

Séminaire

« Les antifongiques, c'est pas automatique, dans l'agriculture non plus ! ».

« La chimie verte au service du développement de nouveaux stimulateurs de défense de plantes et d'antifongiques pour la santé humaine »

Dr. Alina GHINET

Equipe 7 « Therapeutic Innovation Targeting
Inflammation » du LIRIC (Inserm UMR995)

Laboratoire de Chimie Durable et Santé, HEI Lille

Lille – 18 avril 2018



AVEC LE SOUTIEN DU FONDS EUROPÉEN DE DÉVELOPPEMENT RÉGIONAL
MET STEUN VAN HET EUROPEES FONDS VOOR REGIONALE ONTWIKKELING



Contexte

La France, leader agricole européen ...

... qui cherche des alternatives
pour produire mieux

D'après les chiffres 2013 Eurostat

- de la surface cultivable
(1^{er} rang)
- de la production de ressources agricoles
(1^{er} rang)
- de la quantité de substances actives vendues
(2^{ème} rang)



- Réduction du recours aux produits phytosanitaires
 - ✓ 25 % d'ici à 2020
 - ✓ 25 % supplémentaires à l'horizon 2025
- 30 actions selon 6 axes dont :
 - ✓ Évolution des pratiques agricoles
 - ✓ Amplification de la R&D et de l'innovation
 - ✓ Diminution des répercussions sur
 - la santé humaine
 - l'écosystème



Contexte

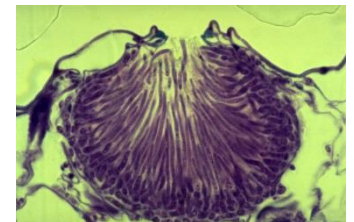
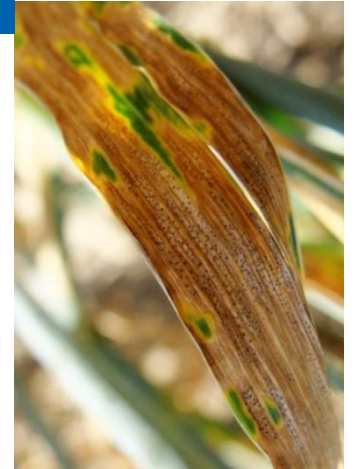
- Septoriose du blé : **maladie N°1** sur la **culture N°1** en France
- Pertes de rendements allant jusqu'à **40 %**
- Lutte basée sur l'utilisation de **fongicides conventionnels**, mais leur utilisation est de plus en plus controversée



- Besoin grandissant de méthodes de lutte alternative
- ✓ Les **stimulateurs de défense des plantes (SDPs)** peuvent être une solution respectueuse de l'environnement et de la santé humaine
- ✓ **SDPs** : biomolécules agissant comme un « **vaccin** » sur la plante contre les bio-agresseurs, sans effet biocide direct



Manque de produits disponibles et efficaces



Stimulateur de Défense des Plantes : définition*



- ✓ Promouvoir un état de **résistance** face à un **stress biotique**
- ✓ Action indirecte sur le bioagresseur
- ✓ Développement de mécanismes de défense par le végétal

Etat actuel du secteur SDP

- ✓ Nombre limité de composés homologués sur le sol français
 - vigne :
 - Bion 50WG® (acibenzolar-S-méthyle)
 - céréales :
 - Iodus 2 Céréales® (laminarine)
 - Bion 50WG® (acibenzolar-S-méthyle)
- ✓ Manque de reproductibilité entre les conditions en serre et les conditions en champ (facteur 1000 environ)



* Définition des SDP, www.elicitra.org

- Projet **Optistim** : « **Optimisation** de l'efficacité de **stimulateurs** de défense des plantes bio-sourcés pour une lutte alternative en protection des cultures »

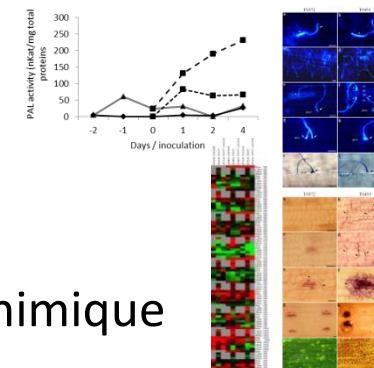
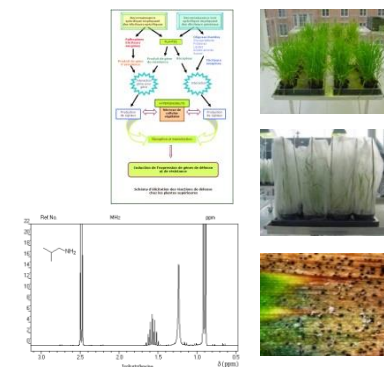
- Durée : **3 ans** (2014 – 2017)

- **Objectifs :**

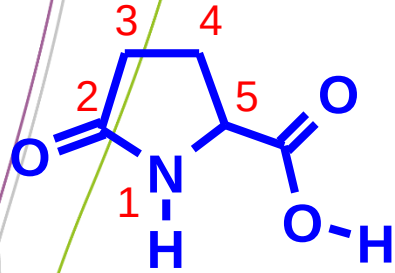
- Rechercher de nouveaux bioproduits efficaces vis-à-vis de la septoriose du blé

- **Travaux réalisés :**

- **Screening** de nouvelles molécules d'origine verte
- **Optimisation** de l'efficacité des molécules par fonctionnalisation chimique



Pyroglutamic acid – the « forgotten » amino acid

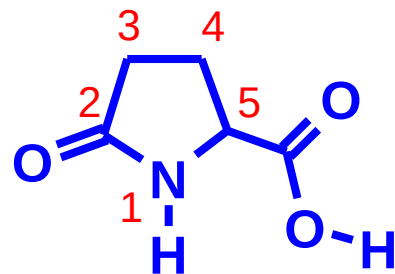


acide pyroglutamique
(PGA ou PCA)



- **Origine naturelle** : constituant de nombreux tissus végétaux et animaux ;
- **Agent de pénétration cellulaire** : vecteur de pénétration transmembranaire ;
- **Agent de protection cellulaire** : salifie les amines protectrices de l'hépatocyte (arginine, bétaine, méthionine...) et préserve les cellules les plus importantes de l'organisme (neurones, cellules hépatiques) de l'action des agents toxiques ou des agressions expérimentales
- **Agent de potentialisation** : PGA et ses dérivés :
 - améliorent l'assimilation et la fixation d'ions minéraux,
 - diminuent l'excitabilité neuro-musculaire (spasmophilie, anxiété)
 - accroissent l'activité des antiseptiques et anesthésiques locaux, etc
- **En chimie** : extrêmement soluble et très facile à utiliser quels que soient le pH, la température, l'hygrométrie, etc ; intermédiaire de synthèse (synthèse peptidique, ...)
- **En cosmétologie** : le sodium pyrrolidone carboxylate (NALIDONE®) constitue l'hydratant naturel de l'épiderme (élément essentiel dans les préparations cutanées ou capillaires)

Le PGA et ses dérivés améliorent les propriétés des substances auxquelles ils sont combinés ; ils favorisent leur pénétration jusqu'à leur site d'action électif et augmente leur activité et leur durée d'action !



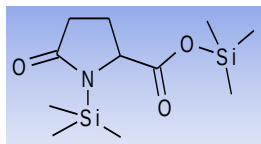
acide pyroglutamique

- Ressource renouvelable issue des mélasses de betterave sucrière - **20 euros/Kg** par 25 Kg
- Présente un centre chiral qui permet de réaliser des synthèses asymétriques ;
- Ses différentes fonctions permettent d'accéder à des structures complexes de type polycycliques ou même à des alcaloïdes ;

Réactivité chimique :

- Les positions **1, 3 et 4** sont nucléophiles ;
- La position **2** est électrophile ;
- La position **5** : réactions possibles avec des électrophiles ou des nucléophiles.

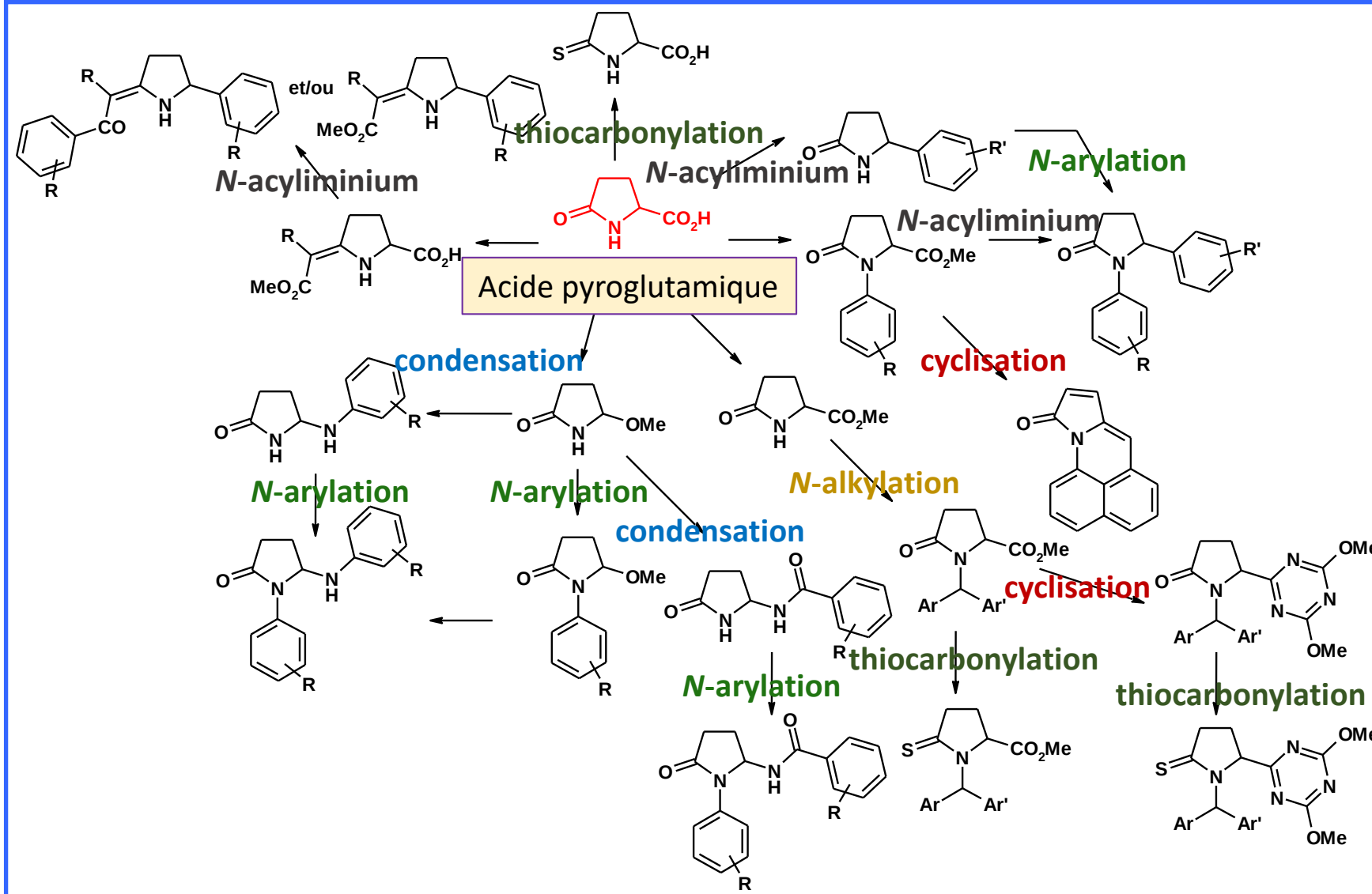
Augmentation de la réactivité chimique des structures grâce à la silylation



'Pyroglutamic acid' tree

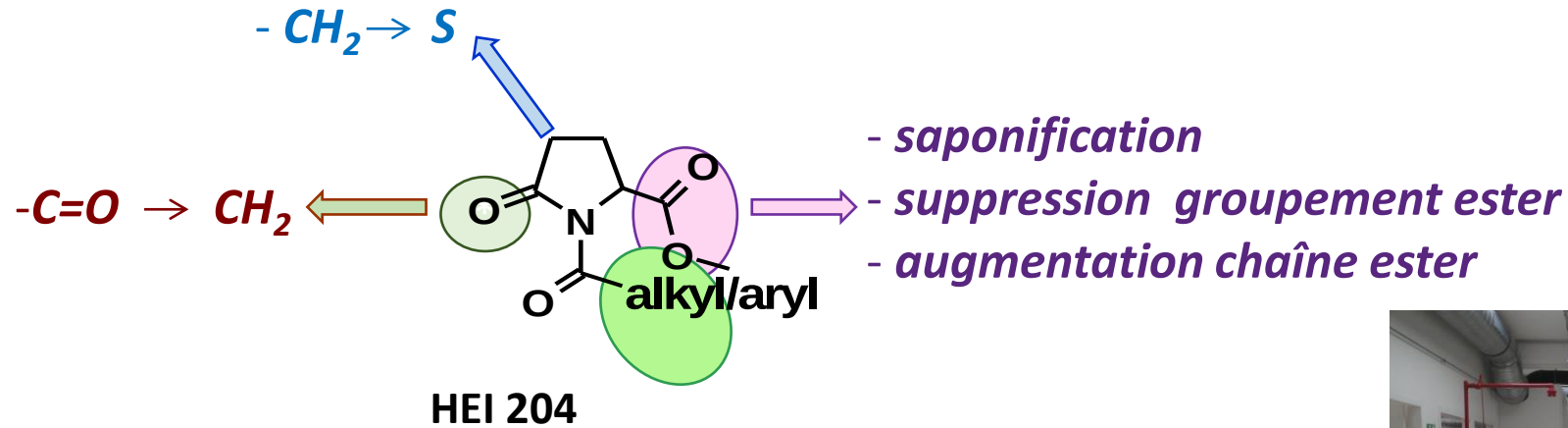


Chimiothèque
3275 molécules HEI



- Synthèses maîtrisées à l'échelle de la centaine de grammes
- Matière première renouvelable

- HEI : Conception et synthèse de nouvelles molécules à partir d'un composé identifié



Mélasse de
betterave sucrière



- longueur de chaîne*
- chaîne cyclique*
- ramification chaîne*
- introduction autres groupements*

52 nouveaux produits synthétisés et caractérisés

- matière première renouvelable
- réactifs peu coûteux
- synthèses mono- ou di-étape
- très bons rendements
- échelle de dizaine de grammes



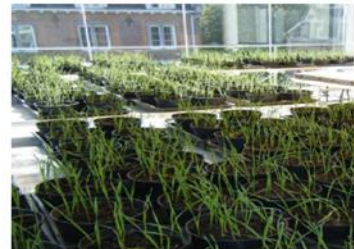
- ISA : Screening des 52 molécules HEI pour leurs propriétés stimulatrices des défenses des plantes et de 6 molécules citées dans la littérature (GABA, AABA, ABA, MEJ, SA et Saccharine).

Pour chaque SDP :

Evaluation de
l'effet biocide
direct (*in vitro*)



Evaluation du niveau
d'efficacité de protection
(*in planta*, serre)



→ Découverte de SDPs



Amélioration de l'activité de protection par
fonctionnalisation

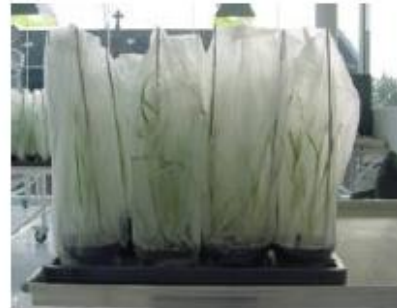
- ISA : Screening des 52 molécules HEI pour leurs propriétés stimulatrices des défenses des plantes et de 6 molécules citées dans la littérature (GABA, AABA, ABA, MEJ, SA et Saccharine).

Méthodologie



Culture de blé en serre :
18°C / Photopériode 16h/8h

Traitement à 48h
avant inoculation



Inoculation à 4^{ème} feuille émergente
Sacs transparents pendant 4 jours



Notation des symptômes sporulant
à 21 jours post-inoculation

- **ISA** : **Screening** des **52 molécules HEI** pour leurs propriétés stimulatrices des défenses des plantes et de **6 molécules citées dans la littérature** (GABA, AABA, ABA, MEJ, SA et Saccharine).

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes séries et molécules testées

HEI 205	HEI 2474	SA		HEI 2506	HEI 2579	HEI 2507
HEI 453	HEI 2475	SACC	HEI 2501	HEI 2519	HEI 2598	HEI 308
HEI 461	HEI 2478	MEJ	HEI 2529	HEI 2507	HEI 2577	HEI 2599
HEI 830	HEI 2484	AABA	HEI 2517	HEI 2498		HEI 2474
HEI 2425	HEI 2486	HEI 204	HEI 2515	HEI 2474	HEI 2504	HEI 2493
HEI 2430	HEI 2487	HEI 206	HEI 2518	HEI 2516	HEI 2508	HEI 2528
HEI 2434	HEI 2488	HEI 457	HEI 2527	HEI 2578	HEI 1521	HEI 2503
HEI 2435	HEI 2489	BABA	HEI 2533	HEI 2597	HEI 2514	HEI 138
HEI 2472	HEI 2473	GABA	HEI 2497	HEI 2594	HEI 2490	HEI 2650

- **38 molécules efficaces / 58 testées**
- **taux d'efficacité de 15 à 71 %**
- **choix de molécules pour la suite de travaux**
- **5 molécules > 50 % efficacité**

Evaluation de la toxicité des composés synthétisés

Meilleures molécules testées pour leur toxicité



Cytotoxicité *in vitro* (Organ Tox Panel)

Sur cibles non spécifiques

13 lignées de 7 tissus humains, du rat et de la souris
représentatifs de l'ensemble des organes

Toxicité *in vitro* (SafetyScreen44)

sur cibles directes humaines, de rats et de souris

- enzymes
- transporteurs
- récepteurs nucléaires
- canaux ioniques

-récepteurs couplés aux protéines G

cibles associées à des conséquences symptomatiques

Caractère innovant

- Molécules nouvelles pour leur utilisation comme éliciteurs et issues de la biomasse ;
- Ne présentent pas d'activité biocide directe ;
- Peu de produits sont reconnus comme éliciteurs et ceux commercialisés n'ont qu'une faible activité.

<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
<i>Molécules élicitrices biosourcées</i>	<i>Non directement issues de la biomasse</i>
<i>Synthèse facile et peu chère</i>	

Degré de maturité de la technologie et verrous technologiques

- Utilisation des grilles TRL (Technology Readiness Level) SATTNORD
- **TRL actuel : 4.** Essais en environnement de laboratoire
- **TRL de fin de projet : 7.** Molécule optimisée testée en conditions proches du réel (essai en plein champs)

TRL	Définition	Description
4	Validation de composants et/ou de maquettes en laboratoire.	Des composants technologiques de base sont intégrés de façon à vérifier leur aptitude à fonctionner ensemble. La représentativité est relativement faible si l'on se réfère au système final. Les exemples incluent l'intégration en laboratoire d'éléments ad hoc.
7	Démonstration d'un prototype du système dans un environnement opérationnel.	Prototype conforme au système opérationnel, ou très proche. Ce TRL représente un saut important, exigeant la démonstration d'un prototype du système réel dans son environnement opérationnel (par exemple dans un avion, dans un véhicule, dans l'espace).

Prochaine étape ?

- ***Resynthèse grande échelle éliciteurs les plus actifs*** pour essais biologiques supplémentaires, formes hydrosolubles (scale-up) (HEI)
- ***Optimisation dose et formulation*** (ISA)
- ***Optimisation délai avant traitement afin de déterminer le positionnement de la première application*** (ISA)
- ***Evaluation de la durée de protection afin de déterminer la cadence des traitements*** (ISA)
- ***Effet de l'application racinaire vs foliaire*** (ISA)
- ***Elucider le mode d'action via les collaborations avec les physiopathologistes*** (ULCO)
- ***Evaluation de l'effet variétal (génotypes du blé) sur l'efficacité des produits*** (ULCO)



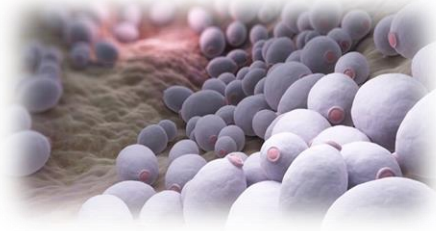
Valorisation d'autres bioressources

Quid des produits biofongicides ?

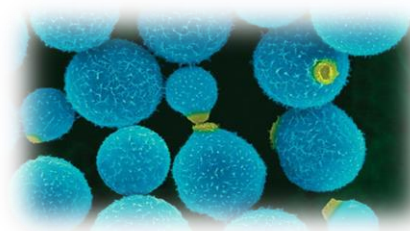
Tests d'action directe sur les pathogènes

- A l'issue du screening d'activité directe sur le pathogène, nous obtenons trois groupes de composés :
 - Aucune activité directe → tests de stimulation de défense de plantes et toxicité
 - Activités modérées → valorisation par publication
 - Activités antifongiques fortes → **BIOFONGICIDES**
- Dans ce cas, nous proposons à nos collègues biologistes d'évaluer ces composés sur des pathogènes humains : *S. aureus*, *A. baumannii*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*... pathogènes pour lesquels des souches multirésistantes et un besoin urgent d'alternatives médicamenteuses existent**

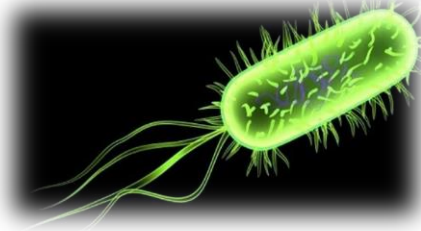
5 pathogènes clés ESKAPE et 2 champignons testés !



Candida albicans



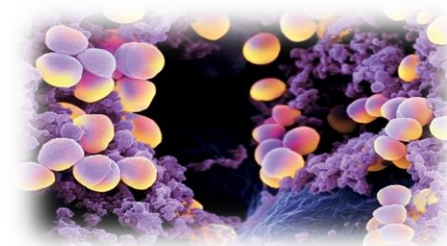
Cryptococcus neoformans



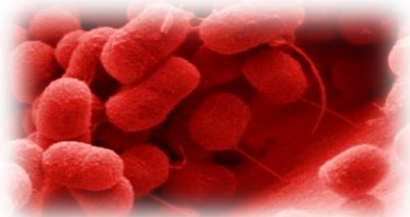
Escherichia coli



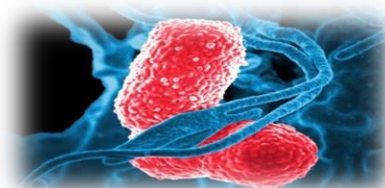
THE UNIVERSITY
OF QUEENSLAND
AUSTRALIA



Staphylococcus aureus



Acinetobacter baumannii



Klebsiella pneumoniae



Pseudomonas aeruginosa

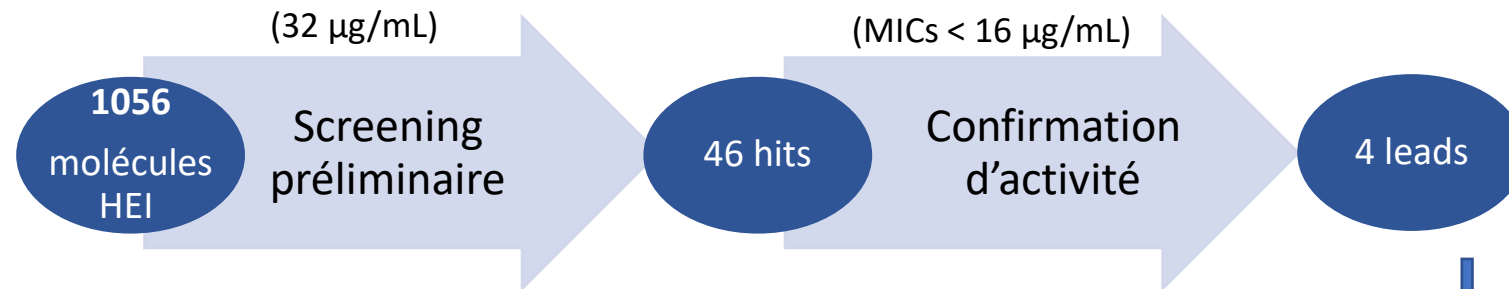


Community for Open
Antimicrobial Drug Discovery

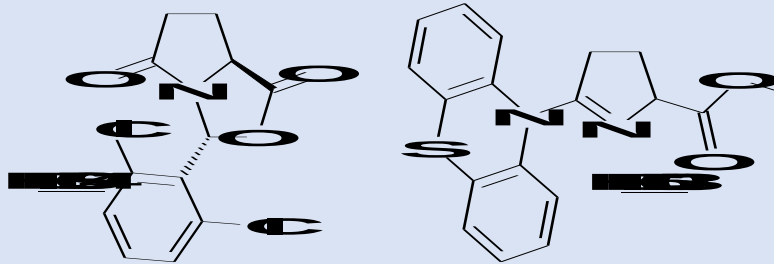
Screening chimiothèque par le CO-ADD



5 Millions de A\$ de subventions
Screening de chimiothèques



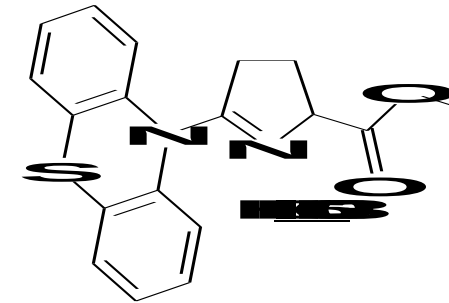
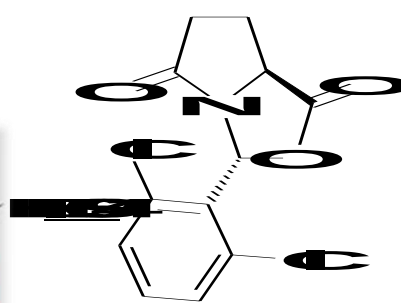
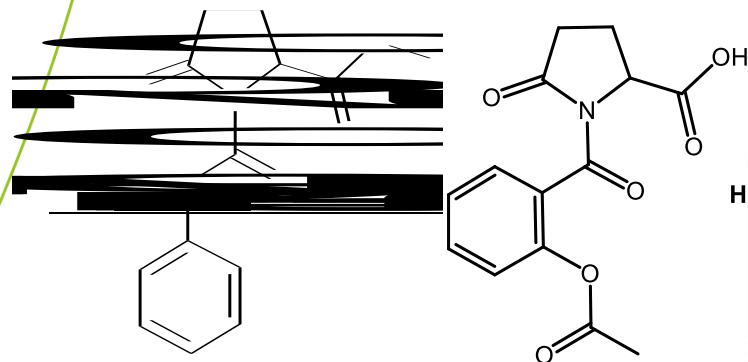
- spécifique *C. neoformans* (81 %)



- spécifique *C. albicans* (90 %)

Santé des plantes

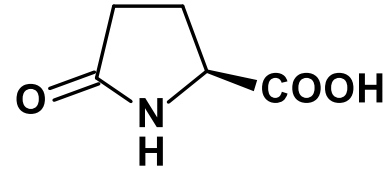
Santé humaine



Necrosis with pycnidia



Conclusions



Nouveaux composés biosourcés
SDP et/ou antifongiques



Utilisables en
santé des plantes

Utilisables en
santé humaine

