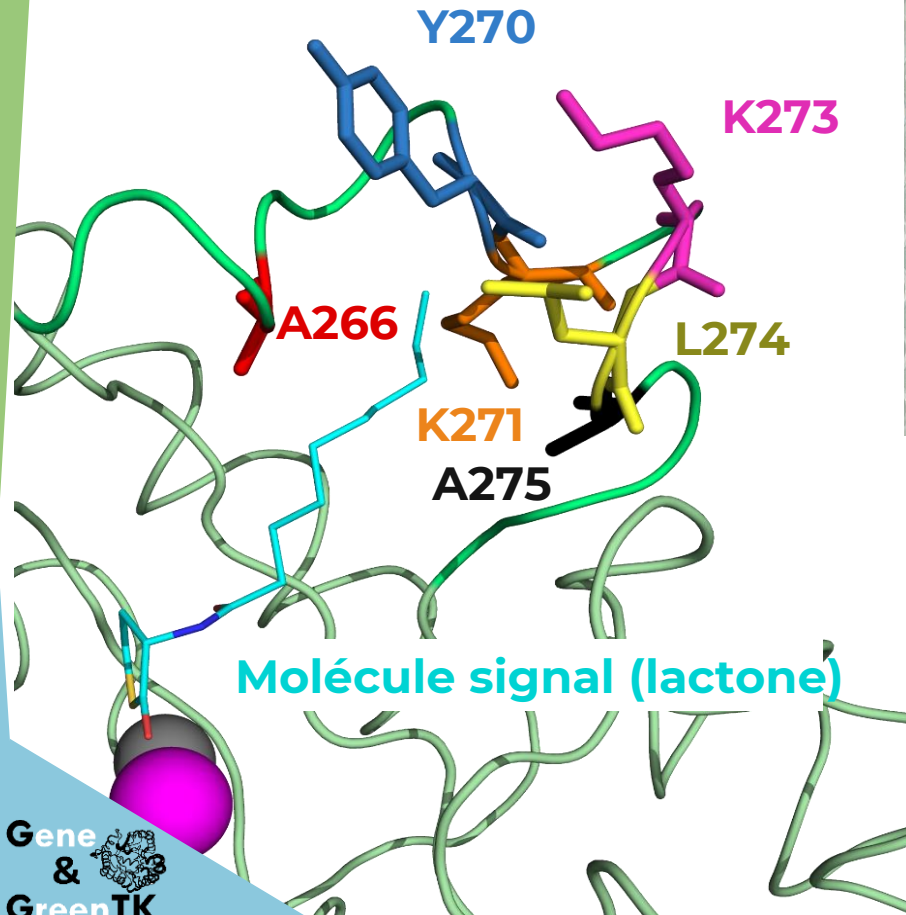
Criblage

Enzymes améliorées

JBC REVIEWS

### Engineering acyl-homoserine lactone-interfering enzymes toward bacterial control

Received for publication, April 23, 2020, and in revised form, July 17, 2020. Published, Papers in Press, July 20, 2020. DOI 10.1074/jbc.REV120.013531  
 Raphaël Billot<sup>1,2</sup>, Laure Plener<sup>1</sup>, Pauline Jacquet<sup>1</sup>, Mikael Elias<sup>3</sup>, Eric Chabrière<sup>2,\*</sup>, and David Daudé<sup>1,\*</sup>

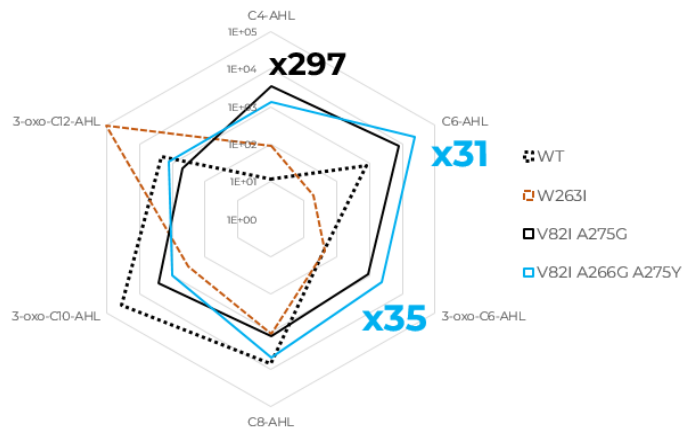


Applying molecular and phenotypic screening assays to identify efficient quorum quenching lactonases

Raphaël Billot<sup>a,b</sup>, Laure Plener<sup>a</sup>, Damien Grizard<sup>a,c</sup>, Mikael H. Elias<sup>d</sup>, Éric Chabrière<sup>b</sup>, David Daudé<sup>a,\*</sup>

# Sélection au laboratoire des variants potentiellement pertinents

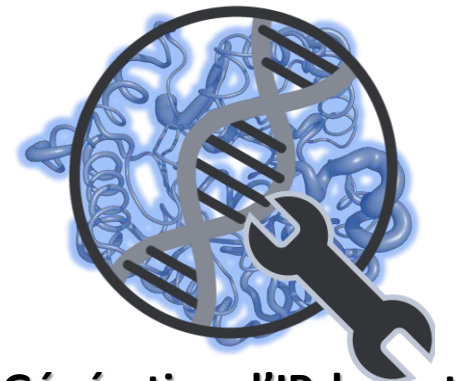
## Activité lactonase multipliée par 300



## Conservation de la thermostabilité



Variants spécifiques pathogènes/lactones



Génération d'IP, brevets

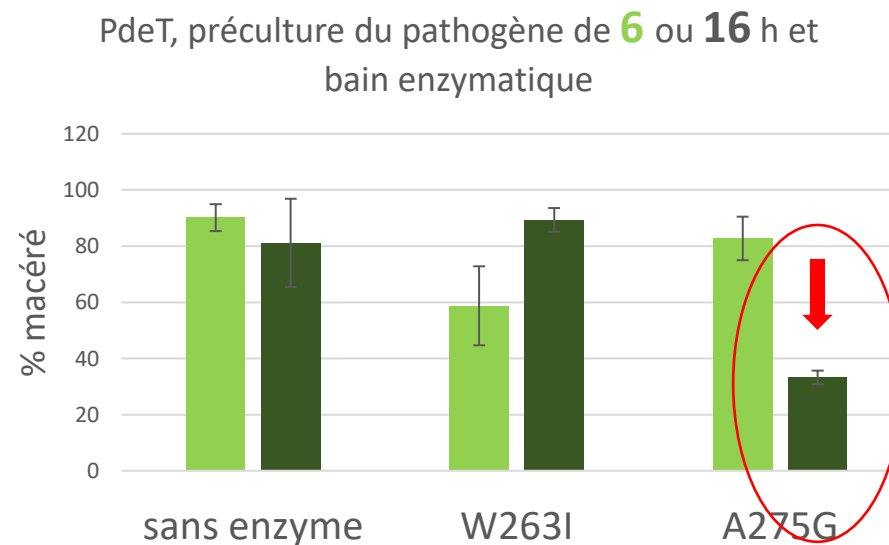
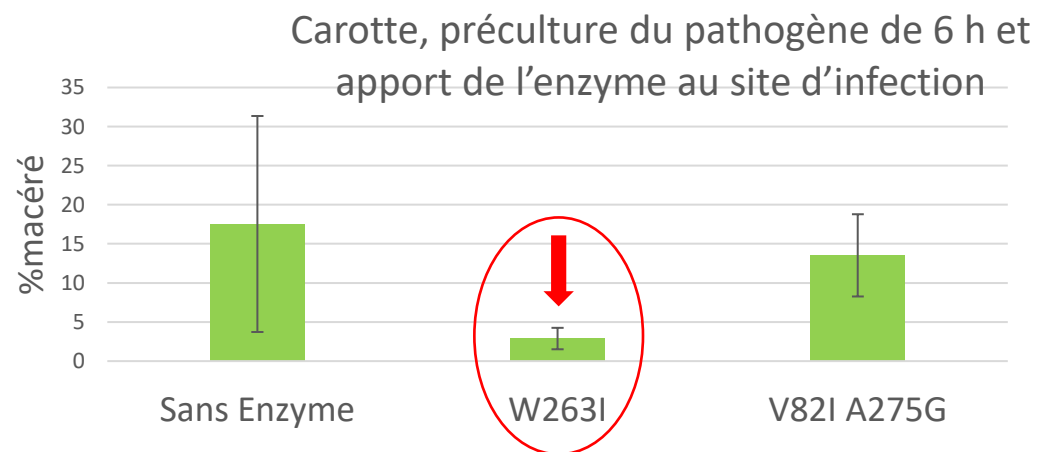




# Screening de variants au laboratoire

Mise au point nécessaire car absence de test normalisé

- Tranches de carotte ou pomme de terre (pdeT)
- Plusieurs sites d'infection avec pré-culture de 6 ou 16 h de *D. dadantii* DSMZ 18020
- Apport des variants W2621 ou V821 A275G aux sites d'infection ou *via* un bain enzymatique
- Incubation 48 h
- % macéré = masse macérée/masse initiale



# Tests *in planta* en conditions semi-contrôlées

Efficacité Contre le *feu bactérien sur pommier* en préventif (1)



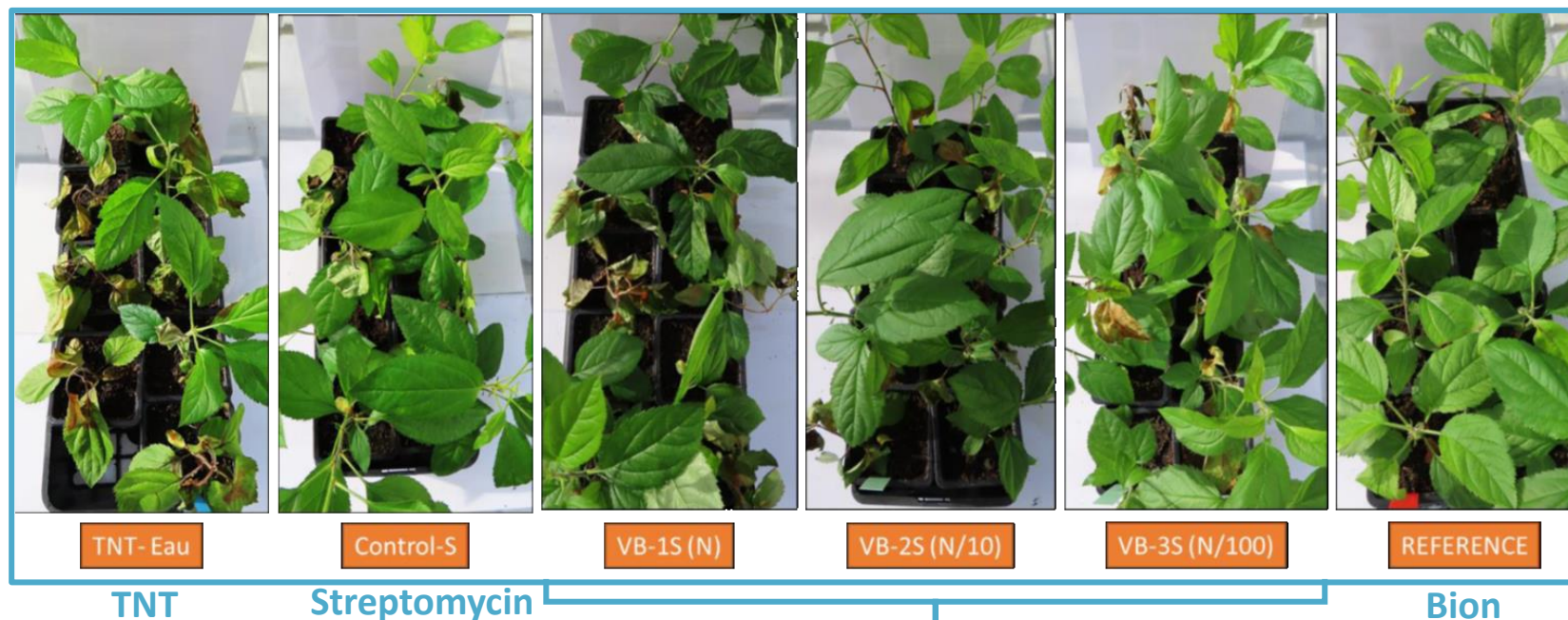
	Température (°C)	Photopériode (h)	HR (%)
Semis	20 à 25	16	NA
Quarantaine	18 nuit et 22 j		60 à 80

Variété	Golden Delicious
Traitements	Par pulvérisation
Inoculation	<i>E. amylovora</i> CFB1430 (coupure ciseaux)

30 plants/conditions  
(randomisés en 3 blocs de 10)

3 Doses : N ; N/10 et N/100

ETAPES	DATES
Semis	12 09 2022
Rempotage	26 09 2022
Traitement J-1	17 10 2022
Inoculation	18 10 2022
Lecture	08 11 2022



TNT

Streptomycin

VesuBACT

Bion

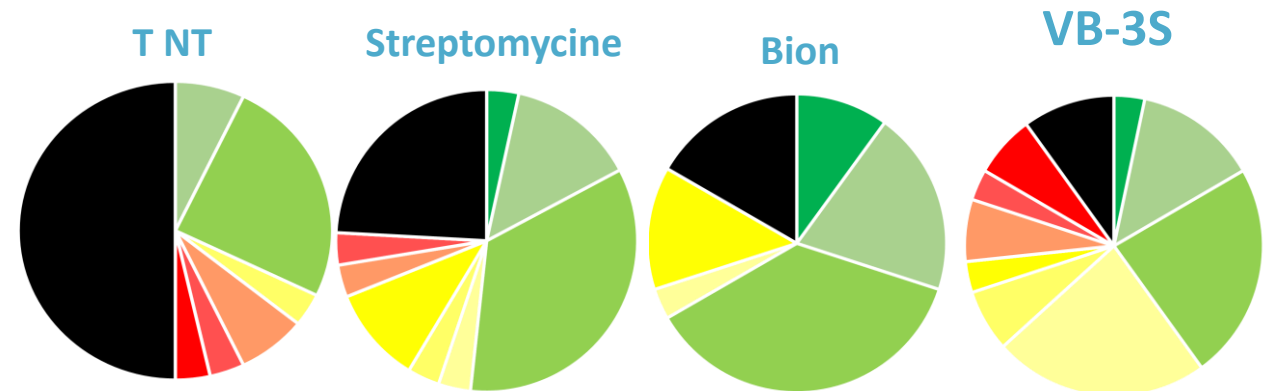
# Tests *in planta* en conditions semi-contrôlées

Efficacité Contre le *feu bactérien sur pommier* en préventif (2)

Modality	Severity (%)	Incidence (%)	Protection (%)
TNT-S	67	100	-
Control-S	44	97	35
VB-1S	50	100	26
VB-2S	41	100	40
VB-3S	39	97	42
REF-BION	31	90	53

Nb de plants / scores de maladie (0 = abs. symptome, 100 = plant mort)

■ 0 ■ 10 ■ 20 ■ 30 ■ 40 ■ 50 ■ 60 ■ 70 ■ 80 ■ 90 ■ 100



A 21 jours post infection :

- % de protection qui  $\nearrow$  avec  $\searrow$  de la dose
- Efficacité au moins équivalente à celle de la Streptomycine

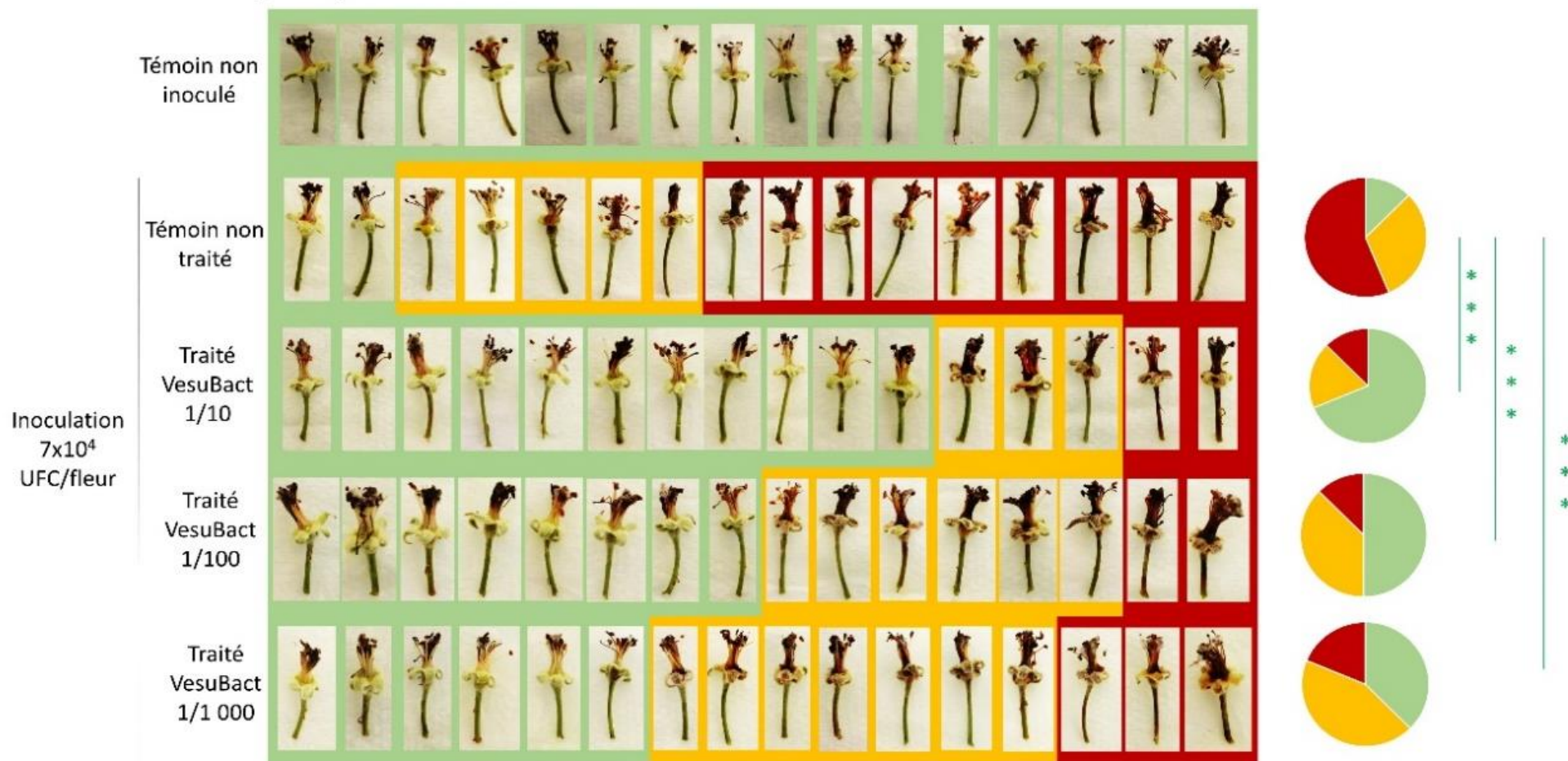


# Feu bactérien, impact à la floraison

Essai préliminaire sur fleurs de Gala

*E. amylovora* DSM 30165

## A. Observation à 4 jours post infection



# Mais aussi d'autres modes d'action ?

*Clavibacter michiganensis* sur maïs

Bactérie à gram positif

Effet SDN et/ou modulation des microbiotes ?

South  
Border

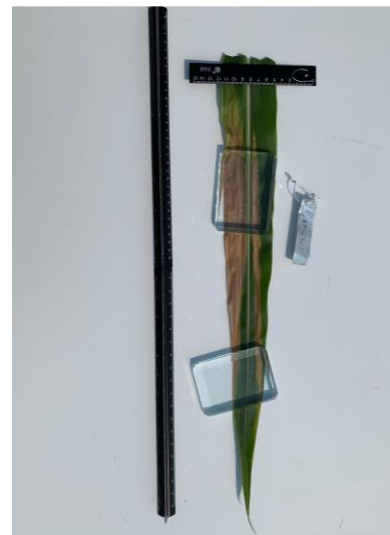


North  
Border

East  
Border



Infected  
Not treated



Infected  
BSA treated



Infected  
Lactonase treated



Not Infected  
Not treated

# Mais aussi d'autres modes d'action ?

*Biostimulation*

## Réponse protéomique de plants de pommier traités par VesuBACT :

➤ probable des marqueurs connus de résistance (Betv1 (PR-10), Serpin protease inhibitor, HSP60)

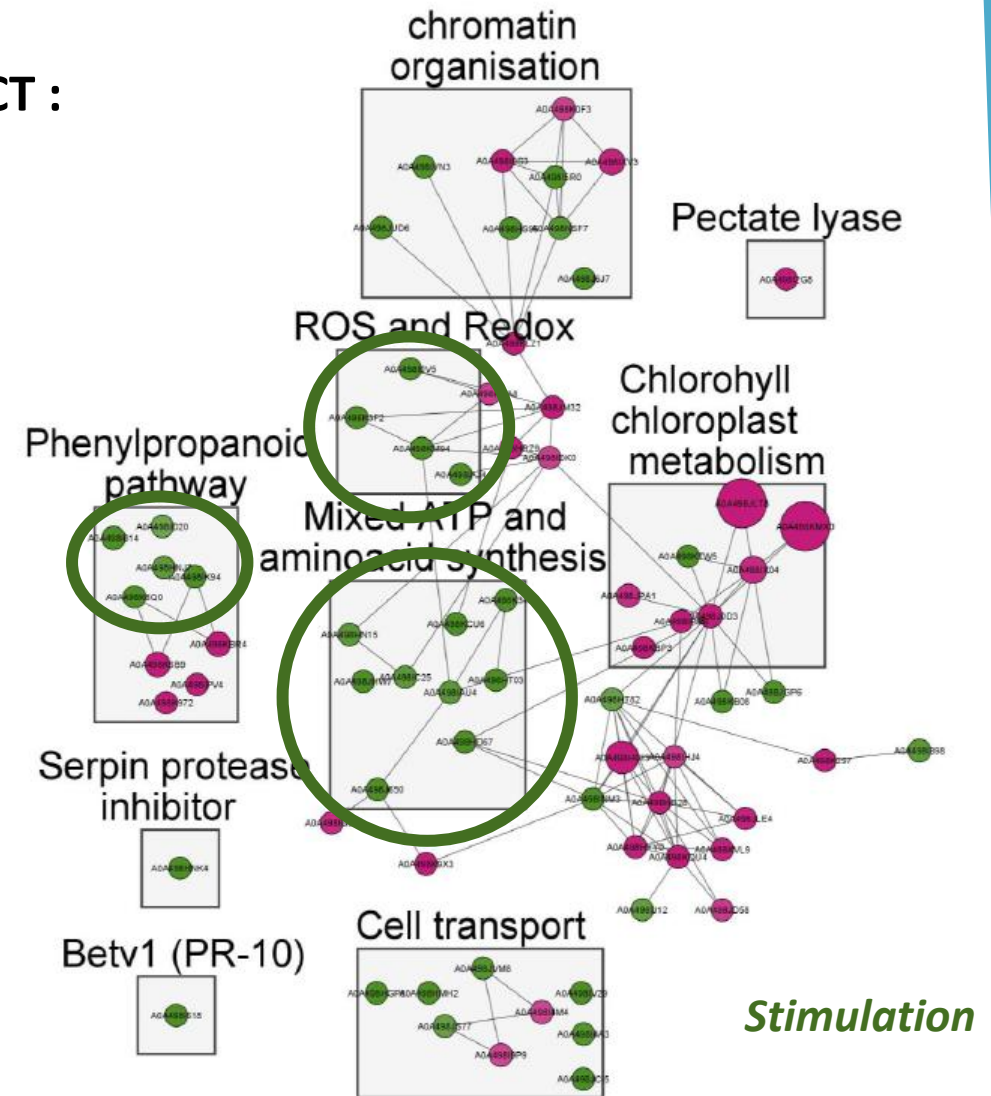
➤ probable d'une partie de la voie de shikimate et des phénylpropanoïdes.

➤ probable de la capacité redox  
(régulation des antioxydants et des enzymes métaboliques liés à la défense)



Résistance aux stress abiotiques  
Positionnement MFSC / accès au Marché plus rapide

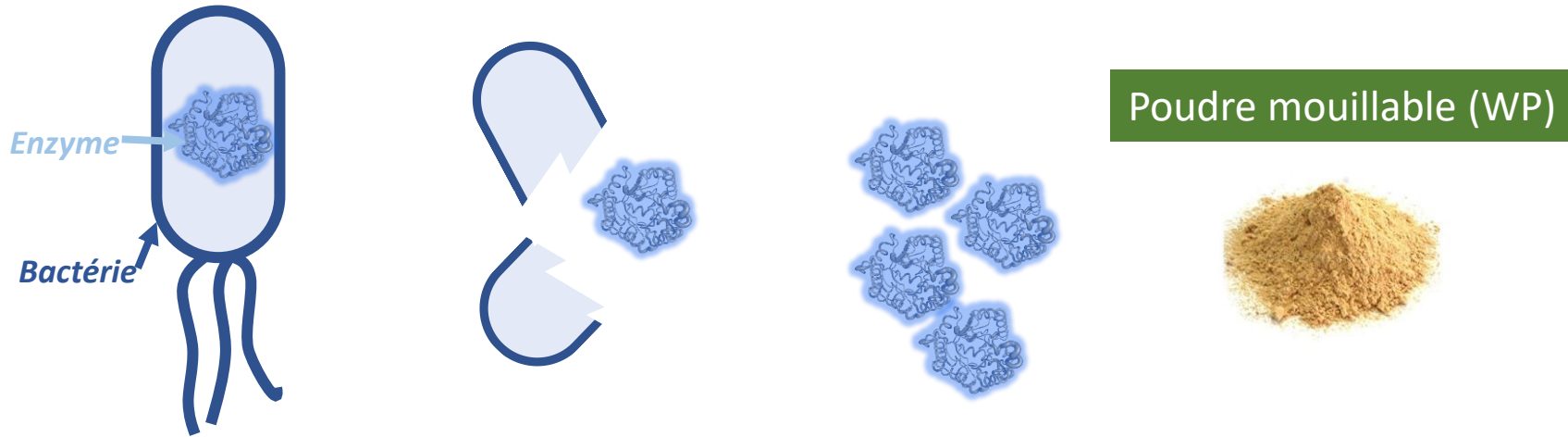
## VesuBACT vs Témoin Non Traité





# Production hétérologue chez *E. coli* (1)

FML couplée à DSP (extraction/concentration/séchage)



Fermentation  
bactérienne

Cassage

Enrichissement

Séchage



Fermenteur



Homogénéisateur  
Haute Pression



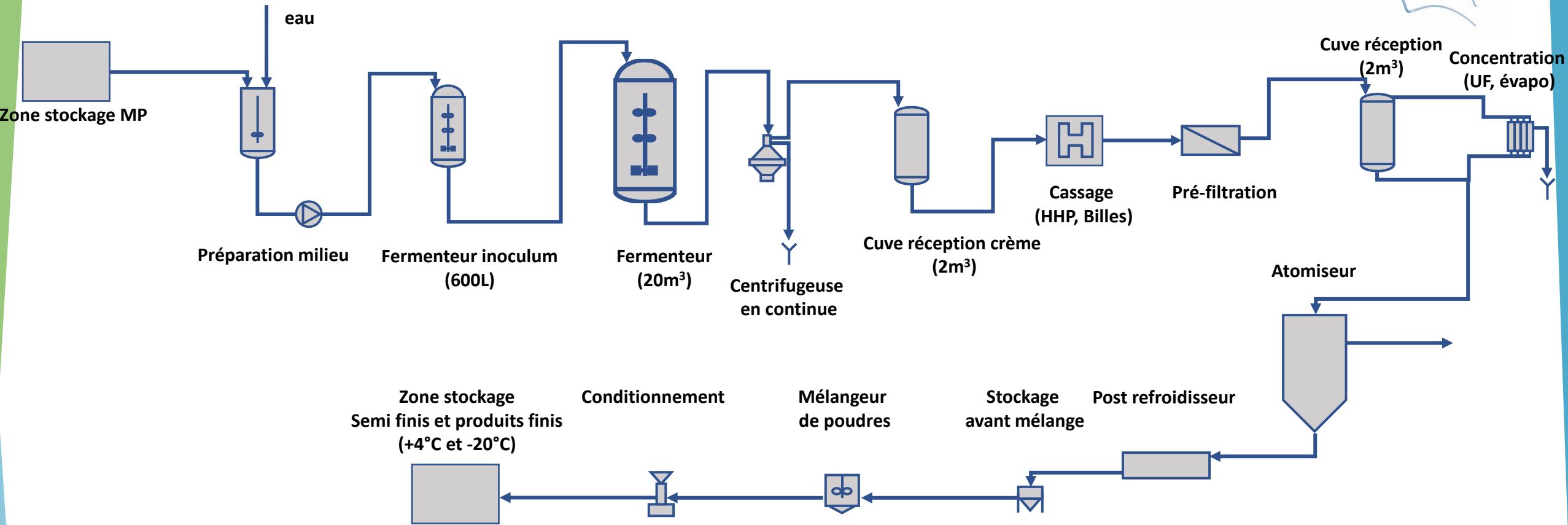
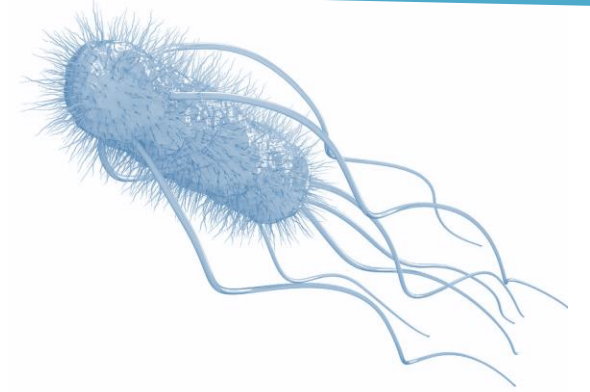
Filtration



Atomisation

- Absence de CMR, d'antibiotique, d'OGM, d'ADN dans la substance active
- Coût de traitement Agriculteur équivalent à 1 pesticide « premium » (35 €/h)
- Prise en compte des performances énergétiques de l'outil

# Production hétérologue chez *E. coli* (2)



# Stratégie réglementaire



Mécanisme naturel et issue de procaryote



Mutagénèse dirigée et molécule recombinante



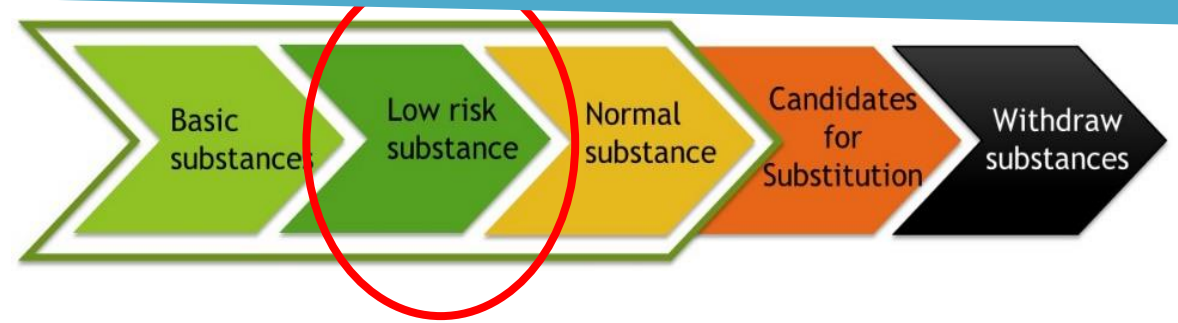
SA low risk selon règlement PPP CE N°1107/2009



Biocontrôle



AB



Mais aussi

MGM + Pesticides

Code de l'environnement / Livre V

Installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE)

Microorganismes Génétiquement Modifiés (MGM) utilisés en milieu confiné

Rubrique 2680 (Utilisation d'OGM)

- Déclaration (classe de conf 1)
- Autorisation (classes de conf 2 et +)

- Autorisation

Rubrique 3440 (Fabrication de produits phytosanitaires)

- Autorisation

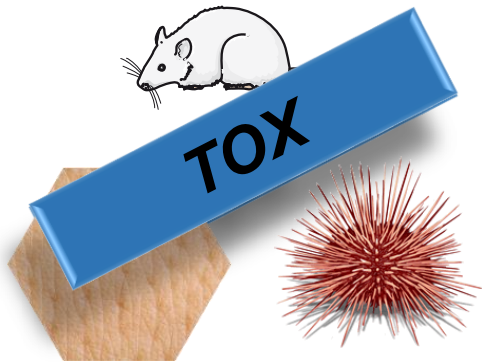
Avis du comité d'expertise des utilisations confinées de MGM

Autorisation Préfectorale



# Données Eco/toxicologiques

1<sup>er</sup> « Dérivage » de l'inclusion réglementaire



Moins toxique sur larves que  $\text{CuSO}_4$   
350 x sur oursin  
950 x sur huitre

No toxicity in rats (oral and dermal administration)

OECD423/OECD402  
LD50 > 2000mg/kg

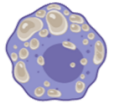


No irritation on reconstructed human skin epidermidis

OECD439 – Episkin™ Model  
96% (>50%) mean viability (MTT)

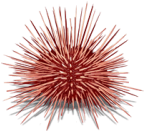


No cytotoxicity on macrophages



Urchin larva (*Paracentrotus lividus*)

EC50 > 10 mg/L  
EC10 > 10 mg/L  
NOEC 10 mg/L



Oyster larva (*Crassostrea gigas*)

EC50 > 10 mg/L  
EC10 2,9-3,5 mg/L  
NOEC 0,1 mg/L



# En conclusion, une réponse potentielle à des enjeux « filières » majeurs

- Fr. 2<sup>ème</sup> producteur de p.d.t. dans l'UE et 3<sup>ème</sup> de fruits et légumes ; 666 000 ha concernés
- 450 000 emplois directs pour la filière fruits et légumes frais (58 500 exploitations)
- 300 coop. et 225 organisations de producteurs



Forts IFT pour les cultures spécialisées

Malgré recommandation (PNNS), ↘ de la consommation

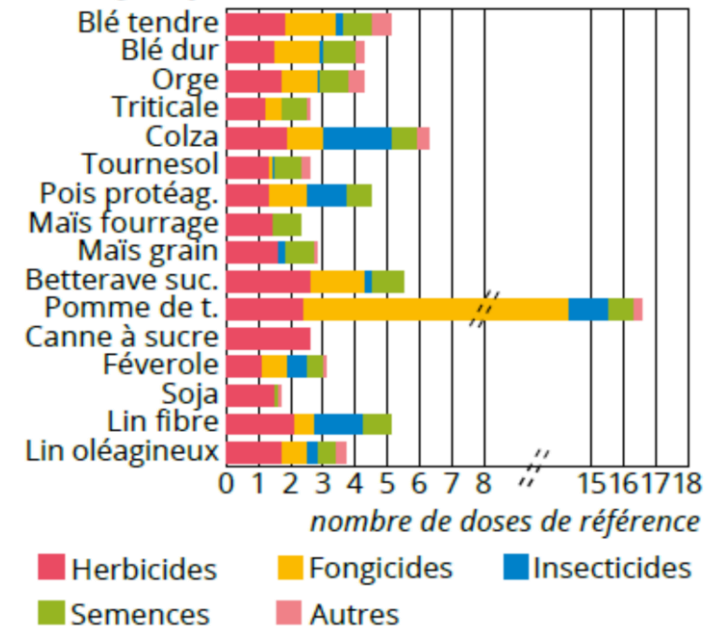
	Légumes	Fruits
Enfants	- 10 %	- 20 %
Adultes	- 12 %	- 9 %

## Nécessité de :

- Privilégier circuits courts/relocalisation
- Renforcer la confiance du consommateur
- « Absence de résidus de pesticides », certification HVE

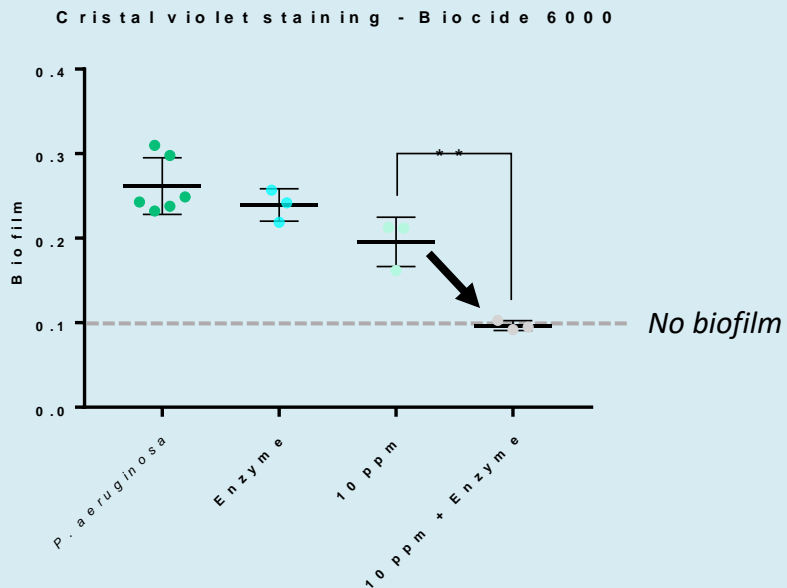
	Valeur à l'exportation en 2019 (en M€)
Tomate	341
Chou-fleur	93
Carotte	27
Oignon	47
Salade	151

## • IFT moyen par culture



# Elargissement possible à d'autres usages

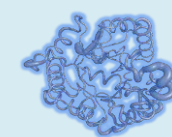
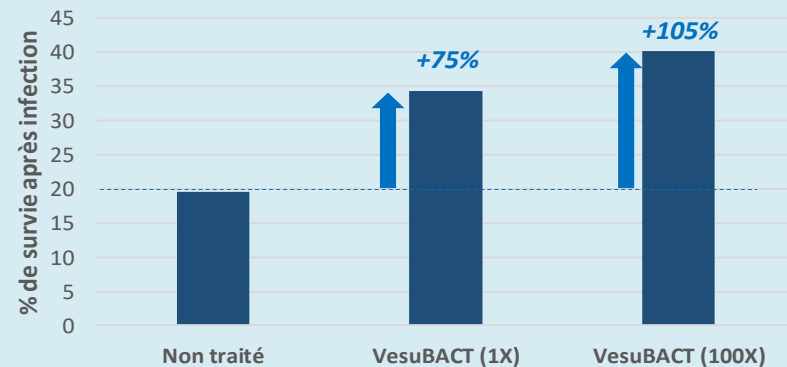
## Antibiofilm



Réduction des biofilms en TAR  
Synergie avec les biocides

## Nutrition animale

Augmentation de la survie de crevettes infectées par *Vibrio*



VesuBACT



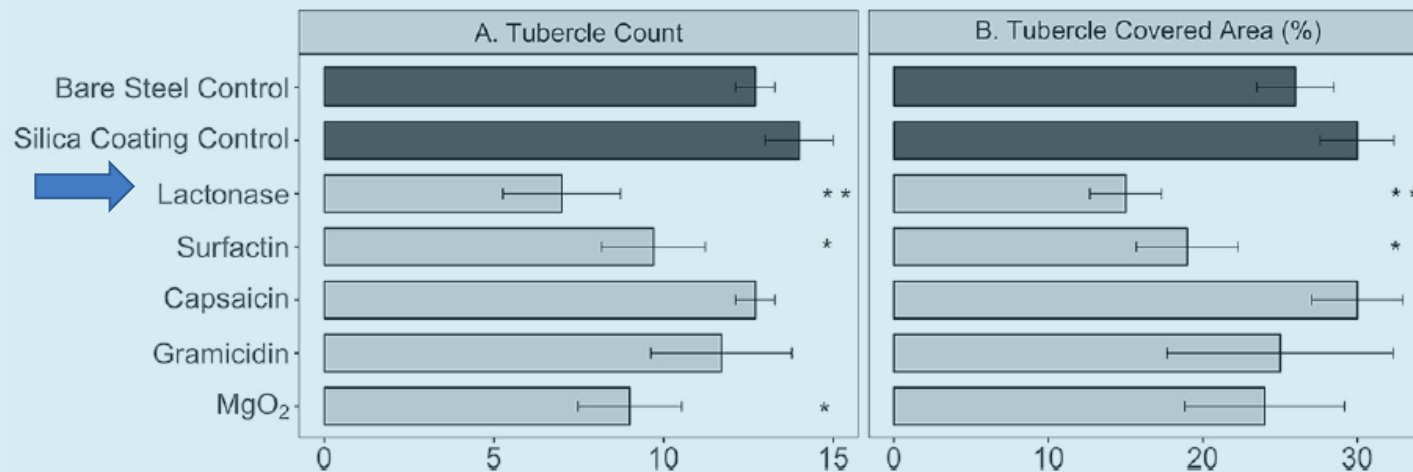
Aliment Feed



Test *in vivo* sur crevettes

## Peinture antifouling

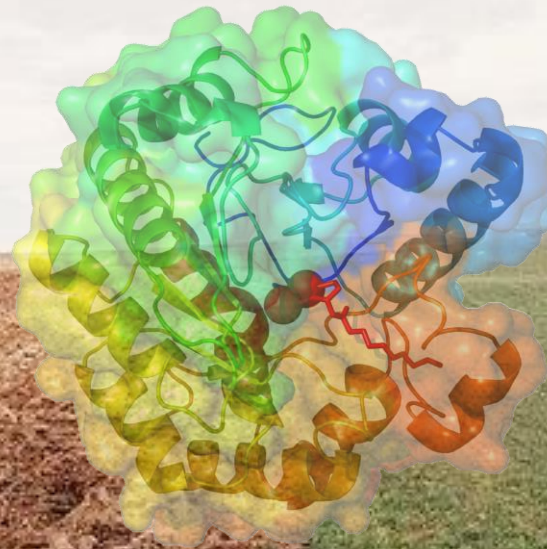
Réduction salissures et corrosion



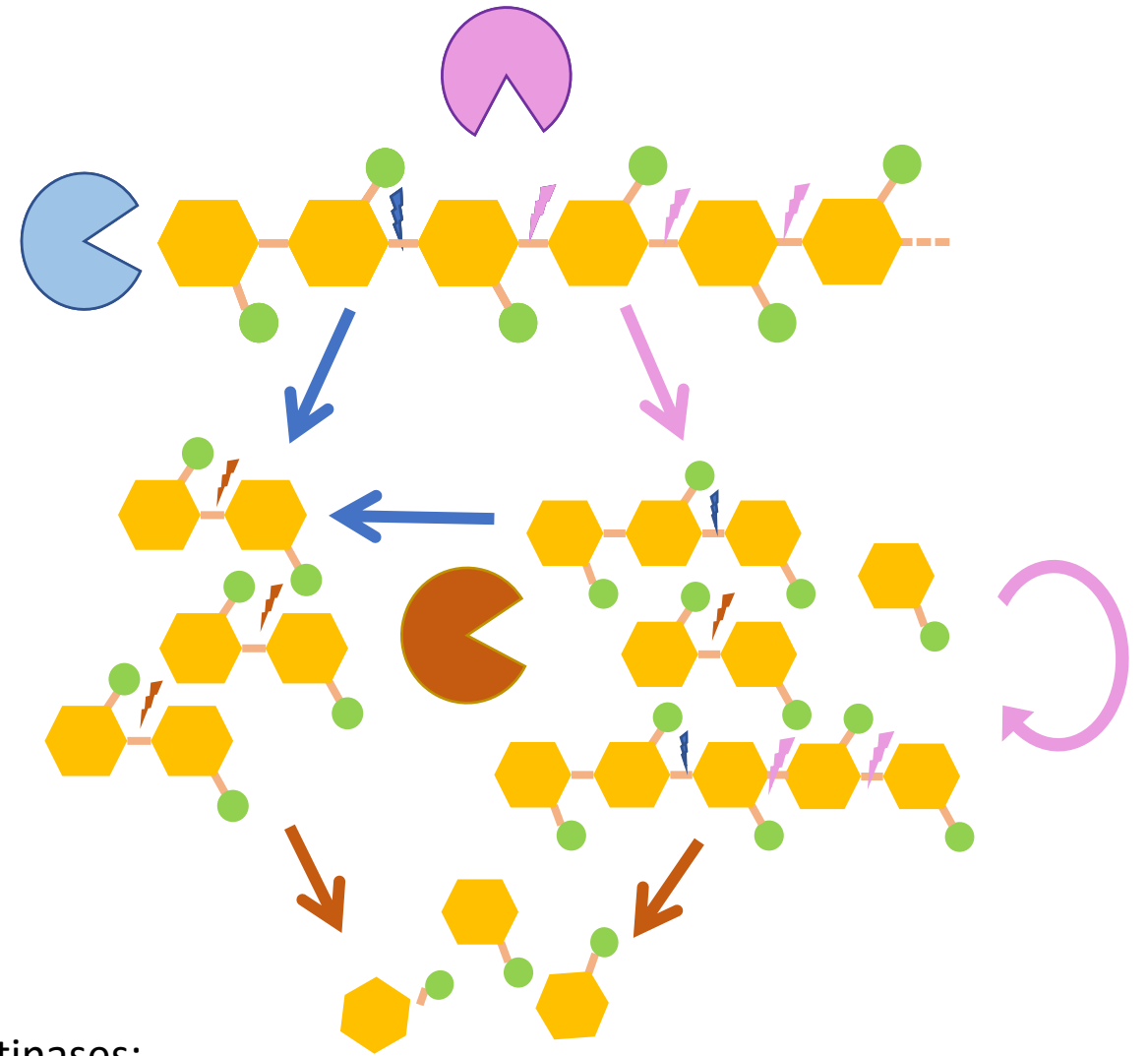
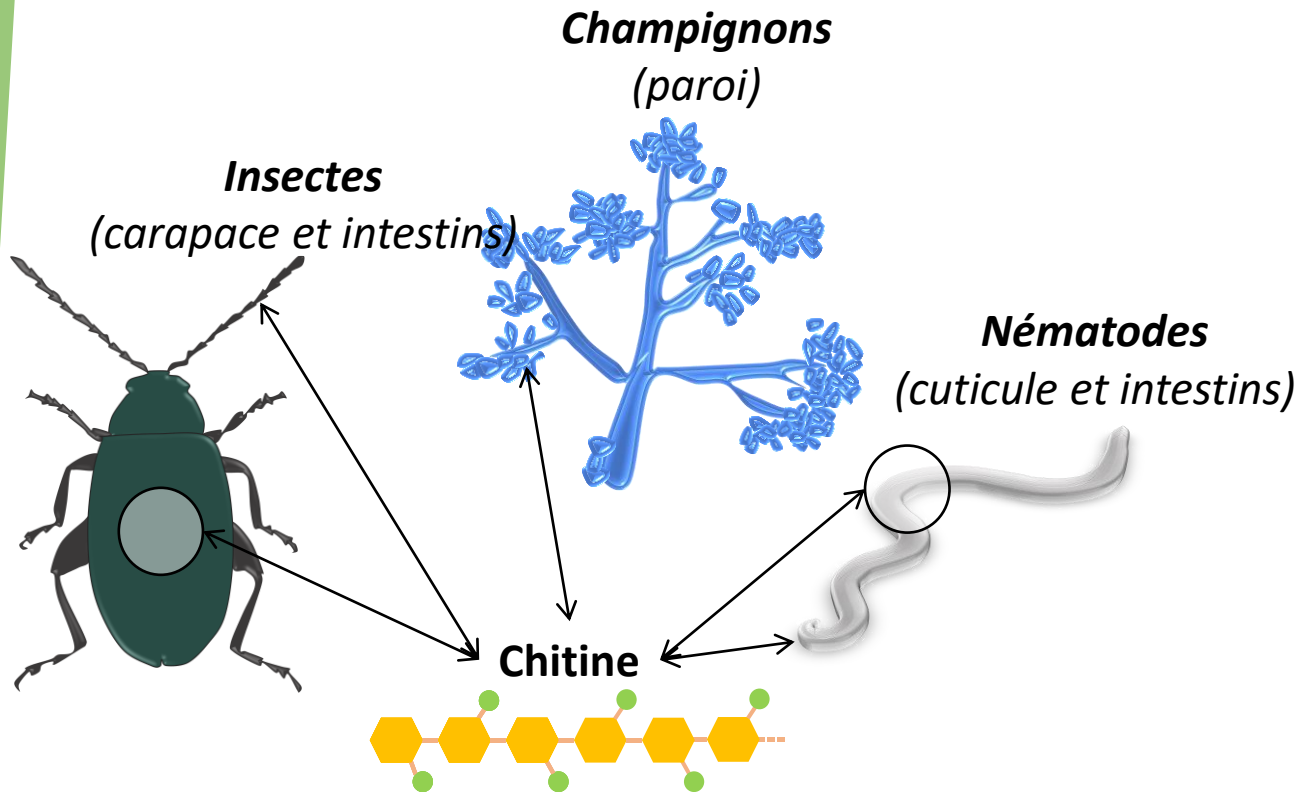


# Cas des chitinases







Cibler la chitine pour lutter contre les champignons  
et les insectes



# Chitinases

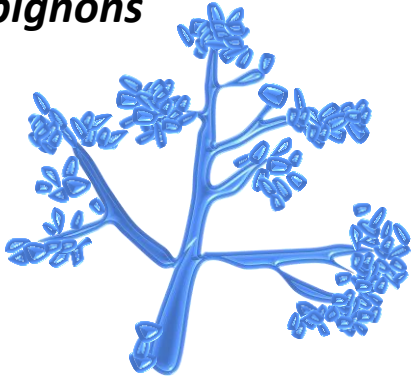


## Chitinases:

-  endochitinase
-  exochitinase
-  glucosaminidase
-  Site de coupure
-  glucosamine
-  N-acétyl

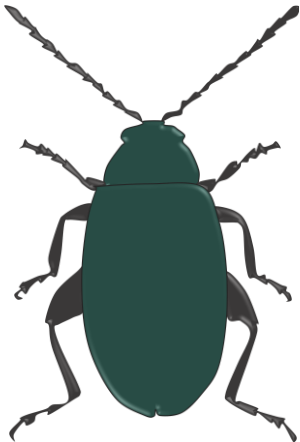
# Cibles

## Champignons



- ❖ *Fusarium* sp. → Fusariose
- ❖ *Botrytis cinerea* → Pourriture grise
- ❖ *Tilletia caries* → Carrie du blé

## Insectes



- ❖ *Zabrus tenebrioides* → Zabre des céréales
- ❖ *Delia coarctata* → Mouche grise des céréales
- ❖ *Agriotes lineatus* → Taupin des moissons
- ❖ *Psylliodes chrysocephalus* → Altise du colza





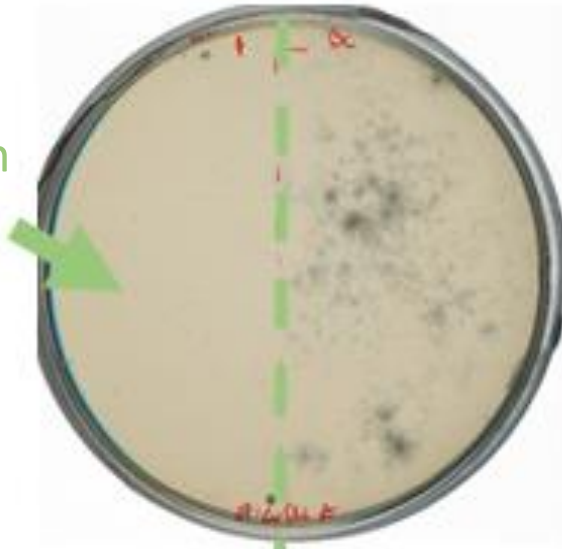
# Action antifongique

Chitinase

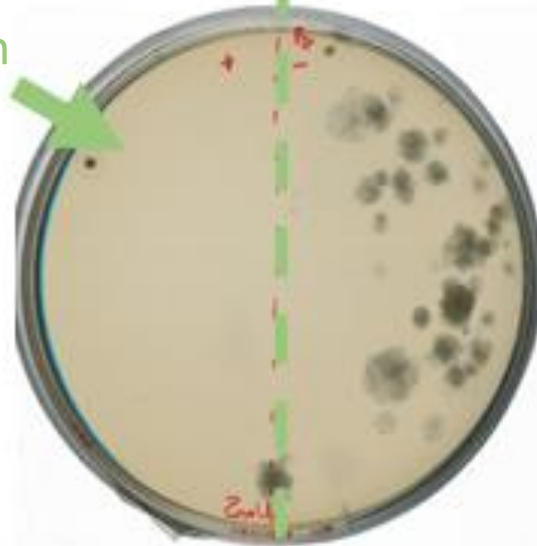
Contrôle NT

*Botrytis cinerea*

Inhibition



Inhibition



Tests *in planta* en cours

*Fusarium graminearum*



# Merci pour votre attention

- Damien GRIZARD (PhD) (Conseil stratégique)  
[damien.grizard@gene-greentk.com](mailto:damien.grizard@gene-greentk.com)
- David DAUDÉ (PhD & HDR) (CEO/CSO)  
[david.daude@gene-greentk.com](mailto:david.daude@gene-greentk.com)

Ce projet a été financé par l'État dans le cadre du Programme d'investissements d'avenir, désormais intégré à France 2030, et opéré par l'ADEME.



## Poster #17 (Baptiste Kergaravat)

Mise en œuvre d'enzymes innovantes pour la lutte contre les bactéries et champignons phytopathogènes.

Kergaravat Baptiste<sup>1,2</sup>, Piener Laure<sup>1</sup>, Billot Raphaël<sup>1</sup>, Mélanie Gonzalez<sup>2</sup>, Chabrière Eric<sup>3</sup>, Daudé David<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GeneGreenTK, Marseille, France; <sup>2</sup>IRUJ Méditerranée Infection, Marseille, France; <sup>3</sup>IRD

**CONTEXTE**

- Les ravageurs de cultures (champignons, insectes), une menace pour la sécurité alimentaire.
- Les traitements actuels ne sont pas durables. Persistance dans l'environnement → dommages hors-cible → toxicité pour la biodiversité → résistances.
- Forte demande pour des produits phytosanitaires plus vertueux.
- Les enzymes sont des molécules actives spécifiques et biodégradables. En particulier, les chitinases et les lactonases pourraient être des alternatives innovantes.

**Lactonases**

**PRINCIPE**: Quorum sensing / Quorum quenching

- La communication des QS (Quorum Sensing) est nécessaire à la virulence des bactéries phytopathogènes.
- Les lactonases dégradent les molécules messagères de QS, les N-acylhomoserine lactones (AHL).
- Quorum Quenching: Brûler la communication pour couper la virulence.
- Les bactéries ne sont pas tuées → gestion sélective grandement réduite.

**CIBLES**

- Champignons bactériens (Alternaria, Botrytis, Fusarium, Phytophthora, etc.)
- Pathogènes bactériens (Pseudomonas, Erwinia, etc.)
- Chimères de la biote, sources associées (Pantoea, etc.)
- Pathogènes bactériens (Pseudomonas, Erwinia, etc.)
- Pathogènes bactériens (Pseudomonas, Erwinia, etc.)

**RÉSULTATS**

- De nombreuses bactéries phytopathogènes perturbées par le quorum quenching.
- Chimères de la biote, sources associées (Pantoea, etc.)

**PREUVES DE CONCEPTS *in vitro* (TRL3)**

**PERSPECTIVES**

- Poursuite des évaluations: in planta en serre et en parcelles expérimentales.
- Industrialisation et inclusion réglementaire de la substance active (Low Risk)

**Chitinases**

**PRINCIPE**: Dégradation de la chitine

- La chitine est un polymère structurant le paroi cellulaire des champignons, bactéries phytopathogènes, et l'échelle des insectes et nématodes.
- Les chitinases sont des enzymes qui dégradent la chitine.
- Ciblage spécifique de la chitine, non présente chez les plantes, mammifères, bactéries.

**CIBLES**

- Champignons (Botrytis, Fusarium, etc.)
- Pathogènes bactériens (Pseudomonas, Erwinia, etc.)
- Chimères de la biote, sources associées (Pantoea, etc.)
- Pathogènes bactériens (Pseudomonas, Erwinia, etc.)

**RÉSULTATS**

- Pipeline de travail
- Production de chitinases recombinantes
- Gémination des conidies en présence de chitinases.
- Croissance des hyphes de *Bioderma zoeae* en présence de chitinases.

**PREUVES DE CONCEPTS *in vitro* (TRL3)**

**PERSPECTIVES**

- Évaluation *in planta* des effets antifongiques (ex: protection contre la fonte des tiges du blé).
- Ingénierie enzymatique pour améliorer les effets antifongiques, la stabilité.
- Extension aux insectes ravageurs de cultures: *Pieris brassicae* (mouche blanche), *Mytilus* (larvicide), *Drosophila* (mouche domestique), *Agrobacterium tumefaciens* (bactérie).

Les enzymes, telles que les chitinases et les lactonases, constituent une solution prometteuse pour protéger durablement les champs.

Reference: Datta, E. C. (2008) Crop Insect pests. 1. Agri. Sci. 139: 21-45. 10.1017/S0021859608000776

Schéma: Brevet de France