

Etude du mécanisme d'action d'un nouvel herbicide d'origine naturelle

Les interactions entre organismes au sein des écosystèmes reposent pour une large part sur l'existence de mécanismes de médiation chimique qui participent à la coopération ou à la compétition entre espèces^{1,2}. Cette médiation fait intervenir des molécules, essentiellement produites par les plantes et les microorganismes, dont la diversité des structures chimiques et des activités biologiques est une source importante d'innovations tant du point de vue de la recherche fondamentale –en particulier par l'étude de leurs mécanismes d'action- que du point de vue de la recherche appliquée, par leur valorisation en agriculture ou en santé humaine. De plus, la co-évolution des molécules produites et de leurs cibles moléculaires chez les différents organismes a abouti à une large palette d'analogues présentant différents degrés de bioactivité et de sélectivité, qui sont autant d'outils pour des études fines de structure/fonction de ces composés et de leurs cibles. Le développement de ces approches reste néanmoins dépendant de la disponibilité de ces composés en quantité suffisante, ce qui est critique pour des molécules produites en faible quantité et/ou difficiles à purifier à partir de sources naturelles. La mise au point de méthodes de synthèse chimique, totale ou partielle, de ces molécules représente donc une étape déterminante pour aborder l'étude approfondie de leur mode d'action et envisager leur utilisation.

Le développement de telles molécules d'origine naturelle en vue de leur utilisation en agriculture apparaît pertinent dans l'optique d'une diminution de l'impact environnemental lié à l'utilisation de pesticides, et dans un contexte de forte défiance de l'opinion publique vis-à-vis des pesticides d'origine purement synthétique. Entre 1997 et 2010, les substances naturelles ont représenté plus du tiers des nouveaux pesticides brevetés, soulignant leur forte émergence au sein des stratégies R&D de l'industrie phytopharmaceutique³. L'activité des substances brevetées était néanmoins presque exclusivement fongicide ou insecticide, aucune substance naturelle à activité herbicide n'ayant été brevetée sur cette période, et ce malgré la part prépondérante des herbicides au sein des pesticides utilisés (60% du marché mondial)⁴. L'émergence de résistances aux herbicides de synthèse ainsi que les changements des législations nationales régulant leur utilisation rendent indispensables la découverte et la caractérisation de nouvelles molécules, en particulier biosourcées, i) au mode d'action innovant et ii) présentant une écotoxicité moindre⁴.

Dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe de Synthèse Totale et Interfaces (Laboratoire de Synthèse Organique, UMR7652 CNRS/Ecole Polytechnique) et l'équipe de Biologie des Semences (Laboratoire de Biologie du Développement UMR CNRS/Sorbonne Université), **nous avons pu mettre en évidence l'activité herbicide de la radulanine A**, un dérivé bibenzyl produit par quelques espèces d'hépatiques (bryophytes) et sans équivalent chez les autres espèces végétales^{5,6}. **L'équipe Synthèse Totale et Interfaces a développé une méthode originale de synthèse de la Radulanine A** basée sur un réarrangement sigmatropique de type rétro-Claisen, permettant d'obtenir le squelette du produit naturel, qui a ainsi pu être utilisé pour réaliser les tests biologiques⁵. La radulanine A présente une phytotoxicité similaire à celle de l'herbicide de référence (glyphosate) vis-à-vis d'*Arabidopsis thaliana*, une plante adventice utilisée comme modèle⁵. L'utilisation de ce composé à titre d'herbicide fait l'objet d'une demande de brevet déposée en avril 2019, en cours d'évaluation. Des tests préliminaires utilisant des analogues structuraux de la radulanine A suggèrent en outre des niveaux de bioactivité différents, associés à la présence de substitutions particulières. En revanche, **les mécanismes d'action de la radulanine A, et a fortiori sa (ses) cible(s) moléculaire(s) directes, restent, à ce jour, inconnus**. Les hépatiques étant des espèces végétales peu étudiées, la littérature de référence reste peu abondante et généralement ancienne, n'apportant aucune donnée sur la fonction possible de la radulanine A dans ces espèces^{6,7}. En outre, peu de données sont disponibles quant aux effets

biologiques de molécules apparentées à la radulanine A, et ne concernent pas leur bioactivité éventuelle vis-à-vis des végétaux⁸. En l'état des connaissances, il apparaît donc nécessaire de mettre en place des approches sans *a priori* afin de déterminer, au niveau moléculaire, les conséquences d'un traitement par la radulanine A. Les compétences réunies dans le cadre de la collaboration entre les deux équipes partenaires permettent également d'envisager une démarche méthodologique de chimobiologie utilisant des sondes chimiques centrées sur la radulanine A et permettant d'isoler et caractériser la (les) cible(s) directe(s) de la radulanine A chez *Arabidopsis thaliana*.

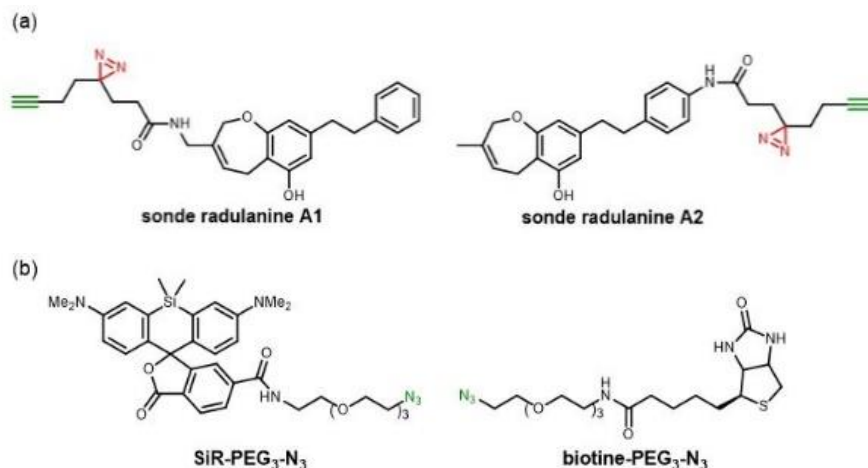
Le projet de thèse aura pour objectif d'**élucider les mécanismes associés à l'effet herbicide de la radulanine A** vis-à-vis de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Il s'appuiera sur la mise en œuvre d'**approches pluridisciplinaires** (chimie de synthèse, biochimie, biologie moléculaire, physiologie) et sera développé suivant deux axes principaux :

1- Impact de la radulanine A sur le métabolisme cellulaire végétal.

Afin de définir les processus métaboliques affectés par un traitement par la radulanine A, une **analyse métabolomique** (limitée aux molécules hydrosolubles) sera réalisée sur des plantules traitées ou non par la radulanine A, en collaboration avec la plateforme de métabolomique de l'IP2S (Paris Saclay). La mortalité des plantes intervenant dès 24h après traitement, l'analyse sera effectuée sur des durées de traitement courtes (3-12h). Après analyse et identification des voies métaboliques affectées, des analyses complémentaires seront effectuées au sein de l'équipe Sorbonne Université. En particulier, l'impact d'un traitement par la radulanine A sur l'expression génique et l'activité d'enzymes intervenant dans les voies identifiées sera déterminé. De plus, l'équipe Sorbonne Université ayant des compétences reconnues dans l'étude du métabolisme rédox, une comparaison de l'état rédox (production d'espèces réactives de l'oxygène, quantité d'antioxydants, activités antioxydantes) de plantules traitées ou non par la radulanine A sera effectuée. L'équipe de l'école Polytechnique a récemment synthétisé des **analogues structuraux de la radulanine A** présentant différents niveaux de bioactivité. L'impact d'un traitement par ces analogues sur les modifications métaboliques mises en évidence sera examiné et comparé à celui de la radulanine A. L'ensemble de ces analyses apportera une **vue détaillée des modifications par la radulanine A des équilibres métaboliques chez Arabidopsis**, susceptibles d'expliquer l'effet herbicide de ce composé.

2- Développement et utilisation de sondes photo-activables pour l'identification de cibles cellulaires de la radulanine A.

Des **sondes chimiques centrées sur la structure de la radulanine A seront synthétisées, au cours de la thèse, dans l'équipe de l'école Polytechnique** (Fig. a). En particulier, des radulanines, photo-activables grâce à la présence d'une fonction diazirene (en rouge), pourront se lier de manière irréversible à leur cible après irradiation UV. En l'absence de données sur la partie de la molécule interagissant avec la cible, deux radulanines seront générées qui divergeront par la position des bras photo-activables, permettant de limiter les risques d'altération de l'interaction ligand-cible liés à l'addition de ces groupements. En parallèle, deux radulanines identiques mais non photo-activables seront construites. Ces différentes radulanines modifiées seront également porteuses d'une fonction alcyne (en vert) permettant d'y ajouter, par chimie clic, soit une sonde fluorescente (type SiR-PEG3 pour les sondes non photo-activables), soit un dérivé biotine (pour les sondes photo-activables ; Fig. b).



Les **dérivés fluorescents seront utilisés en imagerie** sur des cultures cellulaires d'Arabidopsis et sur des plantules, afin de déterminer le (les) compartiment(s) cellulaire(s) ciblé(s) par la radulanine A, et ainsi prédire la localisation de ses sites d'action et/ou de ses cibles.

Les **dérivés biotinylés seront utilisés pour isoler et caractériser les cibles moléculaires de la radulanine A**. Nous anticipons que certaines cibles seront de nature protéique et le projet se focalisera sur ces dernières. Des extraits protéiques seront incubés en présence des radulanines photo-activables puis biotinylés. Après irradiation UV et biotinylation par chimie clic, la formation d'adduits covalents radulanine A-cibles sera recherchée par western-blot par révélation du groupement biotine. Les cibles protéiques seront ensuite identifiées, après purification des complexes par affinité à la streptavidine, par spectrométrie de masse en utilisant les ressources de la plateforme de spectrométrie de l'IBPS, avec laquelle l'équipe SU a déjà collaboré. Sur la base de cette identification et en lien avec les voies métaboliques affectées par la radulanine A, la cible la plus pertinente sera retenue pour une étude *in vitro* approfondie. En particulier, la capacité de la radulanine A à moduler l'activité de la cible retenue sera analysée.

L'ensemble des données apportées par ce projet permettra de **définir le mode d'action, potentiellement original, de la radulanine A**. Outre l'importance de l'identification des mécanismes d'action dans le développement d'une molécule herbicide, ces données sont également susceptibles d'**apporter de nouvelles connaissances fondamentales sur la régulation du métabolisme cellulaire végétal** et son altération dans le cadre d'interactions interspécifiques.

Références bibliographiques

¹Schmidt R, Ulanova D, Wick LY, Bode HB and Garbeva P (2019) Microbe-driven chemical ecology : past, present and future. *ISME J.* **13**, 2656-2663. ²Schuman MC and Baldwin IT (2018) Field studies reveal functions of chemical mediators in plant interactions. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 5338-5353. ³Cantrell CL, Dayan FE and Duke SO (2012) Natural products as source for new pesticides. *J. Nat. Prod.* **75**, 1231-1242. ⁴Dayan FE (2019) Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants*, **8**, 341. ⁵Zhang W, Baudouin E, Cordier M, Frison G and Nay B (2019) One-Pot Synthesis of Metastable 2,5-Dihydrooxepines Through Retro-Claisen Rearrangements: Methods and Applications. *Chem. Eur. J.*, **25**, 8643-8648. ⁶Asakawa Y (2007) Biologically active compounds from bryophytes. *Pure Appl. Chem.* **79**, 557-580. ⁷Zinsmeister HD, Becker H and Eicher T (1991) Bryophytes, a source of biologically active, naturally occurring material? *Angew. Chem.* **30**, 130-147. ⁸Schwartzner C, Bors W, Michel C, Franck U, Müller-Jakic B, Nenninger A, Asakawa Y and Wagner H (1995) Effect of marchantins and related compounds on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase and their antioxidant properties: a structure activity relationship study. *Phytomedicine* **2**, 113-117.