

**Nom et prénom du directeur de thèse : PERRIN Yolande**

Adresse mail : yolande.perrin@utc.fr

Numéro de téléphone : 03 44 23 73 35

**Intitulé du sujet de thèse (en français) :** Synthèse et évaluation de nouveaux dérivés de vanilline pour un usage en biocontrôle sur des espèces végétales de grande culture **VANIFUN**

## Description du projet de recherche doctoral

### 1) L'objectif scientifique, la justification de l'approche scientifique

Dans un contexte de développement durable, l'usage des pesticides pétrosourcés ne sera plus systématique en agriculture, et de nouvelles stratégies de lutte contre les ravageurs et agents pathogènes des cultures sont envisagées (Ecophyto 2+, Green deal). Le biocontrôle est une des solutions permettant de palier les pertes de rendement liées à la réduction d'usage des pesticides, sans impacter négativement l'environnement et la santé humaine. Dans ce cadre, la recherche de nouvelles molécules d'origine naturelle capables de limiter l'impact des champignons phytopathogènes sur les cultures est devenue une priorité nationale et européenne. Le recours à des matières premières renouvelables s'est imposé pour substituer les fongicides pétrosourcés (Vaz, 2018). La lignine, biopolymère très répandu dans la nature puisqu'il est l'un des constituants des parois des cellules végétales, a été étudiée pour diverses applications : combustible, additif pour le ciment, liant dans l'alimentation animale ou composants de matériaux polymères... (Espinoza-Acosta et al., 2016). Par dépolymérisation oxydative, elle conduit à des composés d'intérêt dont la vanilline (Boonchird and Flegel, 1982; Dj et al., 2004). Les propriétés antifongiques et antioxydantes de la vanilline ont été démontrées (Dj et al., 2004; Fitzgerald et al., 2004; Ngarmsak et al., 2006). Ainsi, dans le but d'obtenir des composés multifonctionnels, des dérivés aminés de vanilline ont été conçus au laboratoire TIMR par chimie verte en une étape. Ces composés analogues de la capsaïcine, métabolite secondaire retrouvé notamment dans le piment, elle-même analogue structurelle des métabolites d'acides linoléiques oxydés ont montré pour certains de fortes activités anti-oxydantes et antimicrobiennes sur des souches bactériennes et fongiques contaminantes de crèmes cosmétiques. Sans toxicité sur cultures de cellules humaines HDFn, ils présentent un sérieux potentiel d'utilisation comme conservateurs en cosmétique (Fayeulle et al., 2021). Ces travaux ont mis en exergue de probables relations structure-activité notamment en lien avec la balance hydrophile-hydrophobe (log P) des molécules. L'étendue d'action antioxydante et les fortes activités antimicrobiennes large spectre de certains composés présagent d'autres applications potentielles notamment dans la protection des plantes. La capsaïcine, naturellement produite par les plants de piment protège des attaques d'agents phytopathogènes fongiques selon un effet biopesticide (Adams et al., 2020). L'acide vanillique, précurseur de la vanilline présent dans les exsudats racinaires de différentes plantes, montre une activité antifongique contre *Fusarium graminearum* (Lanoue et al., 2010). Toutefois, aucune donnée sur le potentiel de ces dérivés aminés de vanilline à protéger contre des agents phytopathogènes n'a été rapportée dans la littérature.

Ainsi, les objectifs de ce projet de recherche concernent :

- La synthèse et la caractérisation de dérivés de vanilline par amination réductrice, analogues de la capsaïcine
- L'optimisation réactionnelle de la fonctionnalisation des dérivés par des méthodes alternatives et vertes (agents réducteurs, solvants verts, micro-ondes, automate de synthèse...)
- La mesure du spectre d'activité *in vitro* contre des agents phytopathogènes impactant des cultures d'intérêt : *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium funiculosum*, *Microbotryum violaceum*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Zymoseptoria tritici*.
- L'évaluation de l'activité fongicide ou fongistatique de ces dérivés *in vivo*, sur des plants de colza et de blé, vis-à-vis de champignons pathogènes responsables de maladies touchant les parties aériennes (la sclérotiniose pour le colza, l'oïdium et la septoriose pour le blé)
- La recherche d'une éventuelle activité inductrice de défenses ou stimulatrice de défenses (SDP) chez le blé et le colza (effet éliciteur/potentialisateur), via une évaluation moléculaire des activités de bioprotection : mesures enzymatiques du statut redox, analyse des modifications dans l'expression de gènes de défense et de voies de signalisation.
- Une étude de la relation structure-activité, montrant l'impact des différents groupements présents sur la vanilline sur l'activité fongicide ou SDP des dérivés obtenus.

L'originalité de ce travail réside dans le fait que la vanilline et les dérivés synthétisés n'ont jamais été testés sur les agents pathogènes du blé et du colza ciblés ou sur un potentiel effet inducteur de résistance (éliciteur

ou potentialisateur) sur les plantes elles-mêmes. Ils répondent à la demande de nouveaux produits biosourcés ou bioinspirés qui pourraient servir à la défense de la plante contre les agressions biotiques. Des tests de toxicité pour les plantes et les cellules humaines pourront être effectués sur les plus prometteurs. La suite du projet donnera lieu si les résultats le permettent, à des études en champs avec l'objectif final d'une mise sur le marché de nouveaux biofongicides ou SDP (Stimulateurs de défense des plantes).

## 2) L'adéquation à l'initiative/l'Institut

En proposant comme phytosanitaires de nouveaux composés biosourcés pouvant remplacer ceux pétrosourcés, le sujet de thèse répond aux enjeux et priorités de l'initiative « Maîtrise des Systèmes Technologiques Sûrs et Durables » qui vise à constituer et animer une communauté autour d'une recherche portant sur les systèmes créés par l'Homme et à destination de son propre usage. Le projet de thèse propose une valorisation de la vanilline fonctionnalisée et biosourcée dans le domaine de l'agroécologie/du biocontrôle avec pour objectif la création de systèmes technologiques acceptables économiquement et socialement respectueux de l'environnement et de l'Homme. A terme, la vanilline pourrait être obtenue par valorisation de résidus agricoles assurant une durabilité et une fiabilité du caractère fonctionnel du système technologique proposé, mais également une minimisation des coûts humains et environnementaux sur l'ensemble de son cycle de vie.

Ce projet s'appuie sur des approches interdisciplinaires, voire transdisciplinaires puisqu'il permet le rapprochement et le démarrage de nouvelles collaborations de plusieurs équipes de recherche (GEC /UTC, TIMR/UTC et UCEIV/ULCO) dans les domaines de la chimie et de la biologie sur un projet visant un objectif d'économie circulaire et de développement durable.

- Adams, C.A., Zimmerman, K., Fenstermacher, K., Thompson, M.G., Skyrud, W., Behie, S., Pringle, A., 2020. Fungal Seed Pathogens of Wild Chili Peppers Possess Multiple Mechanisms To Tolerate Capsaicinoids. *Appl Environ Microbiol* 86, e01697-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01697-19>
- Boonchird, C., Flegel, T.W., 1982. In vitro antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Can. J. Microbiol.* 28, 1235–1241. <https://doi.org/10.1139/m82-184>
- Damiens, A., Alebrahim, M.T., Léonard, E., Fayeulle, A., Furman, C., Hilbert, J.-L., Siah, A., Billamboz, M., 2021. Sesamol-based terpenoids as promising bio-sourced crop protection compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Pest Manag Sci* 77, 2403–2414. <https://doi.org/10.1002/ps.6269>
- Fitzgerald, D. J.; Stratford, M.; Gasson, M. J.; Nabad, A. 2004. The Potential Application of Vanillin in Preventing Yeast Spoilage of Soft Drinks and Fruit Juices. *J Food Prot*, 67, 2, 391–395. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.2.391>.
- Espinoza-Acosta, J.L., Torres-Chávez, P., Ramírez-Wong, B., López-Saiz, C., Montaña-Leyva, B., 2016. Antioxidant, Antimicrobial, and Antimutagenic Properties of Technical Lignins and Their Applications. <https://doi.org/10.15376/BIORES.11.2>
- Fayeulle, A., Trudel, E., Damiens, A., Josse, A., Ben Hadj Youssef, N., Vigneron, P., Vayssade, M., Rossi, C., Ceballos, C., 2021. Antimicrobial and antioxidant activities of amines derived from vanillin as potential preservatives: Impact of the substituent chain length and polarity. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 22, 100471. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100471>
- Fitzgerald, D. j., Stratford, M., Gasson, M. j., Ueckert, J., Bos, A., Nabad, A., 2004. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology* 97, 104–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02275.x>
- Lanoue, A., Burlat, V., Henkes, G.J., Koch, I., Schurr, U., Röse, U.S.R., 2010. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytologist* 185, 577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03066.x>
- Ngarmsak, M., Delaquis, P., Toivonen, P., Ngarmsak, T., Ooraikul, B., Mazza, G., 2006. Antimicrobial activity of vanillin against spoilage microorganisms in stored fresh-cut mangoes. *J Food Prot* 69, 1724–1727. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.7.1724>
- Vaz, S., 2018. Biomass and the Green Chemistry Principles, in: Vaz Jr., S. (Ed.), *Biomass and Green Chemistry: Building a Renewable Pathway*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–9. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-66736-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66736-2_1)

## 3) Encadrement

La thèse se déroulera au sein de l'UTC pendant 18 mois/2 ans (MAB, TIMR, UTC et MVB, GEC, UTC) sous la direction du Pr. Yolande Perrin pour l'évaluation biochimique et moléculaire des activités de bioprotection et du Dr Claire Ceballos pour la partie fonctionnalisation de dérivés de vanilline, caractérisation, études structure-activité. Yolande Perrin possède une expertise reconnue en biologie végétale, dont l'adaptation des plantes aux stress (Charrier et al., 2012; Jacques et al., 2020), et interviendra au niveau de l'évaluation biochimique et moléculaire de la bioprotection sur différentes variétés de colza. Le spectre d'activité des composés *in vitro* sur un panel d'agents phytopathogènes et les activités antifongiques *in planta* sur colza seront déterminés sous l'encadrement du Dr Antoine Fayeulle.

Cette thèse sera l'opportunité pour le Dr. Claire Ceballos d'obtenir une 3<sup>ème</sup> thèse en co-direction en vue de la préparation de l'HDR. Notamment en lien avec le projet déposé, Claire Ceballos, chimiste de formation, et Antoine Fayeulle, microbiologiste, étudient depuis 2016 les potentialités de dérivés de la vanilline en tant qu'agents antimicrobiens.

Une troisième partie de 6 mois/un an permettra d'initier une collaboration avec l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) de l'Université du Littoral-Côte d'Opale (ULCO). Les travaux seront réalisés sous l'encadrement scientifique du Dr. Béatrice Randoux et du Dr Maryline Magnin-Robert pour compléter les études d'activités antifongiques sur des agents phytopathogènes du blé *in vitro* et *in planta*, et évaluer leur capacité à induire les défenses du blé.

Charrier, A., Rippa, S., Yu, A., Nguyen, P.-J., Renou, J.-P., Perrin, Y., 2012. The effect of carnitine on Arabidopsis development and recovery in salt stress conditions. *Planta* 235, 123–135. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1499-4>

Jacques, F., Zhao, Y., Kopečná, M., Končítíková, R., Kopečný, D., Rippa, S., Perrin, Y., 2020. Roles for ALDH10 enzymes in  $\gamma$ -butyrobetaine synthesis, seed development, germination, and salt tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 71, 7088–7102. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa394>

Mustafa, G., Khong, N.G., Tisserant, B., Randoux, B., Fontaine, J., Magnin-Robert, M., Reignault, P., Sahraoui, A.L.-H., 2017. Defence mechanisms associated with mycorrhiza-induced resistance in wheat against powdery mildew. *Funct Plant Biol* 44, 443–454. <https://doi.org/10.1071/FP16206>

Ors, M., Randoux, B., Siah, A., Couleaud, G., Maumené, C., Sahmer, K., Reignault, P., Halama, P., Selim, S., 2019. A Plant Nutrient- and Microbial Protein-Based Resistance Inducer Elicits Wheat Cultivar-Dependent Resistance Against *Zymoseptoria tritici*. *Phytopathology* 109, 2033–2045. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-19-0075-R>

#### 4) Le programme de travail avec les livrables et l'échéancier prévisionnel

	Année 1				Année 2				Année 3			
Bibliographie/Veille												
Chimie : Synthèse de dérivés de vanilline Optimisation de synthèse, études de temps, concentration... Relation structure-activité												
Biologie : Tests des molécules in vitro/in vivo												
Rédaction												

Les premiers mois de la première année de thèse seront consacrés à la synthèse et l'optimisation des paramètres réactionnels des dérivés de vanilline. L'étudiant en thèse pourra parallèlement commencer ses évaluations antifongiques sur blé/colza. Les résultats obtenus permettront ensuite de dégager des tendances structure-activité des composés, d'identifier des motifs clés et de proposer ainsi des nouvelles structures de molécules potentiellement plus performantes. Au cours de la 2<sup>ème</sup> année, ces nouvelles molécules pourront être synthétisées et testées.

#### 5) Le profil du candidat recherché

Le candidat recherché aura un diplôme de master ou d'ingénieur, avec des compétences en chimie organique et/ou en culture végétale/microbiologie. Il devra être fortement intéressé par le travail expérimental.