



HAL
open science

Étude du mode d'action de la radulanine A, une molécule phytotoxique d'origine naturelle

Simon Thuillier

► **To cite this version:**

Simon Thuillier. Étude du mode d'action de la radulanine A, une molécule phytotoxique d'origine naturelle. Biologie végétale. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT: 2023SORUS318. tel-04318019

HAL Id: tel-04318019

<https://theses.hal.science/tel-04318019>

Submitted on 1 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Sorbonne Université

ED515 – Complexité du vivant

Laboratoire de Biologie du Développement (UMR7622)

Laboratoire de Synthèse Organique (UMR 7652)

Etude du mode d'action de la radulanine A, une molécule phytotoxique d'origine naturelle

Présentée par

Thuillier Simon

Thèse de doctorat en Physiologie Végétale

Dirigée par

Emmanuel Baudouin et Bastien Nay

Présentée et soutenue publiquement le 2 octobre 2023

Devant un jury composé de :

M. François-Didier Boyer	CR, CNRS, Université Paris-Saclay	Rapporteur
M. Michel Havaux	DR, CEA, Université Aix Marseille	Rapporteur
M. Pierre Carol	Professeur, Sorbonne Université	Examineur
Mme. Soizic Prado	Professeure, MNHN	Examinatrice
M. Emmanuel Baudouin	MCF, Sorbonne Université	Directeur de thèse
M. Bastien Nay	DR, Ecole Polytechnique	Directeur de thèse



Remerciements

« Jamais, je ferai de longues études et jamais, ja-mais, j'irai étudier à Paris »

Simon, en sortie du lycée

Il y a maintenant trois ans, la boussole indiquait le doctorat alors que mes yeux étaient rivés sur une destination loin des études, vers la jungle et les tropiques. La curiosité est un joli défaut que j'emporte depuis le DUT, et qui m'a mené à embarquer en direction de la thèse.

En navigant dans ses eaux troubles, j'ai pu compter sur les phares qu'auront été mes directeurs de thèse. Malgré le brouillard, ils ont su me guider et être présents, avec rigueur, patience, et bienveillance. Emmanuel, Bastien, merci sincèrement pour votre accompagnement tout au long de cette aventure. Je saisis l'importance du temps que vous m'avez dédié, et des discussions que nous avons partagées. J'en emporterai les leçons apprises au cours de mes prochaines aventures, et espère y faire honneur. Merci sincèrement.

Merci à Benjamin, sans qui cette thèse aurait pris une tout autre direction. Merci pour ta bienveillance, ta pédagogie, et pour m'avoir permis d'étudier la photosynthèse à l'IBPC. Stefania, merci beaucoup pour m'avoir accueilli à l'ICL, pour ta gentillesse, et pour avoir permis la découverte majeure de ma thèse. Merci à vous deux pour votre enthousiasme face aux résultats obtenus.

Je remercie également l'ensemble du jury, particulièrement mes rapporteurs M. Boyer et M. Havaux, pour avoir évalué le trajet de mon navire et son journal de bord. La discussion et les remarques pertinentes auront permis d'enrichir la qualité scientifique de ce manuscrit. Merci pour le temps que vous avez accepté de consacrer à ce travail pluridisciplinaire.

Si la thèse n'est pas un long fleuve tranquille, avoir un bel équipage rend pour sûr le voyage plus agréable. Bruce, mon acolyte de la chimie organique, merci à toi pour toutes ces heures de discussion, de rire et de musique pendant notre travail de synthèse à l'X. Mes collègues du laboratoire Biologie des Semences, merci à vous pour votre bienveillance, vos sourires et votre soutien pour le chimiste que je suis durant ces trois années. Merci à Nicole la cheffe, sans qui le laboratoire ne serait pas ce qu'il est. Baptiste, Jonas, l'histoire d'un biologiste, d'un chimiste et d'un physicien dans un bureau est maintenant complète, avec un trio de docteurs flamboyants en fin de récit. A nos rires, notre porte bleue, et notre carnet de chanson qui auront égayé ces journées tout au long du voyage. Baptiste, merci pour ces péripéties martiales chez toi, ta bonne humeur et ton esprit bleu métal. Jonas, merci pour tous ces moments précieux que nous avons partagés, pour ces fous rires, et pour qui tu es. Félix, mon ami collègue, merci pour le Rétifest et ton soutien à la pique toujours bien placée pendant

la rédaction. Je te souhaite le meilleur pour les dernières années de ton aventure, et la future présidence de l'IDPA **wink**.

L'IDPA, l'association des doctorants et post-doctorants de l'IBPS aura également été un port d'attache sur ces eaux doctorales. Je remercie sincèrement toutes les personnes ayant fait partie de l'équipe avec laquelle nous avons pu, je l'espère, faire honneur à cette association et ses aspirations. A nos soirées endiablées, nos sessions Pizz'of Science, à cette belle fête de la Science (mention spéciale pour le super volcan) et à notre retraite scientifique qui aura été un bel événement. La relève est là, et espérons qu'elle dure. Longue vie à l'IDPA !

Au cœur de la tempête, les moussaillons de la mousse, mes amis du Brainstorm, auront été ma plus grande bénédiction durant ces trois années. A cette soirée où le Brainstorm est né autour d'une porte, d'une passerelle et d'un verre à refaire la science. A nos nombreuses aventures aux Arènes, à la BâB, à l'ENS et surtout au B2B qui restera dans notre cœur à tout jamais. Toutes ces aventures, ces rires, ces chansons ; les mots me manquent pour décrire à quel point tout cela est précieux pour moi. Ainsi je citerai la Légende de l'IBPS et vous dirai d'une manière aussi simple qu'elle est riche en sens : « Merci ».

A toutes ces magnifiques rencontres de la Cité Internationale, du CSDV et de Safe Point Paris, je suis chanceux d'avoir pu vous avoir dans ma vie ces trois dernières années. Lorsque je regarde derrière moi, je me sens vraiment béni d'avoir fait un bout de chemin avec chacun d'entre vous.

A Simon, aka SGB, merci pour toutes ces séances de sport, ces discussions sur la vie et ces nombreuses heures de rédaction passées ensemble sur la fin de la thèse. On se revoit bientôt Dr. toçayo.

A Agnès, Agathe, Cuong, et Jonas, mes amis vous avez été l'âme de ce voyage et m'avez permis de maintenir ce navire à flot. A nos nombreuses virées en France et au-delà, et à l'éternel Jumpy le meilleur moyen de locomotion (à part Jonas l'ambulance, big up à la Bonne Blanquette). A nos périple au ski, au Jura, à Chinon, à Amsterdam, en Creuse (mais c'était pas la Creuse), et à tous les autres chapitres de notre épopée. J'attends déjà la prochaine occasion de naviguer à nouveau ensemble et d'écrire d'aussi belles histoires.

A tous ceux avec qui j'ai partagé un bout de périple avant la thèse, à Wendy et Elodie, au Clan, à la Colloc, à la Corocampagne, à Arthur, à Tho-mas, à Axel l'aventurier dissident, et à Antoine mon ami de toujours, merci d'avoir toujours été là même lorsque la distance nous éloignait. Vous avez toujours été proches du cœur, même lorsque les yeux étaient loin. Merci d'avoir fait partie de ma vie.

Pour finir je remercie ma famille, ma mère, mon père, Séverine, Anatyka et Eythan. Merci papa, pour m'avoir toujours soutenu au cours de mes études, tout en m'aiguillant vers la meilleure direction. Séverine, merci beaucoup pour la gare et les Teletubbies ; merci d'avoir été présente pour moi aussi tôt que je puisse m'en souvenir. Maman, dans les meilleurs moments comme dans les pires tu as toujours été là, quoique la vie ait pu poser sur notre chemin, et m'as toujours soutenu dans mes choix. Merci pour tout, vraiment.

J'ai dû être né sous une bonne étoile par-delà l'orage pour avoir une telle chance ; pour vous avoir eu vous tous. La boussole pointe désormais vers ce voyage dont je rêvais tant. J'emporte les souvenirs de ces années incroyables dans la cale et espère que l'avenir me permettra d'en construire de nouveaux à vos côtés à toutes et tous. Merci.



Hic sunt dracones.

Sommaire

Table des Illustrations	4
Table des Tableaux.....	6
Liste des abréviations.....	7
Correspondance des numérotations entre le chapitre I et le chapitre II.....	9
Introduction générale	11
I Molécules d'origine naturelle et phytotoxicité.....	11
<i>I.1 Les métabolites spécialisés, des composés naturels aux rôles multiples</i>	<i>11</i>
<i>I.2 Métabolites secondaires phytotoxiques et allélopathie</i>	<i>12</i>
II Facteurs modulant l'activité phytotoxique.....	14
<i>II.1 Interactions au sein de la rhizosphère et de la phyllosphère</i>	<i>15</i>
<i>II.2 Caractéristiques de la plante cible</i>	<i>16</i>
<i>II.3 Pénétration au niveau racinaire et foliaire</i>	<i>16</i>
<i>II.4 Translocation au sein de la plante</i>	<i>18</i>
<i>II.5 Métabolisation, conjugaison et séquestration</i>	<i>19</i>
III Principaux modes d'action des composés phytotoxiques	21
<i>III.1 Effets sur la photosynthèse.....</i>	<i>22</i>
<i>III.2 Phosphorylation oxydative</i>	<i>28</i>
<i>III.3 Biosynthèse des acides aminés</i>	<i>30</i>
<i>III.4 Biosynthèse de la paroi cellulaire</i>	<i>32</i>
<i>III.5 Biosynthèse des lipides</i>	<i>33</i>
<i>III.6 Perturbation des membranes plasmiques</i>	<i>35</i>
<i>III.7 Autres modes d'action</i>	<i>36</i>
IV Les bryophytes en tant que source de molécules bioactives	37
<i>IV.1 Plasticité des bryophytes</i>	<i>37</i>
<i>IV.2 Métabolites spécialisés bioactifs des bryophytes</i>	<i>38</i>
<i>IV.3 Les hépatiques, des sources de métabolites spécialisés originaux.</i>	<i>40</i>

IV.4	<i>Les hépatiques du genre Radula</i>	44
V	Structures et propriétés des radulanines et de leurs analogues structuraux	46
VI	Objectifs du projet de thèse	51
Chapitre I : Synthèse totale de la radulanine A et d'analogues structuraux		53
I	Historique et mise en contexte	53
I.1	<i>Historique des procédés de synthèse totale</i>	53
I.2	<i>Contexte et objectifs de l'étude</i>	58
II	Article : A total synthesis of phytotoxic radulanin A facilitated by the photochemical ring expansion of a 2,2-dimethylchromene in flow	60
III	Supplementary Material	67
IV	Résultats & discussion complémentaires	87
Chapitre II : Etude de l'impact de la radulanine A et de certains de ses analogues structuraux sur la photosynthèse		94
I	Contexte et objectifs de l'étude	94
II	Article : Mode of action of the natural herbicide radulanin A as an inhibitor of photosystem	
II.	95	
III	Supplementary Figures	125
IV	Supplementary Material	130
Chapitre III : Etude de l'impact du Radula chromène sur le métabolome d'Arabidopsis		136
I	Introduction	136
II	Etablissement et validation des conditions de culture et de traitement des plantules	137
III	Analyse globale des métabolites identifiés dans les plantules d'Arabidopsis	140
IV	Modifications du métabolome induites par le Radula chromène	143
IV.1	<i>Effet du Radula chromène sur l'intégrité membranaire</i>	154
IV.2	<i>Effet du Radula chromène sur l'activité de la xanthine oxydase, impliquée dans le métabolisme des purines.</i>	155
V	Discussion	158

Conclusion et perspectives	163
Matériel et Méthodes	170
I Synthèse totale de la radulanine A et synthèse d’analogues structuraux	170
II Matériel végétal	170
III Stérilisation des graines	171
IV Culture et traitement de plantules	171
V Mesure de la fluorescence des chlorophylles.	172
VI Mesure de l’état rédox du photosystème I (P700).	173
VII Mesure de la thermoluminescence.....	174
VIII Analyse des métabolites primaires par GC-MS	174
<i>VIII.1 Extraction des métabolites primaires</i>	<i>174</i>
<i>VIII.2 Dérivation des échantillons et analyse GC-MS</i>	<i>174</i>
<i>VIII.3 Traitement des données et quantification</i>	<i>175</i>
<i>VIII.4 Analyses de données.....</i>	<i>176</i>
<i>VIII.5 Analyses statistiques.....</i>	<i>176</i>
IX Mesures de fuite d’électrolytes	177
X Mesure de l’activité xanthine oxydase.....	178
Annexes	179
Annexe 1. Relation entre la structure de la radulanine A et sa phytotoxicité	179
Annexe 2. Information sur les techniques utilisées pour l’étude de l’impact des molécules phytotoxiques sur la photosynthèse du chapitre II	180
Annexe 3. Phytotoxicité du Radula chromène sur <i>Marchantia polymorpha</i>.....	183
Annexe 4. Tableau des données métabolomiques	184
Bibliographie.....	191
Production scientifique	212

Table des Illustrations

FIGURE 1 : SCHEMA SYNTHETISANT LES DIFFERENTES VOIES D'ALLELOPATHIE DIRECTE VIA L'EXEMPLE DE LA JUGLONE	13
FIGURE 2 : SCHEMA DE LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE	18
FIGURE 3 : SCHEMA DU TRANSPORT D'HERBICIDE SYSTEMIQUE.....	19
FIGURE 4 : BIOSYNTHESE ET METABOLISATION DES BENZOINOÏDES AU SEIN D'UNE CELLULE VEGETALE (ADAPTE DE WOUTERS ET AL., 2016)	21
FIGURE 5 : SCHEMA DE LA CHAINE DE TRANSFERT D'ELECTRON PHOTOSYNTHETIQUE.....	23
FIGURE 6 : EXEMPLES DE STRUCTURES D'INHIBITEURS DU PHOTOSYSTEME I	26
FIGURE 7 : EXEMPLES DE STRUCTURES D'INHIBITEURS DE L'HYDROXYPHENYLPIRUVATE DIOXYGENASE (HPPD).....	26
FIGURE 8 : SCHEMA DES VOIES DE BIOSYNTHESE DE LA PLASTOQUINONE, DES CAROTENOÏDES ET DES TOCOPHEROLS (ADAPTE DE HE ET AL., 2022).....	28
FIGURE 9 : COMPARAISON DE LA STRUCTURE DE LA PLASTOQUINONE ET DE L'UBIQUINONE	29
FIGURE 10 : EXEMPLES DE SITES D'ACTION AFFECTES PAR DES MOLECULES NATURELLES AU SEIN DE LA MITOCHONDRIE CHEZ LES PLANTES (ADAPTE DE ISHII-IWAMOTO ET AL., 2006)	29
FIGURE 11 : EXEMPLES DE STRUCTURES D'INHIBITEURS DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES	32
FIGURE 12 : EXEMPLES DE STRUCTURES D'INHIBITEURS DE LA BIOSYNTHESE DE LA CELLULOSE.....	33
FIGURE 13 : VUE D'ENSEMBLE DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES GRAS. LES ENZYMES CIBLEES PAR DES MOLECULES PHYTOTOXIQUES SONT REPRESENTEES EN ORANGE. (ADAPTE DE CAMPE ET AL., 2018).....	34
FIGURE 14 : : EXEMPLES DE STRUCTURES D'INHIBITEURS DE LA BIOSYNTHESE DES LIPIDES	35
FIGURE 15 : STRUCTURE DES CERAMIDES	35
FIGURE 16 : EXEMPLES DE STRUCTURES DE MOLECULES PERTURBATRICES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE.....	36
FIGURE 17 : STRUCTURES DE MOLECULES ALLELOPATHIQUES IDENTIFIEES CHEZ LES BRYOPHYTES	40
FIGURE 18 : STRUCTURES DE METABOLITES SPECIALISES ORIGINAUX IDENTIFIES CHEZ LES HEPATIQUES.....	42
FIGURE 19 : EXEMPLES DE BIS-BENZYLES PRESENTS CHEZ LES HEPATIQUES	42
FIGURE 20 : REPARTITION ET COMPOSITION CHIMIQUE DES OLEOCORPS DANS LES DIFFERENTS GENRES D'HEPATIQUES (ADAPTE DE ROMANI ET AL. 2022). LE GENRE RADULA EST ENCADRE EN ROUGE.	43
FIGURE 21 : STRUCTURE DES DIFFERENTES RADULANINES IDENTIFIEES CHEZ RADULA SP.	46
FIGURE 22 : MISE EN EVIDENCE DE LA PHYTOTOXICITE DE LA RADULANINE A (ADAPTEE DE ZHANG ET AL., 2019).....	48
FIGURE 23 : EXEMPLES DE STRUCTURES BENZOXPINES OU BENZOXPANES	49
FIGURE 24 : EXEMPLES DE MOLECULES BIBENZYLPHENOLIQUES ET CHROMENES.....	50
FIGURE 25 : TECHNIQUES UTILISEES POUR LA SYNTHESE DU CYCLE 2,5-DIHYDROBENZOXPINES DE LA RADULANINE A (1).....	53
FIGURE 27 : STRUCTURES DES COMPOSES NATURELS SYNTHETISES PAR STEFANOVIC ET SNIIECKUS	54
FIGURE 28 : VOIE DE SYNTHESE DEVELOPEE PAR STEFINOVIC ET SNIIECKUS, UTILISANT UNE METATHESE D'OLEFINE PAR CATALYSEUR GRUBBS II.....	55
FIGURE 29 : RADULANINES SYNTHETISEES PAR YOSHIDA ET AL.....	55
FIGURE 30 : PRINCIPE DE LA REACTION DE MITSUNOBU.....	56

FIGURE 31 : VOIE DE SYNTHÈSE DÉVELOPPÉE PAR YAMAGUCHI ET AL., UTILISANT UNE RÉACTION DE MITSUNOBU	57
FIGURE 32 : REARRANGEMENT RETRO-CLAISEN	57
FIGURE 33 : VOIE DE SYNTHÈSE DE ZHANG ET AL., UTILISANT UN REARRANGEMENT DE RETRO-CLAISEN.....	58
FIGURE 34 : COMPOSÉS SUPPLÉMENTAIRES SYNTHÉTISÉS.....	87
FIGURE 35 : SYNTHÈSE DES CHROMÈNES SUPPLÉMENTAIRES ISSUS DE LA RÉACTION DE CONDENSATION.....	88
FIGURE 36 : SYNTHÈSE D'ANALOGUES STRUCTURAUX SUPPLÉMENTAIRES POUR L'ÉTUDE DE PHYTOTOXICITÉ	89
FIGURE 37 : STRATÉGIE DE SYNTHÈSE DE NGUYEN ET AL.	90
FIGURE 38 : COMPARAISON DE LA DIHYDROPINOSYLVINE À UN PRÉCURSEUR BIOSYNTHÉTIQUE DE PHYTOCANNABINOÏDES, L'OLIVÉTOLE	93
FIGURE 39 : VALIDATION DE L'EFFET PHYTOTOXIQUE DU RADULA CHROMÈNE ET DE LA RADULANINE A.	138
FIGURE 40 : PRÉSENTATION SYNTHÉTIQUE DE L'ANALYSE MÉTABOLOMIQUE RÉALISÉE.....	139
FIGURE 41 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (PCA) DE L'ABONDANCE DES MÉTABOLITES EN RÉPONSE AU TRAITEMENT PAR LE RADULA CHROMÈNE.	144
FIGURE 42 : VUE D'ENSEMBLE DE L'EFFET DU RADULA CHROMÈNE SUR L'ABONDANCE DES MÉTABOLITES IDENTIFIÉS.	147
FIGURE 43 : REGROUPEMENT HIERARCHIQUE DES MÉTABOLITES EN FONCTION DE LA NATURE DU TRAITEMENT.....	150
FIGURE 44 : REGROUPEMENT HIERARCHIQUE DES MÉTABOLITES EN FONCTION DE LA DURÉE ET DE LA NATURE DU TRAITEMENT.	151
FIGURE 45 : PRINCIPAUX PROCESSUS MÉTABOLIQUES AFFECTÉS PAR LE RADULA CHROMÈNE.	152
FIGURE 46 : EFFET DU RADULA CHROMÈNE SUR L'ABONDANCE DES ACIDES GRAS.	153
FIGURE 47 : EFFET DU RADULA CHROMÈNE SUR L'INTÉGRITÉ MEMBRANAIRE	155
FIGURE 48 : EFFET DU RADULA CHROMÈNE SUR L'ABONDANCE DES MÉTABOLITES DE LA VOIE DE CATABOLISME DES PURINES.....	156
FIGURE 49 : STRUCTURE DE L'EUPATORIOCHROMÈNE ET LE RADULA CHROMÈNE.	157
FIGURE 50 : EFFET DU RADULA CHROMÈNE SUR L'ACTIVITÉ XANTHINE OXYDASE MESURÉE <i>IN VITRO</i>	157
FIGURE 51 : RÉCAPITULATIF DES TRAVAUX DE SYNTHÈSE TOTALE DU RADULA CHROMÈNE ET DE LA RADULANINE A.....	164

Table des Tableaux

TABLEAU 1 : EFFETS BIOLOGIQUES DE MOLECULES ISSUES DES BRYOPHYTES EN FONCTION DE LEUR STRUCTURE CHIMIQUE (ADAPTE DE DZIWAK ET AL., 2022)	38
TABLEAU 2 : COMPOSES PHYTOXIQUES ISSUS DE BRYOPHYTES (ADAPTE DE WHITEHEAD ET AL., 2018).....	39
TABLEAU 3 : REPARTITION DES RADULANINES AU SEIN DES RADULAE	47
TABLEAU 4 : RECAPITULATIF DES SYNTHESSES TOTALES PUBLIEES DE LA RADULANINE A.....	90
TABLEAU 5 : LISTE DES 98 METABOLITES DETECTES PAR L'ANALYSE METABOLOMIQUE.....	141
TABLEAU 6 : PRINCIPAUX PROCESSUS METABOLIQUES INTEGRANT LES METABOLITES IDENTIFIES.	142
TABLEAU 7 : EFFET DU RADULA CHROMENE SUR L'ABONDANCE DES METABOLITES IDENTIFIES.	145
TABLEAU 8 : LISTE DES METABOLITES DONT L'ABONDANCE EST MODIFIEE DE MANIERE SIGNIFICATIVE EN REPONSE AU RADULA CHROMENE.	148

Liste des abréviations

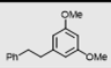
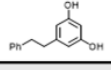
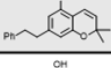
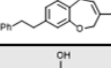
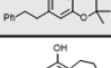
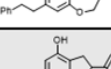
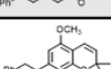
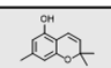
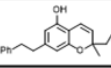
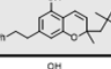
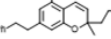

La liste ci-dessous contient les abréviations utilisées hors-articles. Les termes en anglais sont en italique.

Acronyme	Définition
ABC	Cassette liant l'ATP (<i>ATP-binding cassette</i>)
ACP	Protéine porteuse d'acyle (<i>acyl carrier protein</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
ALS	Acétolactate synthase
ATP	Adénine triphosphate
CaM	Calmoduline
CESA	CELLULOSE SYNTHASE A
CSC	Complexe cellulose-synthase
DCM	Dichlorométhane
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
DEAD	Azodicarboxylate de diéthyle
DIBOA	2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazinone
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DXS	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase
EDDA	Acide éthylènediaminediacétique
EPSPS	5-Énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
FAS	Acide gras synthase (<i>fatty acid synthase</i>)
FAT	Acide gras thioestérase (<i>fatty acid thioesterase</i>)
FLP	Paire frustrée de Lewis (<i>frustrated lewis pair</i>)
GC	Chromatographie phase gazeuse
GS	Glutamine synthase
HPLC	Chromatographie phase liquide haute pression
HPPD	4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase
HRAC	Comité d'action sur la résistance aux herbicides (<i>Herbicide resistance action committee</i>)
HST	homogentisate solanésyltransférase
<i>K_{ow}</i>	Coefficient octanol-eau
LC	Chromatographie liquide
LED	Diode émettrice de lumière (<i>Light emitting diode</i>)

LHC	Antenne collectrice de lumière (<i>Light-harvesting complex</i>)
MBOA	6-méthoxy-2-benzoxazolinone
MOM	méthoxyméthyl
MS	Spectrométrie de masse
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
PCA	Analyse en composante principal (<i>principal component analysis</i>)
PDS	Phytoène désaturase
PMM	Plateforme Métabolique-Métabolome
PPO	Protoporphyrinogène oxydase
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Espèce réactive de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
RubisCo	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
TBAF	Fluorure de tétra-n-butylammonium
THC	Δ^9 -tétrahydrocannabinol
THF	Tétrahydrofurane
THP	Tétrahydropyranyl
TMEDA	Tétraméthyléthylènediamine
TOF	Temps de vol (Time of flight)
TSCF	<i>Transpiration Stream Concentration Factor</i>
UQ	Ubiquinone
UV	Ultra-violet
VLCFA	Acide gras à très longue chaîne
XDH	Xanthine déshydrogénase
XO	Xanthine oxygénase

Correspondance des numérotations entre le chapitre I et le chapitre II

Les chapitres I et II contiennent chacun un article publié. Ainsi, ces chapitres reprennent la numérotation des molécules issue de leur article correspondant. Les numérotations utilisées pour chaque article/chapitre sont présentées ci-dessous.

Nom utilisé	Structures	Chapitre I Synthèse totale	Chapitre II Photosynthèse
-		16	1
Dihydropinosylvine		17	2
Radula chromène		3	3
Radulanine A		1	4
-		-	7
-		-	8
Tylimanthine B		19	5
Chromène O-méthylé		-	6
-		8	9
-		-	10
-		-	11
-		-	12

Introduction générale

I Molécules d'origine naturelle et phytotoxicité.

I.1 Les métabolites spécialisés, des composés naturels aux rôles multiples

Le métabolisme des plantes, et plus généralement de tout organisme vivant, assure l'ensemble des fonctions vitales à l'organisme. D'un côté, le métabolisme dit primaire regroupe les métabolites nécessaires à la constitution et au fonctionnement des cellules. Les sucres, acides gras, bases nucléiques, et acides aminés font partie de ce métabolisme. Ils participent à la constitution des parois et membranes cellulaires, protéines et réserves d'énergie essentielles. Le métabolisme primaire est conservé entre espèces végétales, malgré quelques spécificités apparues au cours de l'évolution (Maeda, 2019). D'autre part, le métabolisme dit secondaire ou spécialisé fait référence au métabolisme de molécules ayant des fonctions spécifiques, associées à la défense, à la reproduction ou à la communication (Pott et al., 2019). Bien que l'abondance de ces métabolites spécialisés soit faible (souvent $\leq 1\%$ de la masse en carbone) (Bourgau et al., 2001), ils jouent des rôles biologiques essentiels en dépit du coût énergétique lié à leur biosynthèse. Le métabolisme spécialisé est caractérisé par une très grande diversité structurale, variable en fonction de l'espèce, de l'organe, ou du tissu étudié, et pouvant fluctuer en fonction des conditions environnementales (Kroymann, 2011).

Au sein de ces métabolites spécialisés, Harborne définit trois classes chimiques majeures : les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (Harborne, 1999). Cette classification, large et incomplète, cache une diversité structurale importante. En effet, il conviendrait d'ajouter les polycétides à cette liste, et d'affiner la définition d'un alcaloïde, centrée autour de la présence d'un azote (basique), et ne tenant pas compte de son origine biosynthétique. Plusieurs dizaines de milliers de molécules issues d'espèces végétales ont ainsi été répertoriées et ne représenteraient qu'une fraction des composés naturels existant réellement (Kroymann, 2011; Wink, 2010). Outre leur diversité, certains composés spécialisés sont également particulièrement abondants. Par exemple, la lignine est la deuxième molécule organique la plus abondante sur Terre, principal constituant du bois (Bajwa et al., 2019). La lignine est un polymère de phénylpropanoïdes polyphénoliques (structure monomérique de type C₆-C₃). Sa biosynthèse est issue de la phénylalanine et de la tyrosine (Liu et al., 2018). La lignine participe grandement au maintien de la structure et de la rigidité des plantes. D'une manière intéressante, ce métabolite spécialisé intervient également dans la protection face à des pathogènes invasifs tels que les nématodes (Ithal et al., 2007).

L'une des fonctions majeures des métabolites spécialisés est de contribuer à la plasticité de la plante face aux stress biotiques (pathogènes, herbivores) ou abiotiques (stress hydrique, thermique, carences en nutriments, rayonnements UV) (Marone et al., 2022). Les plantes étant des organismes pour la grande majorité immobiles, leur adaptation aux conditions environnementales repose sur la production d'une grande variété de molécules permettant leur croissance, leur protection, leur communication et leur reproduction (Pott et al., 2019). Ainsi, certaines espèces végétales, en compétition pour l'utilisation des nutriments dans le sol, peuvent produire des métabolites spécialisés dits allélopathiques leur permettant d'influer sur leur environnement biotique. Une substance allélopathique peut être constituée d'un ou de plusieurs composés sécrétés, ayant un effet bénéfique ou délétère, direct ou indirect, sur d'autres organismes (Rice, 1985). Dans la plupart des exemples, le terme « allélopathie » fait référence à des effets délétères (Inderjit and Duke, 2003). Dans la suite de ce manuscrit, le terme « allélopathie » sera pris au sens de l'interaction chimique entre une plante sécrétant une molécule phytotoxique, et d'autres espèces végétales cibles (Duke, 2015). Le terme « phytotoxicité » associé à une molécule naturelle (phytotoxine) pourra quant à lui traduire l'inhibition de la germination, de la croissance, ou tout effet défavorable au développement de la plante cible, pouvant aller jusqu'à sa mort (Baumgarten and Spiegel, 2004).

I.2 Métabolites secondaires phytotoxiques et allélopathie

Les molécules phytotoxiques produites par une plante allélopathique peuvent directement affecter les plantes cibles (Figure 1). Cette interaction moléculaire directe entre deux organismes est à l'origine de la définition de l'allélopathie. Le noyer (genre *Juglans*) est un exemple classique de plante allélopathique. Cet arbre produit en effet une naphthoquinone phytotoxique, la juglone (Davis, 1928). Cette molécule est à la fois sécrétée au niveau des racines et exsudée des résidus végétaux en décomposition (feuilles, écorces), sous forme naphthalène-1,4-diol, glycosylé ou non (Figure 1) (Soderquist, 1973; Strugstad and Despotovski, 2012). Au contact de l'oxygène de l'air, les formes réduites sont oxydées en juglone, phytotoxique (Medic et al., 2022).

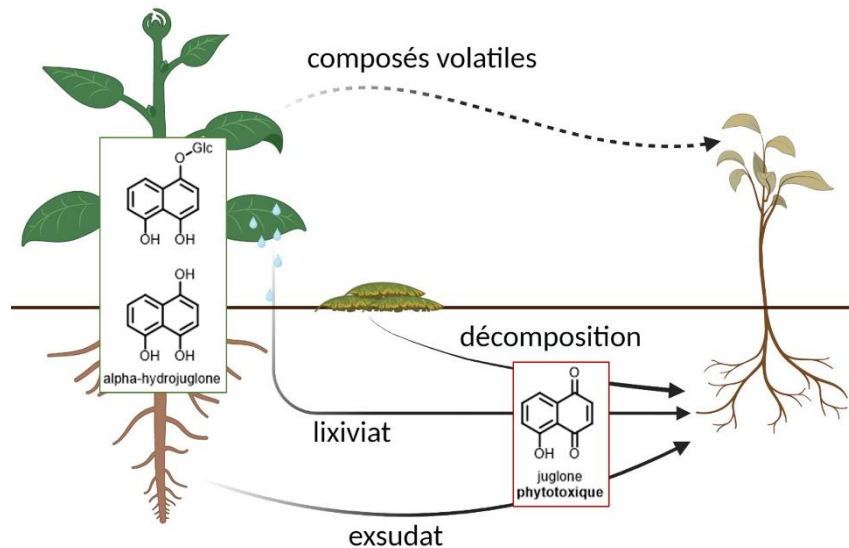


Figure 1 : Schéma synthétisant les différentes voies d'allélopathie directe via l'exemple de la juglone

La libération de molécules allélopathiques vers une plante cible passe par des voies de diffusion telles que la lixiviation par la pluie, la libération de composés phytotoxiques par la décomposition des résidus de la plante allélopatrice, la diffusion d'exsudats allélopathiques depuis les racines dans la rhizosphère, et la sécrétion de molécules volatiles organiques. Par exemple, les précurseurs non-toxiques de la juglone sont présents *in planta* et subissent une oxydation une fois à l'air libre générant la juglone phytotoxique. (Adapté de Zhang et al., 2021)

La juglone induit la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau des racines des autres plantes, conduisant à l'oxydation de leurs protéines et ADN et à leur mort (Hejl and Koster, 2004; Bolton et al., 2000; Widhalm and Rhodes, 2016). Si la production de juglone est constitutive, la réponse allélopathique peut aussi être activée par la présence d'espèces végétales concurrentes. Par exemple, la réponse allélopathique de *Fagopyrum esculentum* est induite par la présence d'*Amaranthus retroflexus* et conduit à l'inhibition de la croissance de cette espèce (Gfeller et al., 2018). Bien que des modifications de la composition chimique des exsudats racinaires de *F. esculentum* en présence d'*A. retroflexus* aient été détectées, la nature de la ou des molécule(s) bioactive(s) reste inconnue (Gfeller et al., 2018).

L'effet allélopathique peut également être indirect. D'une part, les molécules produites peuvent modifier des paramètres physico-chimiques de l'environnement (pH, disponibilité en nutriments) et induire ainsi un stress abiotique. Les monoterpènes et terpénoïdes ont par exemple été mis en lumière pour leur inhibition de la minéralisation de l'azote et de la nitrification par certains micro-organismes, réduisant ainsi la disponibilité en azote pour les végétaux (White, 1994, 1986). D'autre part, elles peuvent agir en modifiant le microbiote de la rhizosphère (Inderjit and Duke, 2003; Inderjit and Weiner, 2001; Scavo et al., 2019). C'est le cas de certains composés benzoxazinoïdes issus de Poacées telles que le maïs, se dégradant

en 6-methoxybenzoxazolin-2-one (MBOA) ou benzoxalin-2-one (BOA). Le MBOA est une molécule aux propriétés phytotoxiques agissant de manière directe sur l'activité de l' α -amylase ainsi que sur l'intégrité des mitochondries et des chloroplastes (Kato-Noguchi and Macías, 2008, 2005). Cependant, le MBOA module également la composition du microbiote de la rhizosphère, corrélée à une amélioration de leur défense, ce qui entraîne une diminution de la croissance notamment de la génération suivante chez le maïs (augmentation de phytohormones défensives, *i.e.* l'acide salicylique et l'acide jasmonique) (Hu et al., 2018; Schandry and Becker, 2020). Les MBOA et BOA bien que plus stables que leurs précurseurs benzoxazinoïdes, se dégradent également par l'action du microbiote de la rhizosphère en 2-amino-7-methoxy-3H-phenoxazin-3-one (AMPO) et 2-amino-3H-phenoxazin-3-one (APO) respectivement (Macías et al., 2006, 2009). Ces produits de dégradation, APO et AMPO, sont également des molécules avec un fort potentiel phytotoxique, et retrouvés au sein de plantes cibles d'une action allélopathique. La phytotoxicité de l'APO et AMPO a été corrélée avec leur capacité à perturber l'expression des gènes par l'inhibition d'histone déacétylases et histone acétyltransférases (Macías et al., 2014; Venturelli et al., 2015).

Il est important de noter que la phytotoxicité d'une molécule d'origine naturelle n'implique pas nécessairement un rôle dans un processus allélopathique (Duke, 2015). En effet, de nombreux métabolites ont été caractérisés comme phytotoxiques sans qu'un rôle allélopathique ne leur soit associé. C'est en particulier le cas de substances phytotoxiques qui ne sont pas excrétées par la plante. Si la fonction biologique *in planta* de ces molécules, et à fortiori leur rôle écologique potentiel, sont souvent inconnus, leur activité phytotoxique peut en revanche s'avérer très précieuse, tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué. En effet, le décryptage des mécanismes responsables de la bioactivité de ces molécules, mais également de molécules phytotoxiques de synthèse, est susceptible d'apporter des éléments essentiels à la compréhension des processus biologiques et biochimiques. D'autre part, ces molécules d'origine naturelle présentent une immense diversité structurale et des propriétés chimiques potentiellement originales (Beffa et al., 2019; Gandy et al., 2015; Oršolić et al., 2021). Leur potentiel de valorisation dans le domaine phytosanitaire, en vue du développement de nouveaux herbicides, est de fait très important (Cantrell et al., 2012; Dayan and Duke, 2014).

II Facteurs modulant l'activité phytotoxique

Que ce soit dans un cadre écologique (allélopathie) ou lors d'une application artificielle (herbicide), l'effet phytotoxique d'une molécule est conditionné par différents facteurs, susceptibles de moduler sa bioactivité. Ces facteurs incluent les caractéristiques et efficacité

de son absorption, de sa translocation et de sa métabolisation éventuelle au sein de la plante avant d'atteindre sa cible (Zimdahl, 2007). Ces paramètres sont également étroitement liés aux caractéristiques de la plante cible elle-même (génétique, état de développement, état physiologique).

II.1 Interactions au sein de la rhizosphère et de la phyllosphère

Une composante importante de la phytotoxicité est l'interaction de la molécule active avec le milieu. Dans le cas de composés excrétés par le système racinaire, la matrice complexe du sol, riche en molécules organiques, minérales et en microorganismes, peut affecter sa stabilité ainsi que sa diffusion vers la plante cible. Une étude réalisée sur des composés phénoliques allélopathiques exsudés par *Centaurea maculosa* Lam., dont la catéchine, montre leur dégradation, après sorption et oxydation dans des sols sableux et limoneux (Tharayil et al., 2008). Dans ces conditions les composés phénoliques polymérisent en réaction avec les minéraux du sol et perdent leur phytotoxicité (Tharayil et al., 2006; Wang et al., 1978). En outre, les molécules présentes dans le sol peuvent être lixiviées en profondeur, hors de la rhizosphère, en fonction des précipitations ou de l'arrosage. Un exemple de l'impact de la lixiviation des composés phytotoxiques concerne la luzerne (ou alfafa), une plante autotoxique dont les composés exsudés ont un effet allélopathique sur la descendance (Jennings and Nelson, 1998). Cette autotoxicité intergénérationnelle diffère en fonction de la texture du sol, en relation avec la quantité de composé allélopathique lixivié. L'efficacité des composés phytotoxiques est donc également fortement impactée par les pratiques de culture comme le labour qui favorisent la lixiviation (Chauhan et al., 2006; Elliott et al., 2000). Par ailleurs, le microbiote du sol module également la biodisponibilité et la rémanence des composés dans le sol. Par exemple, la sorgoléone, une quinone phytotoxique présente dans les exsudats de racines de Sorgho, peut être détectée dans le sol plusieurs semaines après récolte (Weston and Czarnota, 2001). En revanche, sa présence est rapidement indétectable dans des sols où sont présents des micro-organismes utilisant ce composé comme source d'énergie (Gimsing et al., 2009). Cet exemple illustre la capacité de certains microorganismes du sol à métaboliser des composés phytotoxiques, réduisant ainsi leur disponibilité et leur rémanence dans le sol, et leur bioactivité.

Au niveau de la phyllosphère, l'interaction avec la surface foliaire est déterminante pour assurer la pénétration ultérieure de la molécule. Cette surface est constituée par la cuticule, dont les composants (cutine, cires) sont très hydrophobes. Les molécules phytotoxiques naturelles pénétrant au niveau foliaire sont essentiellement volatiles et hydrophobes et interagissent facilement avec la cuticule (Gil et al., 2022). En revanche, cette problématique

est centrale pour les herbicides de synthèse, souvent hydrosolubles, utilisés en application foliaire. L'adhérence est alors modulée par la température et l'humidité qui influent sur la viscosité de la cuticule et sur son hydratation (Zimdahl, 2007). Il est néanmoins souvent nécessaire d'ajouter à la formulation des herbicides commerciaux des adjuvants (mouillants, tensio-actifs) qui augmentent l'adhérence aux surfaces foliaires.

II.2 Caractéristiques de la plante cible

Les caractéristiques génétiques de la plante cible sont un facteur déterminant pour la phytotoxicité, à la base de la sélectivité de nombreux herbicides. Le lien entre sélectivité et génétique a été particulièrement bien décrit pour le tepraloxym, un herbicide spécifique des Monocotylédones, ciblant l'acétyl-coenzyme A carboxylase. En effet, si cette enzyme est présente chez les Monocotylédones et les Dicotylédones, l'isoforme retrouvée chez les Monocotylédones est particulièrement affine pour le tepraloxym, rendant les plantes sensibles à ce composé (Rendina and Felts, 1988). Au-delà des spécificités génétiques, la sensibilité de la plante est dépendante de son état physiologique, en relation étroite avec son stade de développement. (Shen et al., 2023). Ainsi, le tepraloxym et d'autres herbicides affectant sélectivement les Monocotylédones sont plus efficaces sur des plantes adultes (Rendina and Felts, 1988; Riemens et al., 2009). En revanche, des herbicides non-sélectifs comme le glyphosate ou le glufosinate sont particulièrement actifs appliqués sur de jeunes plantes (Marrs et al., 1991, 1989; Riemens et al., 2008; Ruiters et al., 2000). Ces différences peuvent faire intervenir des caractéristiques structurales (cuticule, lignification) rendant la pénétration plus ou moins facile.

II.3 Pénétration au niveau racinaire et foliaire

Au niveau foliaire, en plus de former une surface limitant l'adhérence, la cuticule recouvrant les cellules épidermiques est la première barrière à la pénétration de molécules phytotoxiques (Kirkwood, 1999; Srivastava, 2002; Xu et al., 2011). Cette pénétration est dépendante des propriétés physico-chimiques de la molécule, de la perméabilité de la cuticule et des facteurs abiotiques de l'environnement. Comme mentionné, la cuticule est composée en majorité de cutine, un polyester contenant des acides gras hydroxylés à 16 ou 18 carbones, et de cires riches en acides gras à longues chaînes (Jeffree, 2006). De plus, la paroi des cellules épidermiques, composée de polysaccharides hydrophiles (cellulose, hémicelluloses, pectines) forme également une barrière physique (Figure 2) (Khanal and Knoche, 2017). Pour

traverser cette structure complexe, la lipophilie de la molécule phytotoxique (représentée par le coefficient de partage octanol-eau, $\log P$ ou $\log K_{ow}$) et sa solubilité dans l'eau ($\log S$) sont des paramètres importants (Baker et al., 1992; Kerler and Schönherr, 1988). Ainsi, les molécules les plus hydrophobes ($\log P$ élevé), sont susceptibles de traverser plus facilement la cuticule. A l'inverse, lors d'une application foliaire, l'absorption des molécules hydrophiles est plus variable, en particulier à cause de leur potentielle lixiviation à l'arrosage (Zimdahl, 2007). Néanmoins, d'autres facteurs comme la masse molaire ou le potentiel d'ionisation modulent également le processus d'absorption (Baker et al., 1992; Kerler and Schönherr, 1988).

A l'inverse de ce qui est observé dans les organes aériens, les molécules phytotoxiques hydrosolubles sont plus facilement absorbées au niveau racinaire. L'absorption s'effectue conjointement à la nutrition hydro-minérale et dépend donc du flux transpiratoire (Shone et al., 1974). Elle est donc modulée par l'ensemble des facteurs environnementaux qui impactent l'intensité transpiratoire (lumière, température hygrométrie) (Marschner, 2011). Le facteur TSCF (pour Transpiration Stream Concentration Factor) définit la capacité d'une molécule organique à être absorbée par les racines et transportée vers la tige et les feuilles en relation avec l'intensité transpiratoire. Les molécules organiques possèdent un TSCF moins élevé que celui de l'eau (TSCF = 1), en raison de leur interaction avec les lipides membranaires. Le TSCF est souvent associé au $\log P$ dans des études empiriques de l'absorption de composés organiques par les racines. Néanmoins, cette mise en relation semble sous-estimer la capacité d'absorption de molécules organiques polaires et hydrosolubles (Briggs et al., 1982; Burken and Schnoor, 1998; Hsu et al., 1990). Ainsi, il ne semble pas exister de relation claire et systématique entre le TSCF et le $\log P$ (Dettenmaier et al., 2009). De plus, si les caractéristiques chimiques de la molécule sont importantes pour son absorption, de nombreux paramètres intrinsèques à la plante, comme le volume des racines, du xylème, la transpiration ou encore le pH de différents organelles, interviennent également dans la capacité d'absorption et modulent la phytotoxicité (Trapp, 2000). Ainsi, la toxicité différentielle observée pour l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) vis-à-vis de la tomate (Solanacées) et du pois (Fabacées) serait directement associée à des cinétiques d'absorption différentes, rapide chez l'espèce sensible (tomate) et lente chez l'espèce tolérante (pois) (Fang, 1958). Cet exemple illustre le rôle déterminant de l'absorption pour la phytotoxicité, et dans certains cas, la sélectivité d'action (Zimdahl, 2007).

Quel que soit l'organe, la majeure partie des cibles moléculaires des composés phytotoxiques étant intracellulaire, le composé doit pénétrer la cellule au travers de la membrane plasmique. Ce franchissement peut se faire par diffusion simple ou par un transport

facilité, grâce à des transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) (Sterling, 1994). La membrane plasmique étant formée d'une bicouche lipidique, elle peut être traversée par diffusion simple par molécules lipophiles non-ioniques. Cependant, certains herbicides lipophiles ionisés ou certains acides faibles peuvent aussi diffuser de manière passive au travers de la membrane. En revanche, la plupart des molécules ionisées ou peu lipophiles, nécessitent la présence de transporteurs. Par exemple, la mutation du transporteur de la membrane plasmique AtPDR11, qui participe au transport de paraquat, réduit fortement la sensibilité d'Arabidopsis à ce composé (Xi et al., 2012). Au sein de la cellule, les propriétés chimiques des composés influent également sur leur localisation subcellulaire finale. De façon générale, les bases faibles sont préférentiellement relocalisées vers les vacuoles (pH acide) tandis que les acides faibles restent dans le cytoplasme, ou transitent vers le chloroplaste, à la lumière (Heldt et al., 1973; Sterling, 1994; Werdan et al., 1975).

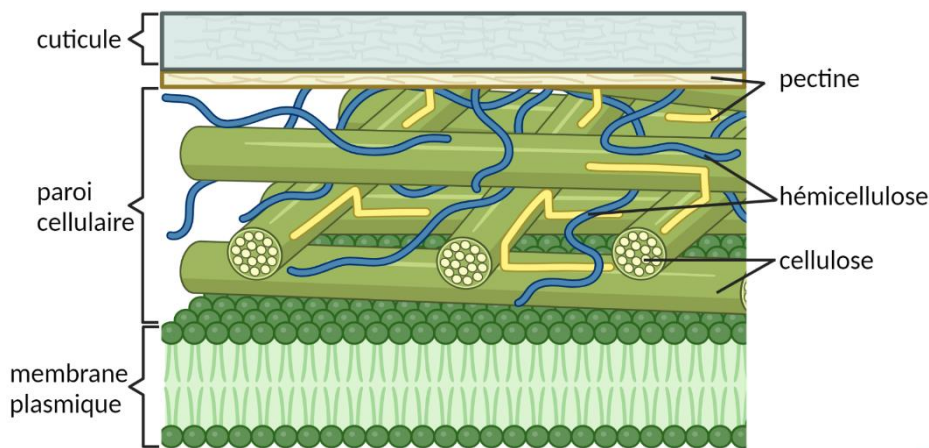


Figure 2 : Schéma de la paroi cellulaire végétale

II.4 Translocation au sein de la plante

La possible mobilité d'un composé phytotoxique au sein de la plante va largement impacter ses effets sur la physiologie et le développement, leur intensité et leur globalité. On distingue ainsi des composés peu mobiles, e.g. glufosinate, à action locale limitée à la zone d'absorption (herbicides de contact), de composés mobiles, e.g. glyphosate, à action systémique (herbicides systémiques). Ces derniers peuvent être transportés par les tissus conducteurs (xylème et/ou phloème) et leur effet systémique intégrera leur vitesse de translocation (quelques heures à plusieurs jours) au sein de la plante (Figure 3) (Nandula and Vencill, 2015). Comme évoqué précédemment, la vitesse de circulation étant dépendante de l'intensité transpiratoire (xylème) et de l'activité métabolique -photosynthétique en particulier-

(phloème), la propagation systémique de la phytotoxicité est largement modulée par les facteurs environnementaux régulant ces paramètres (lumière, température, hygrométrie) (Coetzer et al., 2001; Zhou et al., 2020)

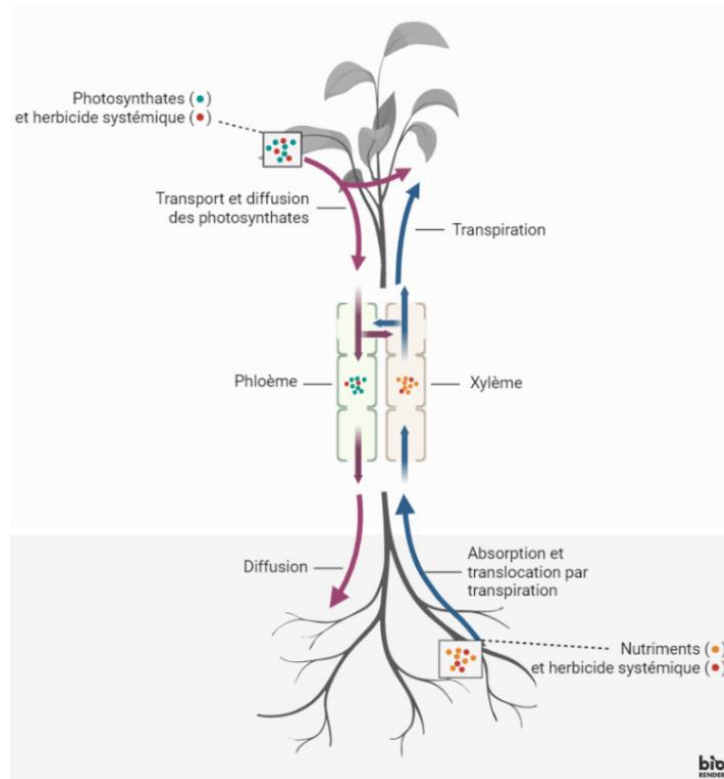


Figure 3 : Schéma du transport d'herbicide systémique

II.5 Métabolisation, conjugaison et séquestration

L'efficacité d'une molécule phytotoxique peut être modulée *in planta* suite à sa métabolisation. La métabolisation conduit le plus souvent à une réduction de la dose active présente dans les tissus, par la dégradation de la molécule ou par sa conversion en un dérivé biologiquement inactif (conjugaison). Une molécule phytotoxique peut ainsi être détoxifiée par un processus d'activation, puis de conjugaison (Coleman et al., 1997). La phase d'activation passe fréquemment par une oxydation catalysée par les cytochromes P450, bien que certaines amidases ou estérases puissent également participer à ce processus. Si la molécule possède déjà une fonction chimique permettant une conjugaison avec un métabolite, la phase d'activation n'est pas nécessaire. Certaines molécules phytotoxiques telles que l'atrazine ou la patuline peuvent être directement détoxifiées par O-méthylation (Lu et al., 2016; Wang et al., 2019). A l'inverse, certaines molécules appliquées sous formes d'esters biologiquement inactifs ("pro-herbicide") peuvent être hydrolysées par des estérases *in planta*, générant ainsi

un dérivé phytotoxique (Cummins and Edwards, 2004; Gershater et al., 2007; Haslam et al., 2001). La clomazone serait également un pro-herbicide (Matsue et al., 2010) métabolisé *in planta* en 5-cétoclomazone, un inhibiteur de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS). L'inhibition de cette enzyme de la voie de biosynthèse des caroténoïdes par la 5-cétoclomazone serait responsable de la phytotoxicité de la clomazone (Ferhatoglu and Barrett, 2006; Lichtenthaler et al., 2000; Mueller et al., 2000).

La conjugaison avec des sucres ou avec le glutathion consécutive aux réactions d'activation permet la détoxification de nombreuses molécules (Coleman et al., 1997). Outre une moindre toxicité de la forme conjuguée, cette étape conduit fréquemment à la compartimentation de la molécule vers les vacuoles ou à son excrétion vers l'apoplasme. De manière générale, les composés phytotoxiques conjugués sont isolés à l'intérieur des vacuoles, évitant ainsi tout contact avec les cibles moléculaires responsables de leur phytotoxicité (Macias et al., 2003). La conjugaison et/ou la compartimentation permettent aussi aux plantes de stocker des composés allélopathiques en limitant leur autotoxicité. L'exemple des benzoxazinones et benzoxazolinones, présentes chez de nombreuses *Poaceae* et chez certaines *Acanthaceae*, *Scrophulariaceae*, ou *Ranunculaceae* (Niemeyer, 2009), illustre l'ensemble de ces mécanismes (Figure 4). Bien que leur mode d'action reste encore à clarifier, leur biosynthèse et leur détoxification ont été décryptés chez le maïs (Frey et al., 2009; Meihls et al., 2013). La biosynthèse de ces composés est initiée dans le chloroplaste par la conversion d'une molécule d'indole-3-glycérophosphate en indole. Cette molécule est ensuite métabolisée par quatre cytochromes P450 en 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (DIBOA), puis conjuguée à une molécule de glucose. Cette étape de glycosylation est considérée comme un mécanisme évitant toute autotoxicité et facilitant sa fonctionnalisation en de nouveaux benzoxinoïdes, par des enzymes cytosoliques (Wouters et al., 2016). Les benzoxinoïdes glycosylés sont ensuite stockés dans la vacuole où aucune glycosidase n'est présente. En effet, les β -glycosidases pouvant cliver la liaison glycosidiques ne sont présentes que dans la paroi, les chloroplastes ou le cytosol (Nikus et al., 2001). Lors d'une blessure ou lorsque les composés sont exsudés par les racines, les β -glycosidases entraînent libèrent des aglycones de benzoxinoïde, à activité allélopathique. Par ailleurs, plusieurs espèces végétales utilisent ce mécanisme de glycosylation via des glycosyltransférases pour réduire la phytotoxicité de ces benzoxinoïdes (Schulz et al., 2005).

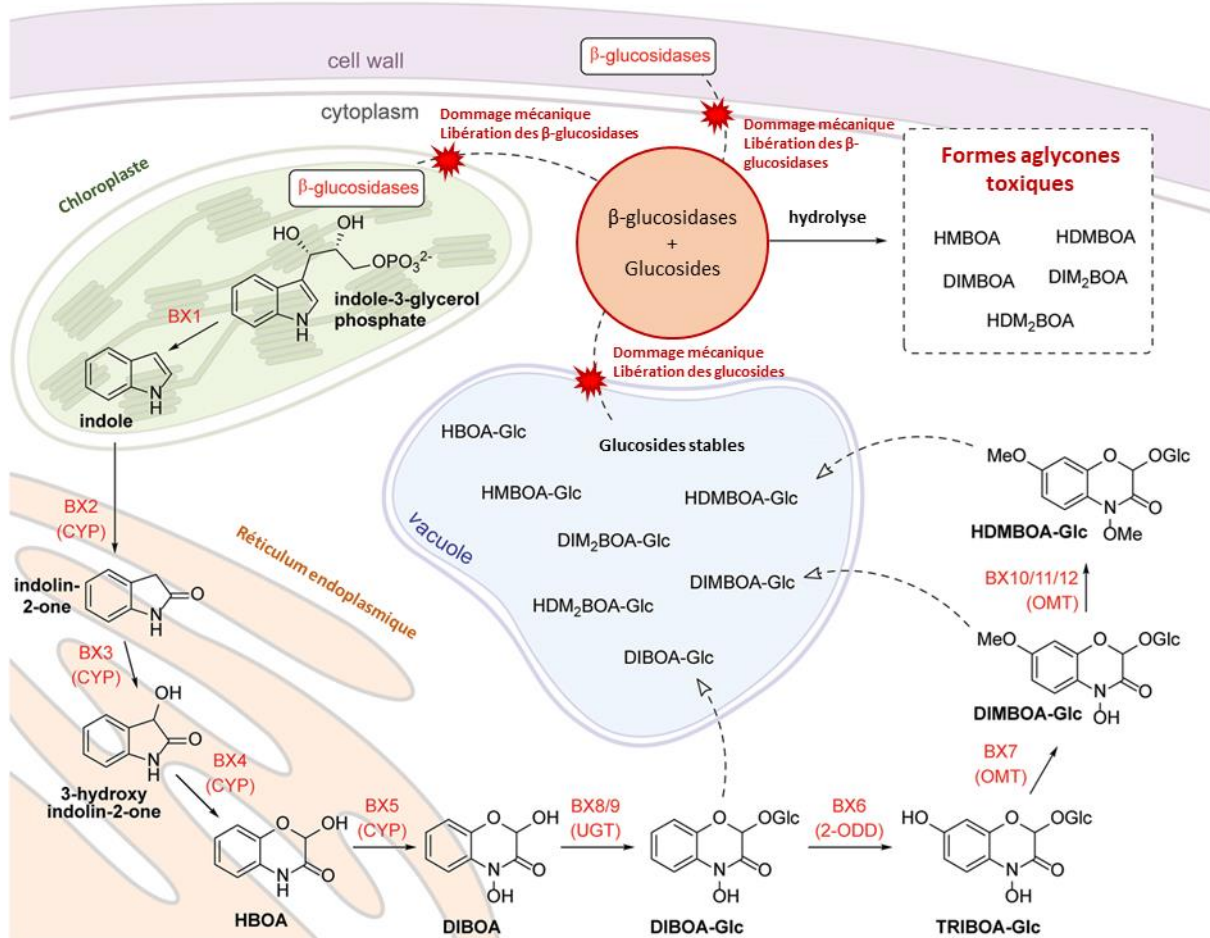


Figure 4 : Biosynthèse et métabolisation des benzoxinoïdes au sein d'une cellule végétale (adapté de Wouters et al., 2016)

III Principaux modes d'action des composés phytotoxiques

Le mode d'action d'une molécule phytotoxique résulte soit de l'inhibition d'enzymes, soit de dommages provoqués à des composants structuraux. Plusieurs classifications dépendant du mode ou du site d'action des composés phytotoxiques ont été proposées (Dayan, 2019; Dayan and Duke, 2014; Zimdahl, 2007). Bien que non-exhaustives, ces classifications donnent une vue d'ensemble de la diversité des cibles moléculaires affectées par ces composés. Ces cibles interviennent dans des processus essentiels pour la croissance et le développement des plantes tels que la production d'énergie, le métabolisme, le maintien des structures cellulaires ou la transcription et sa régulation au sein des cellules végétales. La suite de ce paragraphe présentera différents exemples de processus biologiques affectés par des molécules phytotoxiques et les mécanismes responsables de ces effets.

III.1 Effets sur la photosynthèse

La photosynthèse, avec la respiration mitochondriale, est le processus primordial pour la production d'énergie au sein de la plante. C'est aussi le processus central du métabolisme carboné des végétaux, fournissant les précurseurs nécessaires à l'élaboration de la structure et au fonctionnement de la plante. De ce fait, la perturbation de l'activité photosynthétique a des conséquences majeures et multiples sur la croissance et le développement, pouvant être létales. Ainsi, l'activité phytotoxique d'une molécule, naturelle ou de synthèse, est le plus souvent associée, directement ou indirectement, à une réduction des capacités photosynthétique de la plante, qui peut être la cause ou la conséquence de cette phytotoxicité. Ce paragraphe se focalisera sur la photosynthèse en tant que cible directe de molécules phytotoxiques naturelles ou de synthèse.

L'ensemble du processus photosynthétique se déroule au sein du chloroplaste. Les réactions associées à la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique (ATP) et en pouvoir réducteur (NADPH, H⁺), *i.e.* phase photochimique, se déroulent dans la membrane des thylakoïdes et font intervenir les intermédiaires de la chaîne de transfert des électrons chloroplastique. Elles s'accompagnent de la libération de dioxygène. Les réactions associées à la fixation du CO₂, à la synthèse de 3-phosphoglycérate et à la régénération de l'accepteur primaire de CO₂ (ribulose 1,5-bis-phosphate), *i.e.* phase biochimique, font intervenir la Ribulose 1,5-bis-phosphate CarboxyOxygénase (RubisCO) et les enzymes du cycle de Calvin-Benson-Bassham et ont lieu, quant à elles, dans le stroma. Les intermédiaires de la chaîne de transfert des électrons chloroplastique, et en particulier les deux photosystèmes PSI et PSII (Stirbet et al., 2020), sont les principales cibles des composés affectant la photosynthèse, (Figure 5).

PSI et PSII présentent des structures analogues, composées de deux protéines coordonnant un dimère de chlorophylle *a* formant le centre réactionnel, et, à leur périphérie, d'un ensemble de pigments (chlorophylles, caroténoïdes, xanthophylles) et de protéines constituant l'antenne collectrice (Light-Harvesting Complex, LHC). Cette dernière permet la collecte de l'énergie lumineuse et sa canalisation vers le centre réactionnel (Caffarri et al., 2014; Fromme et al., 2006; Scheller et al., 2001).

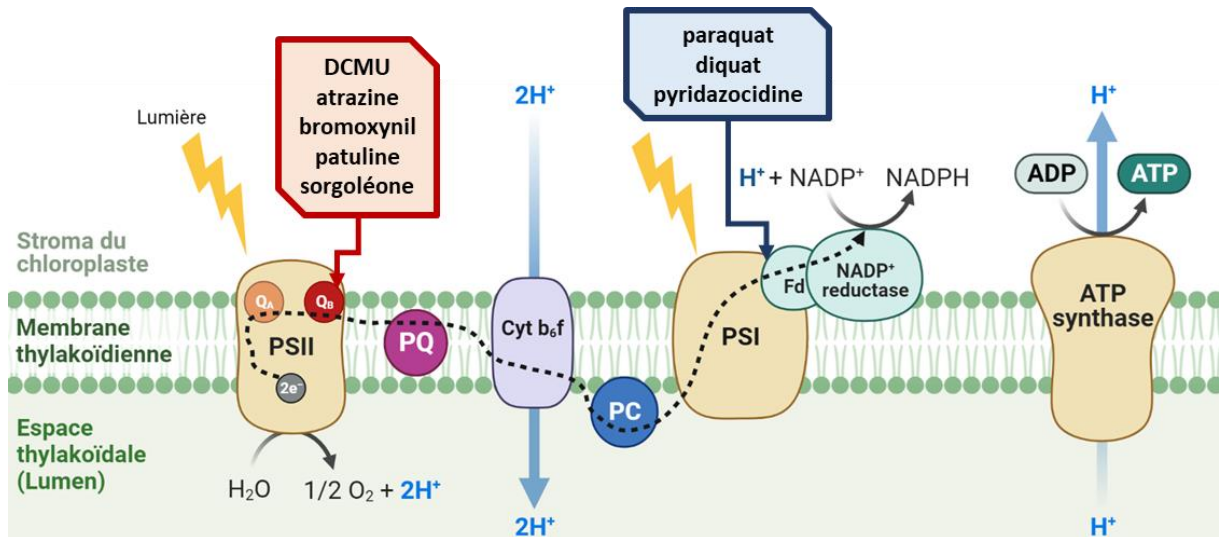


Figure 5 : Schéma de la chaîne de transfert d'électron photosynthétique.

La flèche en pointillée correspond au trajet des électrons au sein de la chaîne. **PSII**, photosystème II ; **PQ**, plastoquinone ; **Cyt b₆f**, complexe cytochrome b₆f ; **PC**, plastocyanine ; **Fd**, ferrédoxine.

Dans le cas du photosystème II (PSII), les deux protéines, D1 et D2, très homologues, coordonnent un dimère de chlorophylle *a* (P680), présentant un maximum d'absorption à 680 nm. L'excitation du P680 par l'énergie lumineuse entraîne le transfert d'un électron vers une molécule de phéophytine, située au sein de la protéine D1. Cet électron est ensuite transféré à une plastoquinone, fixée dans la poche réactionnelle Q_A de la protéine D2, puis à une plastoquinone située dans le site Q_B, sur la protéine D1. Dans le même temps, le complexe Mn₄CaO₅ du PSII entraîne la photolyse de l'eau, libérant deux électrons permettant de réduire P680⁺. Deux électrons sont nécessaires pour que la plastoquinone du site Q_B soit réduite en plastoquinol. L'affinité du plastoquinol pour le site Q_B étant plus faible que celle de la plastoquinone, le plastoquinol migre, au sein de la membrane thylakoïdienne, du pool de plastoquinones vers le complexe cytochrome b₆f (Hess, 2000). Cette structure est une pompe à protons, qui permet l'accumulation de protons dans l'espace inter-thylakoïdien lors du transfert des électrons vers la plastocyanine. La plastocyanine est une métalloprotéine mobile dans la membrane thylakoïdienne et qui délivre les électrons au photosystème I (PSI).

Le PSI est composé de 6 protéines PsaA-F, dont deux, PsaA et PsaB, constituent la structure centrale du photosystème (Hess, 2000; Jensen et al., 2003; Scheller et al., 2001). PsaA et PsaB coordonnent le dimère de chlorophylle *a* (P700), dont le rôle est identique à celui de P680 mais absorbant la lumière à 700 nm. PsaC contient deux complexes Fe-S, F_A et F_B, et se situe en aval d'une série de transporteurs d'électrons au sein du PSI. Les protéines PsaD et PsaE permettent l'amarrage de la ferrédoxine, tandis que PsaF permet l'amarrage de

la plastocyanine. Après excitation, P700 transfère un électron à la ferrédoxine, *via* le complexe F_B de PsaC. Ainsi, le P700 est alors oxydé en $P700^+$. Il retourne à sa forme réduite grâce aux électrons transférés par la plastocyanine, issus du PSII. Grâce à la NADP⁺ réductase, les électrons transférés à la ferrédoxine permettent de réduire, le NADP⁺, accepteur final d'électrons, en NADPH, H⁺, réservoir principal de pouvoir réducteur chez les plantes.

Comme mentionné, le fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons chloroplastique entraîne une accumulation de protons dans le lumen, grâce à l'activation du complexe cytochrome b_6f et à la photolyse de l'eau par le complexe Mn_4CaO_5 . Le lumen possède un pH acide (pH = 5,8-6,5) en conditions normales d'illumination, tandis que le stroma présente un pH basique (pH = 7.8-8.0) (Kramer et al., 1999). L'accumulation de protons dans le lumen génère un gradient de protons, nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase de la membrane thylakoïdienne. L'ATP ainsi formé est essentiel aux réactions non-dépendantes de la lumière (Jagendorf and Uribe, 1966).

La majeure partie des composés phytotoxiques, naturels ou synthétiques, ciblant la photosynthèse interfèrent avec le fonctionnement des deux photosystèmes, et en particulier avec celui du photosystème II (Figure 5). Au niveau du PSII, le site de fixation de ces molécules est le site Q_B , présent au sein de la protéine D1. Ainsi, ces inhibiteurs bloquent le transfert des électrons, par inhibition compétitive avec la plastoquinone. La conséquence de cette inhibition est la formation de chlorophylle à l'état triplet au sein du photosystème, entraînant la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). A terme, les ROS ainsi produits génèrent des dommages au niveau du PSII, des chlorophylles et des membranes thylakoïdiennes (Fufezan et al., 2002; Rutherford and Krieger-Liszakay, 2001). En terme phénotypique, cet effet se traduit le plus souvent par l'apparition d'une chlorose, associée à la dégradation des pigments chlorophylliens. De façon étonnante, bien que se fixant dans une même région de la protéine D1, les nombreux inhibiteurs connus du PSII présentent des structures chimiques très variées, pouvant évoquer des modes de fixation différents (Figure 5). De fait, les herbicides de synthèse inhibiteurs du PSII ont été divisés en deux groupes, en fonction de leur mode de liaison au site Q_B (Beffa et al., 2019). Un premier groupe est formé par les inhibiteurs effectuant une liaison hydrogène avec la Ser264 du site Q_B et comprend des urées, amides, triazines, triazinones, phénylcarbammates, pyridazinones et uraciles (Battaglino et al., 2021; Oettmeier, 1999). Parmi ces composés, ceux dont le mode d'action a été le plus étudié sont l'atrazine et la 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU ou diuron). Le second groupe est formé par des inhibiteurs se fixant par une liaison hydrogène à l'His215 du site Q_B et inclut des benzothiadiazinones, nitriles et phénylpyridazines. Le bromoxynil, qui appartient à la famille des nitriles et dont la fonction phénolique permet la liaison hydrogène à l'His215, est un bon

exemple de ce groupe (Battaglino et al., 2021; Takahashi et al., 2010; Trebst, 1987). Au-delà de ces exemples, l'étude du mode d'action de molécules phytotoxiques d'origine naturelle illustre l'existence de mécanismes de fixation alternatifs. Par exemple, des études de docking ont mis en évidence que la patuline, une mycotoxine produite par différentes espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* inhibe le PSII via sa liaison hydrogène avec l'His252 du site Q_B (Guo et al., 2021). Des composés allélopathiques comme la sorgoléone sont également capable de se lier à ce site, mais les résidus impliqués n'ont, pour l'heure, pas été identifiés (Czarnota et al., 2001; Dayan et al., 2010; Einhellig et al., 1993).

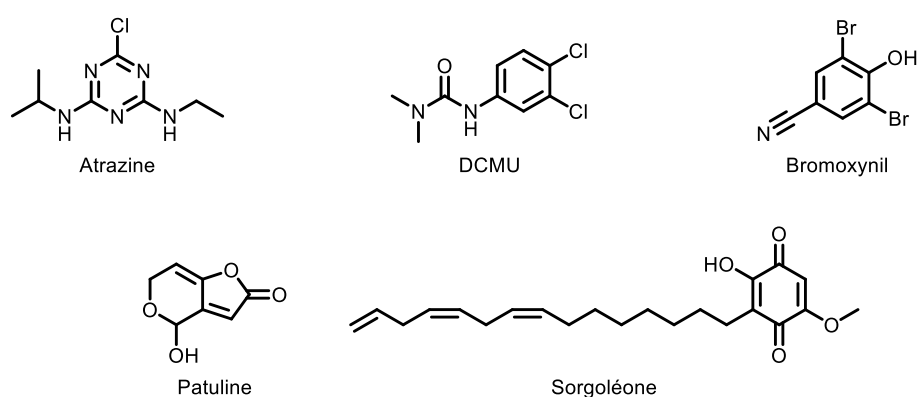


Figure 5 : Exemples de structures d'inhibiteurs du photosystème II

Le photosystème I est également ciblé par différents composés phytotoxiques (Figure 6). Ceux-ci découplent la chaîne de transfert des électrons, générant une fuite d'électrons au niveau du P700. Par exemple, la phytotoxicité du diquat et le paraquat, deux composés bipyridinium, repose sur l'interception des électrons au niveau de PsaC (Hess, 2000). Les bipyridiniums sont alors réduits à la place de la ferrédoxine, formant un ion radicalaire très instable. Celui-ci est rapidement auto-oxydé, ce qui entraîne la formation d'ions superoxyde $O_2^{\cdot -}$ rapidement dismutés en H_2O_2 par la superoxide dismutase. L'auto-oxydation permet la régénération rapide de la molécule bipyridinium, exacerbant la production d' H_2O_2 . L' H_2O_2 lui-même réagit avec l'anion superoxyde en présence d'ions Fe^{2+}/Fe^{3+} libres, formant des radicaux hydroxyles (HO^{\cdot}). Ces derniers provoquent la peroxydation des lipides insaturés et la perte de l'intégrité membranaire. Ce mode d'action a également été décrit pour d'autres inhibiteurs présentant des structures chimiques différentes comme des composés hétéropentalènes (Bowyer et al., 1984). Enfin, bien que peu de données soient disponibles, certains composés naturels comme la pyridazocidine, produite par *Streptomyces sp* pourraient être également des inhibiteurs du PSI (Gerwick et al., 1997).

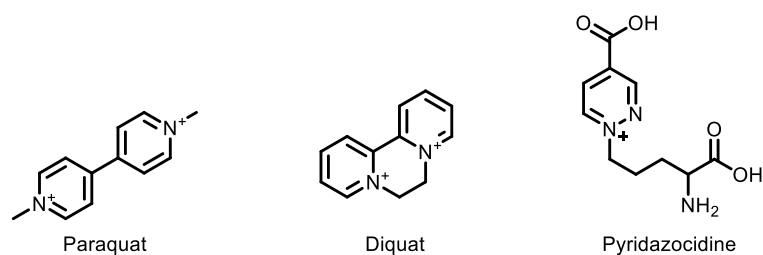


Figure 6 : Exemples de structures d'inhibiteurs du photosystème I

Comme présenté précédemment, l'interférence avec la fonction des plastoquinones est centrale pour expliquer l'effet phytotoxique des inhibiteurs du PSII. Cependant, comme l'illustre l'exemple de la sorgoléone, l'inhibition de la photosynthèse par ces composés pourrait être également indirecte, le métabolisme des plastoquinones lui-même pouvant être ciblé par certains de ces composés (Meazza et al., 2002). La biosynthèse des plastoquinones implique l'hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD), qui catalyse la conversion du 4-hydroxyphénylpyruvate en homogentisate, étape commune à la synthèse des plastoquinones et des tocophérols. L'HPPD est la cible de très nombreux herbicides de type isoxazole, isoxazolidinone, pyrazolone, et tricétone (Jhala et al., 2023). Il est à noter que cette dernière classe de composés a été développée sur la base des effets phytotoxiques d'une tricétone naturelle issue de *Leptospermum scoparium*, la leptospermone (Figure 7) (Dayan et al., 2007; Owens et al., 2013). Outre l'HPPD, d'autres enzymes de la voie de biosynthèse des plastoquinones pourraient également être ciblées par des composés phytotoxiques. C'est le cas de l'homogentisate solanésyltransferase (HST) dont l'inhibition par le cyclopyrimorate, un herbicide de synthèse dérivé des pyridazines, a été récemment démontrée (Shino et al., 2018).



Figure 7 : Exemples de structures d'inhibiteurs de l'hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD)

L'activité photosynthétique est également affectée par des molécules phytotoxiques qui inhibent la biosynthèse des pigments photosynthétiques (Figure 8). Cette action peut être indirecte, comme c'est le cas pour les inhibiteurs mentionnés au paragraphe précédent. En

effet, les plastoquinones interviennent en tant que cofacteurs de l'activité de la phytoène désaturase (PDS) qui catalyse une étape-clé de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et la déplétion du pool de plastoquinones s'accompagne d'une réduction de la teneur en caroténoïdes (Lee et al., 1997; Norris et al., 1995). La PDS est également la cible directe d'herbicides de synthèse comme la norflurazone, qui inhibe l'enzyme par compétition avec les plastoquinones (Breitenbach et al., 2001). Enfin, la 5-cétoclomazone inhibe la 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase, première enzyme de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Matsue et al., 2010). Outre la synthèse des caroténoïdes, la synthèse des pigments chlorophylliens est également la cible de nombreux herbicides de synthèse apparentés aux thiadiazoles, oxadiazoles, triazolinones, pyrimidindiones, *N*-phénylphtalamides, phénylpyrazoles et diphenyléthers (Gitsopoulos and Froud-Williams, 2004; Hao et al., 2011; Hiraki et al., 2001; Koch et al., 2004; Lyga et al., 1991; Matringe et al., 1989; Simmons et al., 1992; Theodoridis, 1997; Theodoridis et al., 2000). La cible de ces composés est la protoporphyrine IX oxydase (PPO), dont l'inhibition entraîne une oxydation spontanée du protoporphyrinogène IX en protoporphyrine IX, réaction normalement catalysée par la PPO elle-même (Hao et al., 2011). Cette production non-contrôlée par l'enzyme empêcherait la protoporphyrine IX de réagir avec les chélatases permettant la biosynthèse de l'hème ou de la chlorophylle (Hao et al., 2011). A la lumière, l'accumulation de protoporphyrine IX, photosensible, conduit à la production intense d'oxygène singulet (ROS), endommageant la plante, tout en empêchant la biosynthèse de la chlorophylle et de l'hème (Duke et al., 1991).

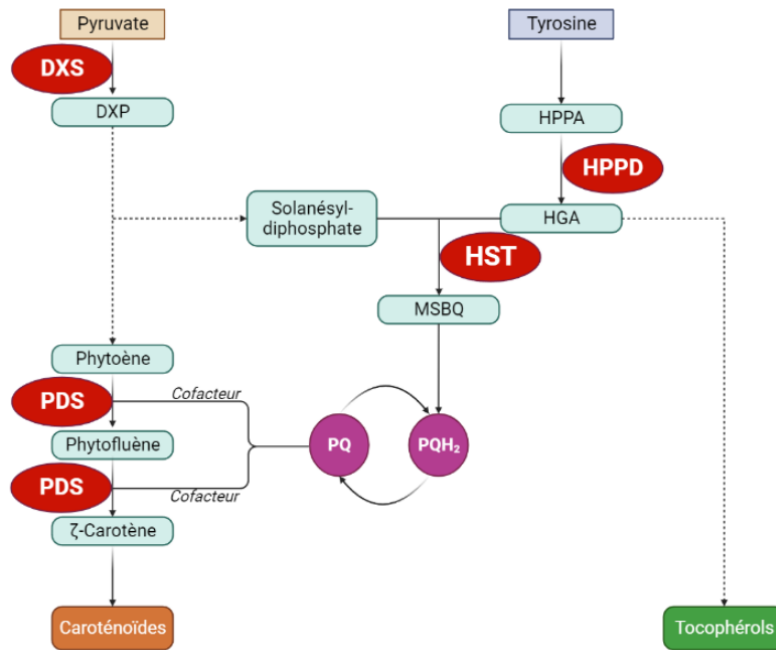


Figure 8 : Schéma des voies de biosynthèse de la plastoquinone, des caroténoïdes et des tocophérols (adapté de He et al., 2022)

Les flèches pleines correspondent à une réaction enzymatique. Les flèches en pointillées correspondent à une série de réactions impliquant plusieurs enzymes. Les ovales en rouge correspondent aux enzymes affectées par des molécules phytotoxiques **DXP**, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate; **DXS**, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; **HGA**, homogentisate; **HPPA**, hydrophénylpyruvate; **HPPD**, Hydroxyphénylpyruvate dioxygénase; **HST**, homogentisate solanésyltransférase; **MSBQ**, 2-méthyl-6-solanésyl-1,4-benzoquinol; **PDS**, Phytoène désaturase; **PQ**, plastoquinone; **PQH₂**, plastoquinol.

III.2 Phosphorylation oxydative

Plusieurs composés synthétiques comme le DCMU et le paraquat, ou d'origine naturelle comme la sorgoléone inhibent à la fois le fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons chloroplastique et mitochondriale (Dayan et al., 2010; Inoue et al., 1967; Palmeira et al., 1995). Dans le cas de la mitochondrie, ils interagissent directement avec les complexes I (paraquat) ou III (DCMU, sorgoléone et paraquat) et induisent la génération de ROS, créant des dommages oxydatifs au niveau de la mitochondrie et entraînant la mort cellulaire (Jabs, 1999; Staszek et al., 2021). La capacité de certains inhibiteurs du PSII à bloquer la respiration mitochondriale pourrait s'expliquer par la similarité structurale entre la plastoquinone et le transporteur d'électron mitochondriale, l'ubiquinone (UQ) (Figure 9).

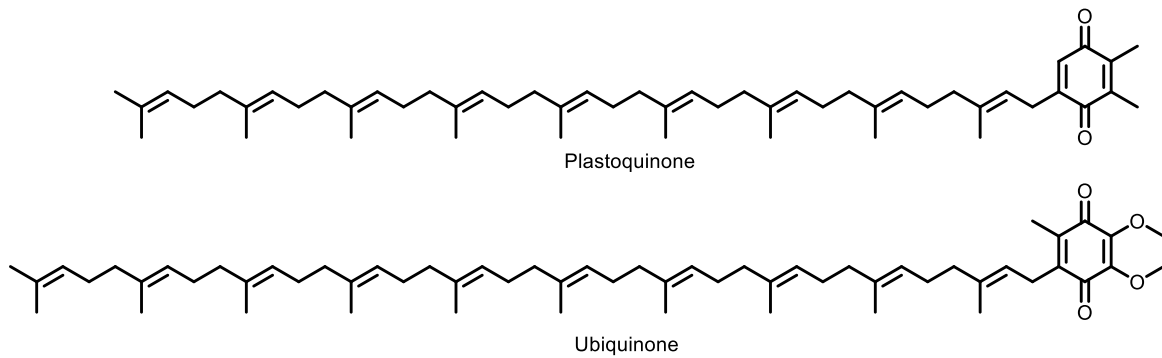


Figure 9 : Comparaison de la structure de la plastoquinone et de l'ubiquinone

D'une manière intéressante, plusieurs molécules naturelles allélopathiques exercent une inhibition directe sur le fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons mitochondriale et sur la production d'ATP (Figure 10) (Ishii-Iwamoto et al., 2006). Par exemple, le mode d'action de la juglone mime celui de composés découplant le transport des électrons et la synthèse d'ATP et pourrait impliquer une stimulation de l'oxydase alternative (AOX) (Hejl et al., 1993). La quercétine, un flavonoïde largement répandu chez les plantes, fonctionne également comme un découplant et inhibe la production d'ATP (Takahashi et al., 1998). Enfin, l' α -pinène, qui apparaît comme un des composés allélopathiques les plus actifs, inhibe à la fois le transfert d'électrons et la synthèse d'ATP (Ishii-Iwamoto et al., 2006). Cependant, la nature des mécanismes d'action et les cibles moléculaires de ces composés restent mal définies.

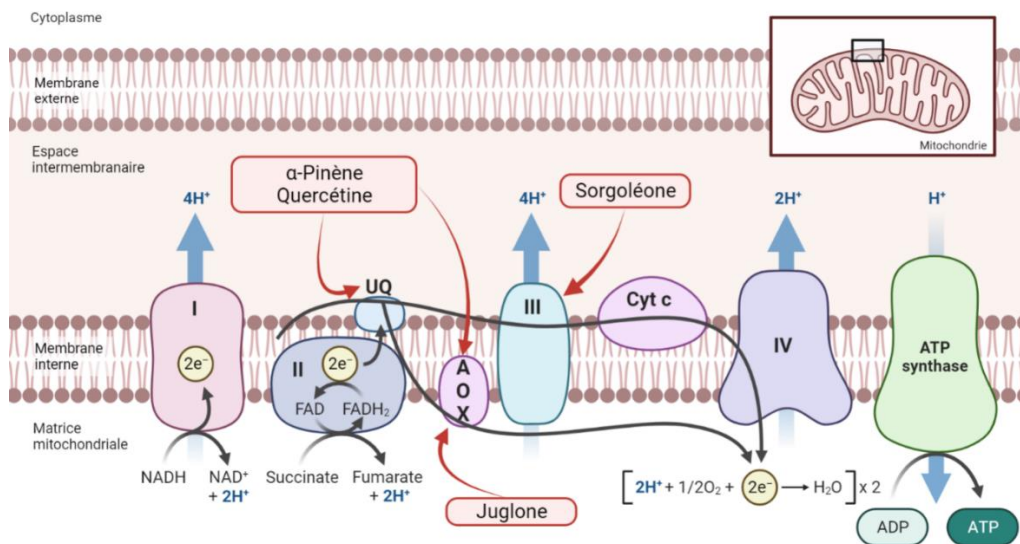


Figure 10 : Exemples de sites d'action affectés par des molécules naturelles au sein de la mitochondrie chez les plantes (adapté de Ishii-Iwamoto et al., 2006)

AOX, oxydase alternative; **Cyt c**, cytochrome c; **I**, NADH déshydrogénase; **II**, succinate déshydrogénase; **III**, cytochrome c réductase; **IV**, cytochrome c oxydase; **UQ**, ubiquinone.

III.3 Biosynthèse des acides aminés

L'assimilation de l'azote étant, comme la photosynthèse, au cœur du métabolisme autotrophe des plantes, de nombreux herbicides de synthèse ont été développés pour inhiber ce processus, et en particulier les différentes voies de synthèse des acides aminés. Dans ce contexte, la glutamine synthétase (GS) occupe une position centrale, puisqu'elle catalyse l'assimilation de l'ammonium au niveau du chloroplaste et du cytosol et la synthèse de glutamine, comme premier acide aminé (Takano and Dayan, 2020). L'activité GS est la cible de plusieurs molécules herbicides, dont l'acide [(3,5-dichloroanilino)-phosphonométhyl]phosphonique (Giberti et al., 2017). Elle est également la cible du glufosinate, un acide phosphinique synthétisé par *Pseudomonas*, et utilisé en champ comme herbicide (Hoerlein, 1994; Zhou et al., 2020). Le mode d'action du glufosinate repose sur une inhibition irréversible, compétitive vis-à-vis du glutamate, combinée à une inhibition non-compétitive vis-à-vis de l'ammonium et de l'ATP (Forlani et al., 2006). Cependant, des travaux récents indiquent un mode d'action plus complexe, impliquant également des dérégulations de la photorespiration et de la photosynthèse aboutissant à l'accumulation de ROS et à des dommages oxydatifs (Takano et al., 2020; Takano and Dayan, 2020). Ceci pourrait expliquer la similitude du phénotype observé sur des plantes traitées par le glufosinate et par des inhibiteurs de la photosynthèse.

Les voies de synthèse spécifiques de différentes classes d'acides aminés sont également ciblées (Figure 11). Le glyphosate, herbicide le plus utilisé au monde, est un inhibiteur de la synthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine), qui interviennent dans la biosynthèse des protéines, mais sont également des précurseurs de nombreux métabolites secondaires. Le glyphosate inhibe l'activité de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), qui catalyse la condensation du 3-phosphoshikimate et du phosphoénol pyruvate en 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate (Schönbrunn et al., 2001). L'inhibition de l'EPSPS conduit à l'accumulation de shikimate et de quinate, qui, en plus de l'ensemble des composés déplétés, participe à l'effet phytotoxique (Zabalza et al., 2017). Bien que le mode d'action du glyphosate implique la dérégulation de nombreuses cibles, son action directe par inhibition de l'EPSPS (Sikorski and Gruys, 1997) est la base de son activité herbicide. En effet, l'apparition de résistances naturelles au glyphosate est associée à des modifications (mutations, duplication) affectant le gène codant l'EPSPS (Sammons and Gaines, 2014). L'introduction d'un gène codant une EPSPS d'*Agrobacterium sp.* insensible au glyphosate a ainsi permis de créer des lignées de soja résistante au glyphosate et ouvert la voie à l'utilisation massive de glyphosate couplée à la

culture d'espèces génétiquement transformées et résistantes (Duke, 2018; Padgett et al., 1995).

Dans le cas de la biosynthèse des acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine, valine), différentes classes chimiques d'herbicides (imidazolinones, pyrimidyl(thio)benzoates, sulfonylaminocarbonyltriazolinones, sulfonylurées et triazolopyrimidines) ciblent l'activité l'acétolactate synthase (ou acétohydroxyacide synthase, ALS). Cette enzyme catalyse ALS la condensation de deux molécules de pyruvate générant l'acétolactate (le précurseur de la leucine et de la valine) ou la condensation d'une molécule de pyruvate and d' α -cétobutyrate générant de l'acétohydroxybutyrate (précurseur de l'isoleucine). Son inhibition empêche la synthèse de ces acides aminés, tout en générant une accumulation de 2-oxobutyrate, de 2-aminobutyrate et de ROS toxiques pour l'organisme. L'ensemble de ces perturbations métaboliques intervient dans l'effet phytotoxique de ces différents herbicides (Zhou et al., 2007).

Quelques exemples de molécules phytotoxiques d'origine naturelle ayant pour cibles des enzymes participant aux voies de biosynthèse des acides aminés ont été rapportées. Par exemple, le 5-méthyltryptophane produit par le champignon *Cantharellus cibarius* est un inhibiteur de la tryptophane synthase (Hsiao et al., 2007; Muszyńska et al., 2013). La cornexistine produite par *Lemna pausicostata* affecte le métabolisme de l'aspartate en inhibant l'aspartate aminotransférase (Amagasa et al., 1994). D'autres composés affectent également la biosynthèse de l'arginine et de la proline (Giberti et al., 2017; Hall et al., 2020; Mitchell and Bielecki, 1977; Nakajima et al., 1991; Winter et al., 2015).

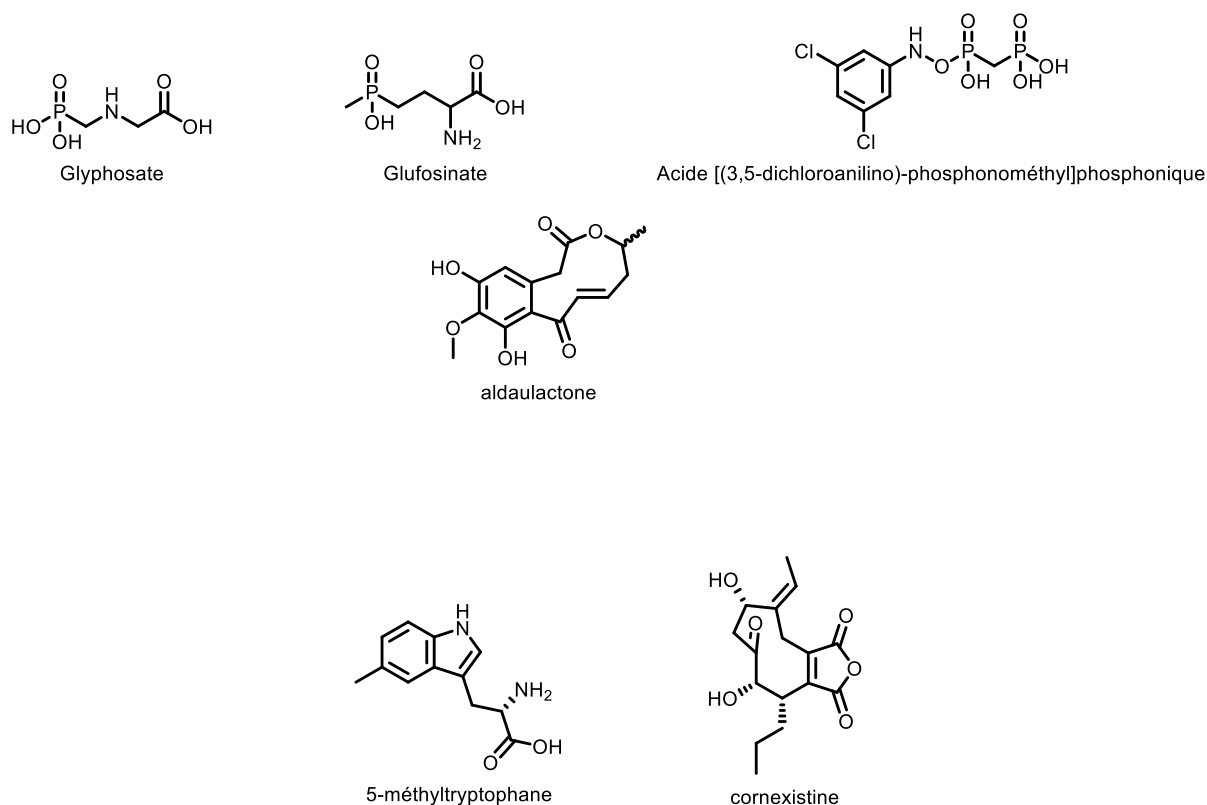


Figure 11 : Exemples de structures d'inhibiteurs de la biosynthèse des acides aminés

III.4 Biosynthèse de la paroi cellulaire

L'élaboration de nouvelles parois cellulaires et leur expansion sont indispensables à la croissance et au développement des plantes. A ce titre, la cellulose est le constituant majoritaire de la paroi des cellules végétales (O'sullivan, 1997). L'inhibition de la synthèse de cellulose est donc un mode d'action important pour bloquer la croissance et entraîner la mort de la plante. La biosynthèse de cellulose se produit au niveau de la membrane plasmique grâce à des complexes cellulose-synthase (CSC) dont la protéine cellulose synthase A (CESA) permet la conversion de l'UDP-glucose en cellulose (Carpita, 2011; Tateno et al., 2016). Plusieurs molécules phytotoxiques ont comme mode d'action l'inhibition de la synthèse de cellulose, et illustrent différents mécanismes conduisant à la réduction de la synthèse de la paroi (Figure 12). D'un côté, l'isoxabène, qui appartient à la famille des benzamides, induit un défaut d'adressage et une déplétion des complexes CSC au niveau de la membrane plasmique (Bischoff et al., 2010). Dans le même temps, les complexes CSCs ne pouvant s'intégrer dans la membrane, s'accumulent dans les vésicules cytosoliques. D'un autre côté, le 2,6-dichlorobenzonitrile, employé comme herbicide, entraîne une accumulation de CESA dans la membrane plasmique, qui altère le déplacement des CSCs dans la membrane, indispensable au dépôt des fibrilles de cellulose (DeBolt et al., 2007). Enfin, l'indaziflam, un

herbicide de pré-levée, perturbe l'interaction entre les complexes CSC et les microtubules et provoque inhibition de croissance et gonflement des tissus (Brabham et al., 2014).

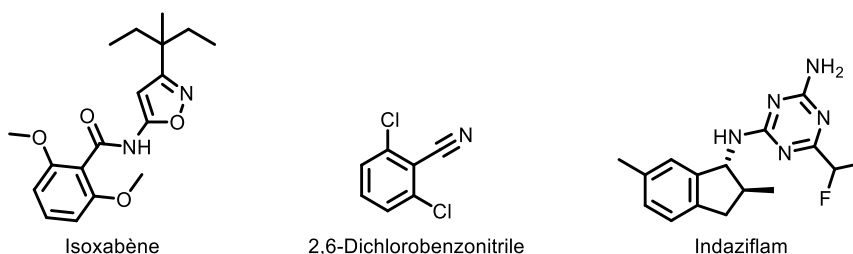


Figure 12 : Exemples de structures d'inhibiteurs de la biosynthèse de la cellulose

III.5 Biosynthèse des lipides

Les lipides interviennent dans la structure (membranes, cuticule), le stockage de carbohydrates et la signalisation intracellulaire. Les acides gras sont des composants communs de la plupart des lipides (phosphoglycérolipides, glycolipides, sphingolipides, triglycérides, cutine, cires, subérine) et les précurseurs de différentes molécules de signalisation (oxylipines, jasmonate) (Kim, 2020; Papackova and Cahova, 2015; Wasternack, 2004). L'inhibition de la biosynthèse des acides gras, et plus généralement des lipides cellulaires, a donc des conséquences multiples et importantes sur la croissance, la reproduction et la survie des plantes. La synthèse des acides gras s'effectue dans les plastes (Figure 13). Plusieurs enzymes participant à la biosynthèse des acides gras sont cibles de molécules phytotoxiques. La première enzyme intervenant dans la biosynthèse des acides gras est l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) qui catalyse la synthèse de malonyl-CoA. Cette réaction est inhibée par différentes cyclohexadiones ou aryloxyphénoxyproponiates, particulièrement chez les Dicotylédones disposant de la forme eukaryotique de cette enzyme, qui présente une plus forte affinité pour ces composés (Devine and Shukla, 2000; Rendina and Felts, 1988). Les acides gras sont synthétisés par un complexe enzymatique (FAS, Fatty Acid Synthase) qui permet l'allongement progressif de la chaîne aliphatique par condensation successive de molécules de malonyl-CoA. La FAS de type II présente une énoyl-ACP réductase participant à cette réaction d'élongation (Dayan and Duke, 2014). Cette enzyme est la cible du triclosane, un diphenyléther perturbant l'intégrité des membranes plasmiques et utilisé pour ses propriétés anti-bactériennes (McMurry et al., 1998; Villalaín et al., 2001). La cypérine, un diphenyléther issu de champignons pathogènes comme *Preussia fleischhაკii*, est également un inhibiteur de l'énoyl-ACP réductase (Dayan et al., 2008; Weber and Gloer, 1988). Une fois les chaînes aliphatiques étendues à 16 ou 18 carbones, les acides gras sont

libérés de leurs protéines-vectrices (ACP, Acyl-Carrier Protein) par des thioestérases (FAT, Fatty Acyl Thioesterase). Les acides gras libres peuvent alors être exportés des plastes sous forme d'acyl-CoA. L'activité des FATs est inhibée par la cinméthylène, un analogue benzyléther du 1,4-cinéole, qui entraîne une réduction de l'abondance des acides gras à 16 et 18 carbones (Campe et al., 2018; Dayan, 2019). Certains acides gras libres peuvent subir un processus d'élongation supplémentaire pour générer des acides gras à très longue chaîne, intervenant dans la synthèse de la cutine, des cires et de la subérine (Koch and Barthlott, 2006; Post-Beittenmiller, 1996). Ces réactions ont lieu dans le réticulum endoplasmique et font intervenir des élongases spécifiques (Very Long Chain Fatty Acid (VLCFA) élongases). Différents herbicides de la famille des chloroactétanilides, tétrazolinone, thiocarbamates et oxyacétamides inhibent l'activité des VLCFA élongases et déclenchent un arrêt de la division cellulaire et de la croissance de la plante (Trenkamp et al., 2004).

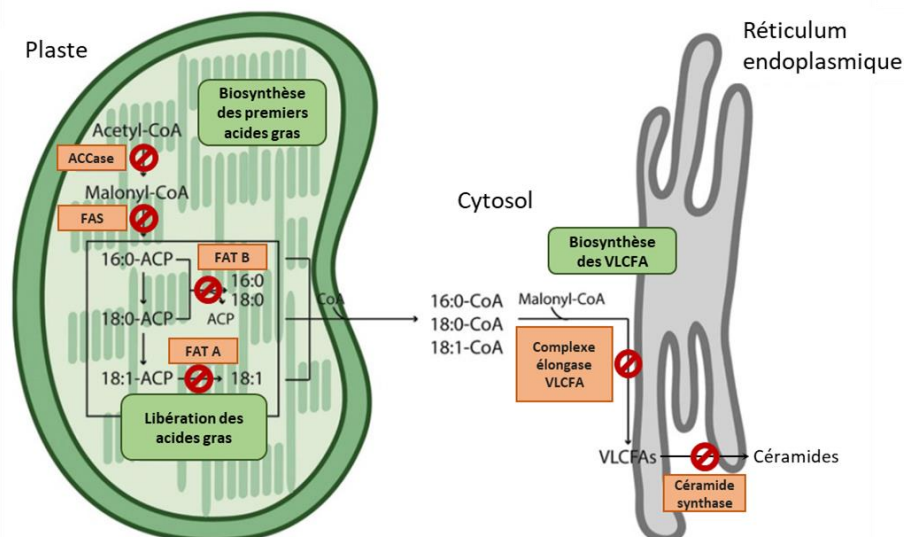


Figure 13 : Vue d'ensemble de la biosynthèse des acides gras. Les enzymes ciblées par des molécules phytotoxiques sont représentées en orange. (Adapté de Campe et al., 2018)

Les acides gras à très longues chaînes sont également impliqués dans la biosynthèse des sphingolipides. Les sphingolipides sont des constituants des membranes cellulaires (Abbas et al., 2002). Certains sphingolipides sont également impliqués dans la signalisation et sont des médiateurs de l'induction de la mort cellulaire (Zeng et al., 2022). Les céramides sont les précurseurs des sphingolipides membranaires complexes et sont formés d'une base sphingoïde (sphingosine, phytosphingosine, ...) estérifiée par un acide gras à longue chaîne (Figure 15). Des toxines produites par *Alternaria alternata* et *Fusarium spp.* (fumonisines) inhibent l'activité céramides synthase et induisent la mort cellulaire (Abbas et al., 1994). Ces

molécules phytotoxiques sont des analogues structuraux du substrat naturel de l'enzyme, la sphingosine. Bien qu'envisagée, la possible utilisation de ces toxines en tant qu'herbicide a été abandonnée au regard de leur forte toxicité chez les animaux (Abbas et al., 2002; Voss and Riley, 2013).

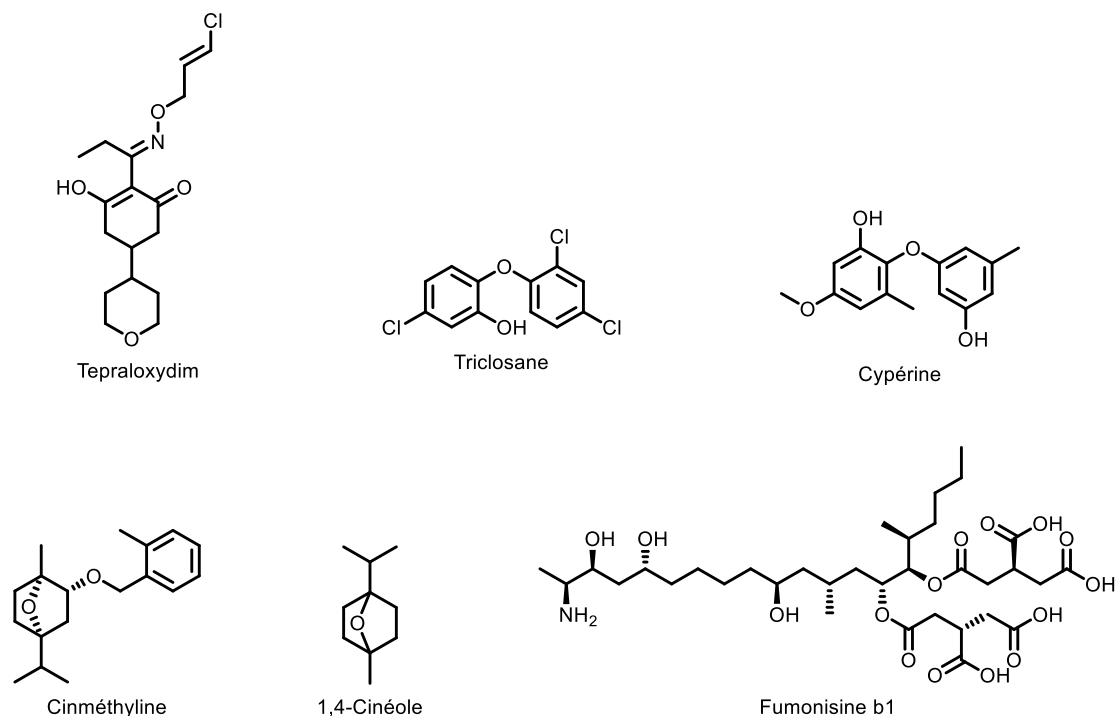


Figure 14 : Exemples de structures d'inhibiteurs de la biosynthèse des lipides

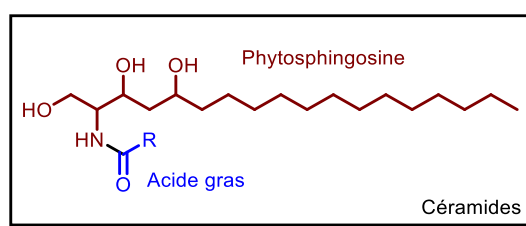


Figure 15 : Structure des céramides

III.6 Perturbation des membranes plasmiques

L'effet des inhibiteurs présentés au paragraphe précédent s'accompagne d'une altération importante des membranes, en lien avec les défauts de synthèse des lipides entrant dans leur structure. Cependant, certaines molécules phytotoxiques altèrent de manière directe l'intégrité membranaire des cellules (Figure 16). C'est le cas de la syringomycine, un lipodepsinonapeptide amphiphile produit par *Pseudomonas syringae*, qui induit l'apparition de pores dans la membrane, entraînant une fuite des électrolytes et une nécrose des tissus

végétaux (Backman and DeVay, 1971). Le mécanisme d'action qui implique l'assemblage des syringomycines en structure macromoléculaire (pore) est également observé dans le cas de la béticoline, un composé fongique produit par *Cercospora beticola* (Ducret et al., 1996; Goudet et al., 2000; Malev et al., 2001). Comme évoqué à plusieurs reprises, de nombreuses molécules phytotoxiques altèrent l'intégrité des membranes *via* la peroxydation des lipides membranaires. Ce phénomène est consécutif à la formation exacerbée et incontrôlée de ROS (stress oxydatif). Ce mode d'action est à la base de l'effet phytotoxique de la cercosporine, une toxine quinonique produite par le champignon phytopathogène *Cercospora kikuchii* activée par exposition à la lumière (Daub and Ehrenshaft, 2000). La sarmentine, une pyrrolidine issue de *Piper longum*, possède ce même mode d'action, mais peut également inhiber l'énoyl-ACP réductase et le PSII (Dayan et al., 2015; Huang et al., 2010). Enfin, l'acide pélargonique (C9:0), un acide gras libre de structure atypique (9 carbones) et utilisé comme désherbant, agit également sur des structures lipidiques et détruit la cuticule, induisant la dessiccation des tissus foliaires (Coleman and Penner, 2006; Lederer et al., 2004).

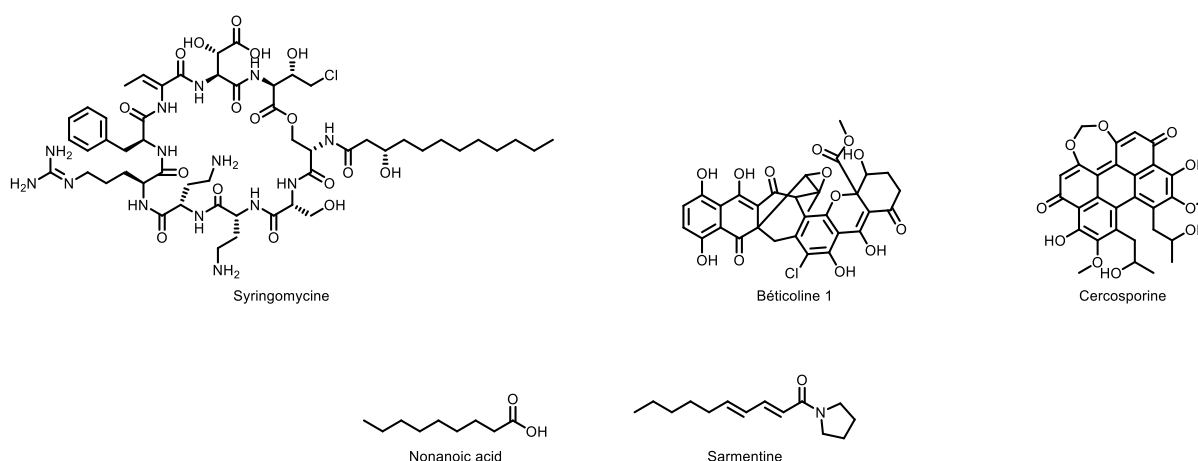


Figure 16 : Exemples de structures de molécules perturbatrices de la membrane plasmique

III.7 Autres modes d'action

Les exemples présentés couvrent les modes d'action les plus fréquemment rapportés pour les composés phytotoxiques, qu'il s'agisse d'herbicides de synthèse ou de molécules naturelles, incluant des composés allélopathiques. D'autres processus peuvent également être affectés, directement ou indirectement, incluant le métabolisme hormonal, la biosynthèse des acides nucléiques, ou l'assemblage et l'organisation des microtubules (Dayan, 2019; Dayan and Duke, 2014). Le comité d'action sur les résistances aux herbicides (HRAC) a ainsi défini 31 classes d'herbicides différenciés par leur mode d'action spécifique (Heap, 2023). Bien

que ce nombre puisse paraître important, il est à relativiser. En effet, compte tenu de la diversité des voies métaboliques et du nombre d'enzymes impliquées, la majeure partie des herbicides connus et les plus utilisés ciblent un nombre restreint de processus. Ce constat est à mettre au regard de l'émergence importante de résistances qui restreignent l'utilisation de certains herbicides ou nécessitent leur combinaison avec d'autres molécules (Beffa et al., 2019; Dayan, 2019). La découverte de nouvelles molécules bioactives, et, idéalement, au mode d'action original, est donc un objectif permanent. A ce titre, les molécules naturelles, de par leur diversité structurale, apparaissent comme une source d'innovation importante. De plus, dans un contexte sociétal et réglementaire où les enjeux environnementaux vont peser plus fortement dans les orientations phytosanitaires, ils représentent une opportunité de développer des solutions de traitement plus respectueuses de l'environnement.

IV Les bryophytes en tant que source de molécules bioactives

IV.1 Plasticité des bryophytes

Les bryophytes sont les plus proches descendants vivants de l'ancêtre commun des plantes terrestres (Delwiche and Cooper, 2015). De ce fait, elles ont conservé une biologie de plantes pionnières, et des caractéristiques associées avec la colonisation du milieu terrestre. On les retrouve en effet dans tous les types d'écosystèmes (Tuba et al., 2011). L'embranchement des bryophytes inclue les anthocérotes (*Anthocerotophyta*, 250 espèces), les hépatiques (*Marchantiophyta*, 7 000 espèces) et les mousses (*Bryophyta*, 12 000 espèces) (Martínez-Abaigar and Núñez-Olivera, 2021). Ce sont des organismes de petite taille, non-vascularisés, dépourvus de racines, feuilles ou tiges vraies. Ils possèdent en revanche des rhizoïdes qui leur permettent de s'accrocher à des surfaces comme les roches ou l'écorce des arbres. Leur structure (pas de cuticule, pas ou peu de stomates) les rend favorable aux milieux humides bien que les bryophytes soient représentés dans différents types d'écosystèmes, à l'exception des milieux salins tels que les océans (Harris et al., 2020; Tuba et al., 2011). Ils peuvent notamment tolérer des périodes de dessiccation, en suspendant leur activité métabolique (Gignac, 2001).

Les bryophytes présentent en outre une remarquable diversité de métabolites spécialisés (Asakawa and Ludwiczuk, 2018). Ce réservoir de molécules bioactives pourrait participer à l'adaptation des bryophytes à leur environnement biotique (répulsion des herbivores, défense contre les pathogènes) et abiotique (tolérance au stress hydrique, température, ...). D'un point de vue appliqué, bien que moins valorisé que celui des Angiospermes, sans doute du fait des difficultés à récolter ou cultiver ces espèces, les

bryophytes apparaissent comme une source d'intérêt pour la recherche de nouvelles molécules bioactives (Asakawa and Ludwiczuk, 2018).

IV.2 Métabolites spécialisés bioactifs des bryophytes

Plus de 3 000 métabolites spécialisés isolés à partir de bryophytes ont été identifiés. Parmi ceux-ci, plus des deux tiers (2200) sont des terpénoïdes (Martínez-Abaigar and Núñez-Olivera, 2021). Les classes de molécules les plus fréquemment retrouvées sont les monoterpènes, diterpénoïdes, sesquiterpénoïdes, triterpénoïdes, les bibenzyles et bis-bibenzyles, les composés aromatiques, les flavones et flavonones, les acétoginines, les stéroïdes et les lipides (Asakawa et al., 2013a; Asakawa and Ludwiczuk, 2018; Ludwiczuk and Asakawa, 2019; Martínez-Abaigar and Núñez-Olivera, 2021; Romani et al., 2022). Si l'activité biologique de ces molécules n'a le plus souvent jamais été étudiée, certains ont été caractérisés pour leur activité antibactérienne et/ou fongique, leur cytotoxicité ou leurs propriétés insecticides et molluscicides (Dziwak et al., 2022) (Tableau 1). Quelques molécules sont également connues pour leurs effets sur les plantes, phytotoxique ou bio-stimulant, améliorant la tolérance au froid ou à la sécheresse (Dziwak et al., 2022).

Tableau 1 : Effets biologiques de molécules issues des bryophytes en fonction de leur structure chimique (adapté de Dziwak et al., 2022)

Classes chimiques	Antibactérien et fongicide	Insecticide et molluscicide	Phytotoxique	Tolérance au froid	Tolérance à la sécheresse	Anti-UV
Benzénoïdes	+			+		+
Bibenzyles and bis(bibenzyles)	+	+		+	+	+
Dérivés d'acides gras	+				+	
Flavonoïdes	+			+		+
Phénylpropanoïdes				+	+	+
Terpènes et terpénoïdes	+	+		+	+	

L'utilisation par la médecine traditionnelle des bryophytes et de leurs dérivés a été récemment compilée dans le cadre d'une analyse ethnobotanique réalisée sur plus d'une centaine d'espèces (Motti et al., 2023). Elle permet par exemple d'associer l'usage du genre *Sphagnum* pour panser les plaies aux molécules bioactives produites par ces espèces. Les

mousses du genre *Sphagnum* possèdent en effet des propriétés antimicrobiennes, associées à différents composés phénoliques et à la sphagnane, un polysaccharide analogue de la pectine (Painter, 2003). La sphagnane est une molécule non-cytotoxique, qui induit la mort des cellules bactériennes en les privant de leur nutriments (Painter, 1998; Stalheim et al., 2009). Cette action implique une réaction de glycation, dit de Maillard, entre la sphagnane et les acides aminés libres de certaines protéines ou composés toxiques sécrétés par les pathogènes (Painter, 2003).

Les bryophytes ont également fait l'objet d'études autour de leur potentiel de valorisation en tant que sources de molécules phytotoxiques (Commisso et al., 2021; Whitehead et al., 2018). Ces travaux ont été essentiellement développés dans le cadre d'études des relations allélopathiques, entre bryophytes et autres espèces végétales, et de la médiation chimique associées à ces phénomènes. Les principales molécules caractérisées comme phytotoxiques sont présentées dans le Tableau 2. En relation avec leur prédominance parmi les métabolites spécialisés identifiés dans chez les bryophytes, on retrouve ainsi de nombreux terpénoïdes, mais aussi des flavonoïdes ou des dérivés bibenzyliques.

Tableau 2 : Composés phytotoxiques issus de bryophytes (adapté de Whitehead et al., 2018)

Classe chimique		Molécules phytotoxiques	Références
Aromatiques	Flavonoïdes	vitéxine, apigénine, apigénine-7-O-triglycoside, lutéoline-7-O-neohesperidoside, saponarine, lucénine-2, bartramiaflavone	Basile et al. 2003
	Dérivés bibenzyliques	Acide lunularique, radulanine A	Huneck and Schreiber 1972, Zhang et al. 2019
	Composés phénoliques	Non-spécifiés	Soudzilovskaia et al. 2010
Terpénoïdes	Diterpènes	gymnocoline, scapanine, 16a-kaurénol	Huneck and Schreiber 1972
		perottetianal	Asakawa 1990
		momilactone A and B	Nozaki et al. 2007
	Sesquiterpénoïdes	driménol, longibornéol, longifolène	Huneck and Schreiber 1972
	Sesquiterpénoïdes, drimanes	polygodial	Asakawa 1982, 1990
	Sesquiterpénoïdes	germacrane, isobicycligernacrénal, lépidozane, lépidozénal, (+)-vitrénal	Ando and Matsuo 1984
	Lactones sesquiterpéniques, eudesmanolides	guaianolides, deoxyzaluzanin, diplophyllolide, 7 α -hydroxydiplophyllolide, 3-oxodiplophyllin, frullanolide	Asakawa and Takemoto 1979, Asakawa 1982, 1990
	Lactones sesquiterpéniques, germacranolides	zaluzanine C, zaluzanine D, 8 α -acétoxyzaluzanine C, 8 α -acétoxyzaluzanine D	Asakawa 1982, 1990
	Sesquiterpènes type sécoaromadendrane	plagiochiline A, plagiochiline C, ovalifoliénal, ovalifoliénalone, 9 α -acétoxyovalifoliénal	Ando and Matsuo 1984
	Trinorsesquiterpénoïdes	3-hydroxy- β -ionone	Kato-Noguchi and Seki 2010

Si elles sont présentes chez les bryophytes, certaines de ces molécules peuvent également être retrouvées dans d'autres classes de végétaux. C'est le cas des momilactones A et B, découvertes initialement dans les exsudats de racines de riz (*Oryza sativa*) (Kato et al., 1973; Takahashi et al., 1976). Ces diterpènes allélopathiques sont présents en grande quantité chez *Hypnum plumaeforme* (4-8 mg/kg) (Kato-Noguchi, 2009; Nozaki et al., 2007). La momilactone B est un inhibiteur de croissance et de germination efficace chez différentes espèces d'Angiospermes (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*), ainsi que chez la bryophyte *Physcomitrella subulata* (Nozaki et al., 2007). En revanche, elle n'a pas d'effet sur

la croissance d'*Hypnum*, suggérant un processus de détoxification propre à cette espèce (Nozaki et al., 2007). Plusieurs molécules issues d'hépatiques possèdent également des propriétés phytotoxiques, comme l'acide lunularique, un composé bibenzyle présentant des groupements phénoliques. Ce composé est connu pour sa capacité à inhiber la germination des graines (Huneck and Schreiber, 1972; Pryce, 1971). L'acide lunularique a été initialement isolé de *Lunularia cruciata*, mais a également été retrouvé chez d'autres organismes (autres hépatiques, algues, champignons). La similitude de structure, ainsi que ses propriétés d'inhibition de la germination, ont amené à rapprocher l'acide lunularique de l'acide abscissique, une phytohormone présente chez les plantes supérieures (Yoshikawa et al., 2002). L'acide lunularique est retrouvé chez toutes les hépatiques et intervient comme précurseur de la synthèse de composés bis-bibenzyles.

Le répertoire de métabolites spécialisés des bryophytes, et en particulier les composés à activité phytotoxique qu'elles produisent, joue un rôle important dans l'activité allélopathique de ces espèces (Michel et al., 2011a). En effet, différents travaux suggèrent que les différences de capacité allélopathiques observées entre bryophytes seraient la conséquence de différences de composition chimique (quantitative et qualitative) entre ces espèces, en particulier du point de vue des composés phénoliques, flavonoïdes, terpénoïdes ou bibenzyles synthétisés (Figure 17) (Inderjit, 1996; Michel et al., 2011a, 2011b). A ce titre, les hépatiques sont considérées comme particulièrement allélopathiques, comparées aux autres bryophytes (Asakawa, 2007; Xie and Lou, 2009). Ces capacités particulières sont à mettre en relation avec le répertoire, particulièrement varié et original, de molécules spécialisées que produisent ces espèces (Asakawa, 2007).

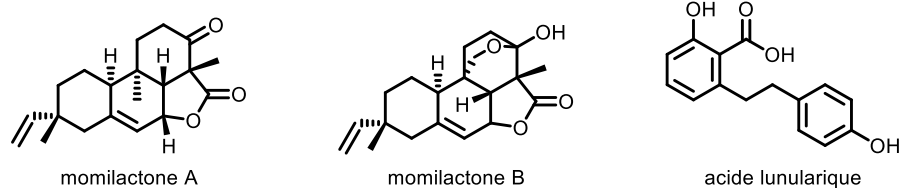


Figure 17 : Structures de molécules allélopathiques identifiées chez les bryophytes

IV.3 Les hépatiques, des sources de métabolites spécialisés originaux.

Au sein des espèces bryophytes, les hépatiques sont celles présentant la plus grande diversité chimique (Ludwiczuk and Asakawa, 2019). Cette diversité chimique est à mettre en relation avec la présence d'organites spécialisés, les oléocorps présents chez la plupart des hépatiques et spécifiques de ces bryophytes (Asakawa and Ludwiczuk, 2018). Les oléocorps

sont les plus anciennes structures sécrétoires identifiées à ce jour (Labandeira et al., 2014). Les différents clades d'hépatiques *i.e.* *Haplomtriopsida*, les *Marchantiopsida* et les *Jungermanniopsida* (Figure 20) peuvent être distingués par leur morphologie générale, ainsi que par l'abondance et les spécificités de leurs oléocorps (Schuster, 1992; Schuster and Hattori, 1954). Chez les *Marchantiopsida*, hépatiques à thalloïdes complexes, les oléocorps sont présents au sein de cellules spécialisées, les idioblastes. Au contraire, chez les *Jungermanniopsida* et les *Haplomtriopsida*, hépatiques à thalloïde ou feuillues, en fonction de l'espèce, chaque cellule contient un ou plusieurs oléocorps (Romani et al. 2022). Si certaines familles ne contiennent pas d'oléocorps, la présence de ces organites apparait comme un trait hérité de l'ancêtre commun de différents clades d'hépatiques (Romani et al., 2022; Yang, 1998). Plusieurs études illustrent l'importance de ces structures pour la défense des hépatiques vis-à-vis des herbivores. Les travaux historiques de Stahl suggéraient la préférence d'escargots pour des hépatiques dépourvues d'oléocorps (Stahl, 1888). Ils sont à rapprocher d'observation réalisées sur des fossiles de *Metzgeriothallus sharonae* sur lesquels les dommages liés aux arthropodes n'étaient observés que dans les parties de l'hépatique dépourvues d'oléocorps (Labandeira et al., 2014). Des études récentes menées sur des hépatiques mutantes ne possédant plus d'oléocorps ont montré une importante réduction des activités antibactérienne et antifongique de ces lignées (Romani et al., 2020; Wu et al., 2018). De façon générale, le rôle biologique des oléocorps est à rapprocher de leur fonction métabolique. En effet, ces organites sont non seulement un lieu de stockage, mais également le lieu de biosynthèse de nombreux métabolites spécialisés (Romani et al., 2020, 2022). C'est le cas pour les terpénoïdes (majoritairement sesquiterpénoïdes et diterpénoïdes) qui constituent plus de la moitié des métabolites spécialisés des hépatiques. C'est également le lieu de synthèse des bibenzyles et les bis-bibenzyles, composés aromatiques les plus abondants chez les hépatiques. Les propriétés antibactériennes, antifongiques et phytotoxiques des composés terpénoïdes, bibenzyliques et bis-bibenzyliques synthétisés et accumulés dans des oléocorps seraient donc à la base des capacités allélopathiques des hépatiques (Boonphong et al., 2007; Pryce, 1971; Romani et al., 2022).

Comme le montre la Figure 20 le répertoire de métabolites spécialisés varie grandement en fonction de la famille étudiée (Romani et al., 2022). De façon remarquable, certains sont spécifiques et n'ont été identifiés que chez hépatiques. C'est le cas par exemple des pinguisanes (naviculol et ptychanolide) aux propriétés inflammatoires (Figure 18) (Asakawa, 1995, 1982; Asakawa et al., 2013b). C'est également le cas de nombreux bis-bibenzyles (*e.g.* perrottetine E, marchantine A) dont les différentes espèces de *Marchantia* sont une source importante (Nandy and Dey, 2020) (Figure 19).

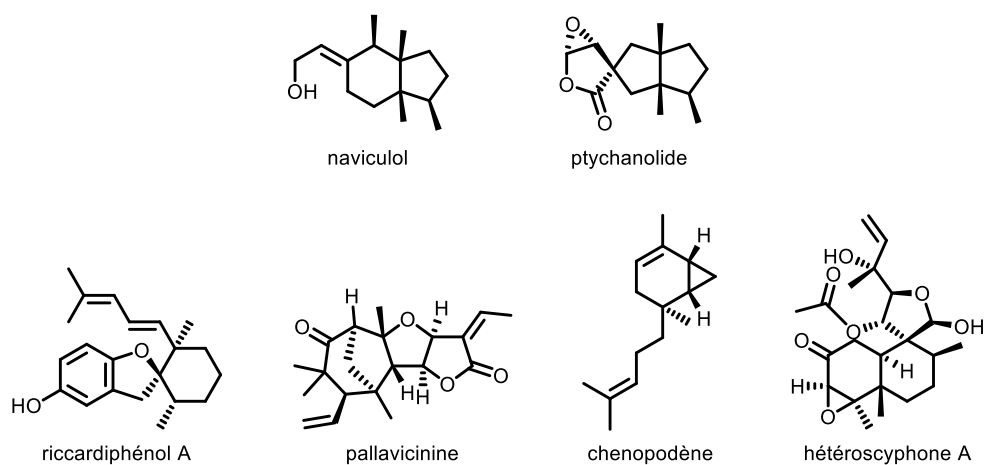


Figure 18 : Structures de métabolites spécialisés originaux identifiés chez les hépatiques

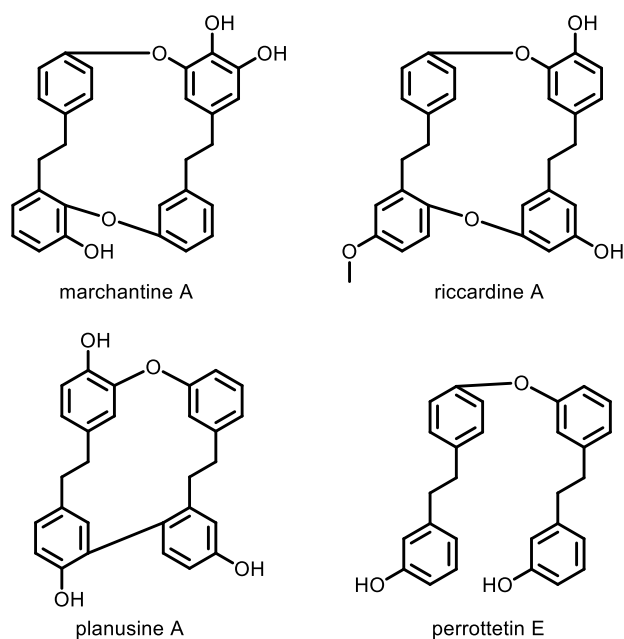


Figure 19 : Exemples de bis-benzyles présents chez les hépatiques

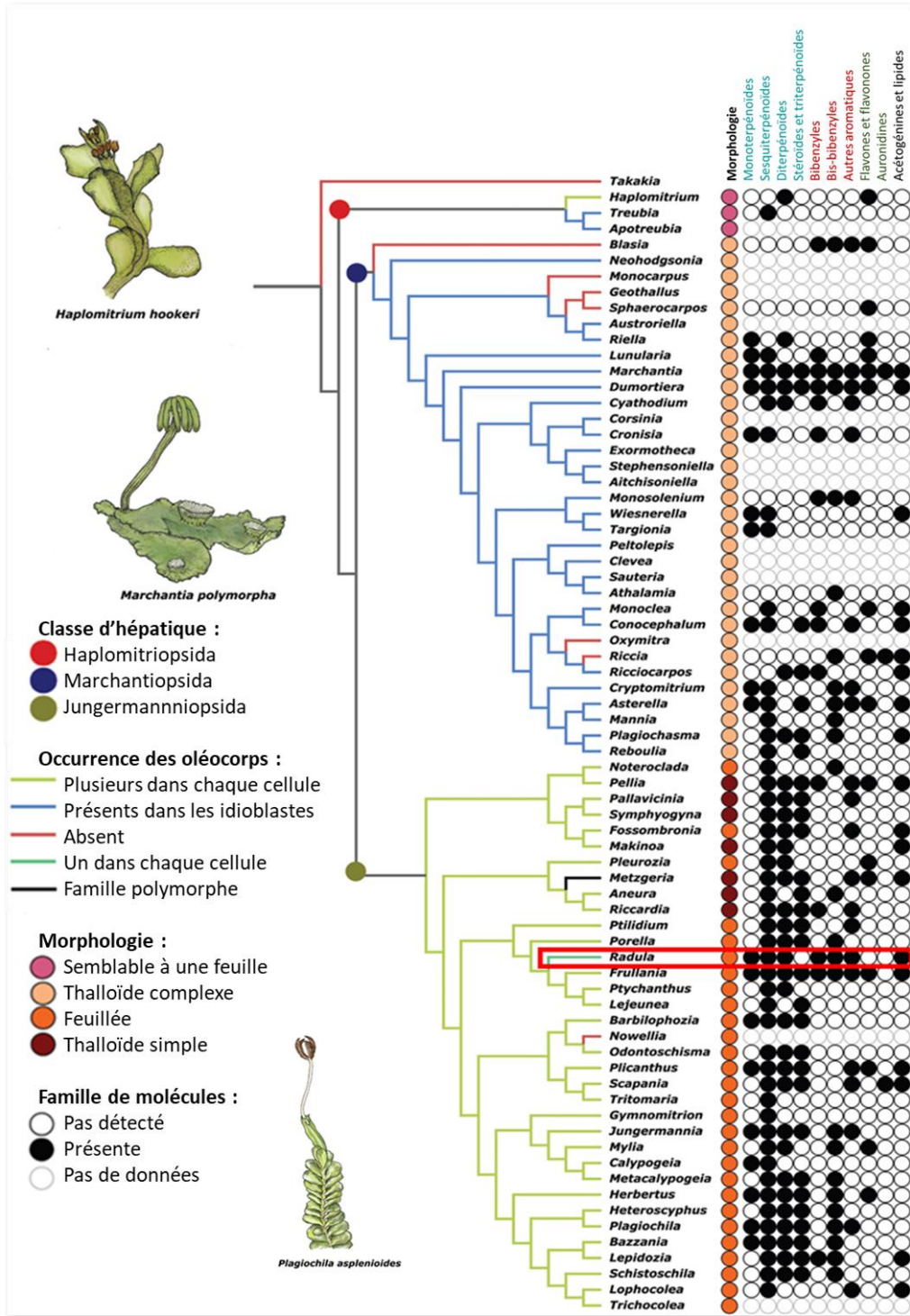


Figure 20 : Répartition et composition chimique des oléocorps dans les différents genres d'hépatiques (adapté de Romani et al. 2022). Le genre Radula est encadré en rouge.

IV.4 Les hépatiques du genre *Radula*

La famille des *Radulae* appartient au clade des *Jungermanniopsida* et se distingue par la présence d'un seul oléocorps par cellule (Asakawa et al., 2020; He et al., 2013; Romani et al., 2022). La phytochimie des *Radulae* a fait l'objet de nombreuses études, mettant en lumière leur composition riche en glycosides de flavones et en prénylbibenzyles (Asakawa et al., 2020; Figueiredo et al., 2009). De plus, les *Radulae* possèdent un répertoire de dérivés bibenzyliques important, en comparaison avec les autres hépatiques (Asakawa et al., 2020). Des études systématiques menées par Asakawa et ses collaborateurs sur différentes espèces de *Radulae* ont également permis la découverte de plus de 50 nouveaux motifs structuraux au sein de composés aromatiques, terpénoïdes et les polycétides (Asakawa, 1995, 1982; Asakawa et al., 2020). Bien que la composition de plus d'une dizaine d'espèces ait été caractérisée, *Radula perrottetii* est l'espèce dont la phytochimie a été la plus étudiée. L'intérêt pour cette espèce réside notamment dans la présence de cannabinoïdes : le perrottetinène et l'acide perrottetinénique (Toyota et al., 1994). Ces analogues du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) ne sont produits que par *R. perrottetii* et *R. marginata* et représentent donc l'une des seules occurrences d'analogues du THC biosynthétisés par une espèce autre que *Cannabis*.

Outre *R. perrottetii*, *Radula complanata* a également fait l'objet d'études phytochimiques approfondies. En effet, il s'agit d'une espèce ubiquitaire en terme de répartition géographique et écologique (Krayesky et al., 2018; Stevens, 1910). Ce caractère ubiquitaire a permis la comparaison d'échantillons collectés dans différents environnements et mis en évidence d'importantes variations de son métabolome en fonction des facteurs environnementaux abiotiques (Blatt-Janmaat et al., 2023). Cette étude met également en évidence l'impact de facteurs biotiques (notamment de l'arbre sur lequel l'hépatique se développe) sur le métabolome de l'individu (Blatt-Janmaat et al., 2023). Les variations observées concernent majoritairement des glycosides, flavonoïdes ou benzénoïdes, renforçant l'hypothèse du rôle de ces métabolites spécialisés pour la plasticité de *R. complanata*. En outre, la teneur de molécules bibenzyliques peut être modulée par application exogène de phytohormones (Blatt-Janmaat et al., 2022). Ainsi le traitement par des auxines (acide 1-naphtalénacétique) ou des cytokinines (6-benzylaminopurine), ainsi que par des hormones de stress comme l'ABA ou l'acide salicylique, conduit à une réduction de la production des bibenzyles étudiés (radulanines A, H et L, 4-prényldihydropinosylvine) (Blatt-Janmaat et al., 2022). Chez *M. polymorpha*, une augmentation de la teneur en bis-bibenzyles en réponse à l'ABA a également été observée (Kageyama et al., 2015). La biosynthèse des bibenzyles, e.g. perrottetinène chez *Radula sp.*, et des bis-bibenzyles, e.g. marchantine A chez *M. polymorpha*, qui implique les mêmes intermédiaires de synthèse, pourrait ainsi être

régulée de façon similaire (Gülck and Møller, 2020; Hussain et al., 2019, 2018; Takahashi and Asakawa, 2017). Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de perception et de réponse à l'ABA chez les hépatiques. Bien que les hépatiques ne produisent pas d'ABA, l'acide lunularique, qui possède une activité de phytohormone, pourrait être un régulateur endogène de la synthèse des bis-bibenzyles (Pryce, 1971). En revanche, le méthyl-jasmonate n'a aucun effet sur la production des différents bibenzyles (Blatt-Janmaat et al., 2022), en relation avec l'absence de jasmonate détecté chez les *Radulae*, et suggère que la voie de signalisation du jasmonate n'est pas fonctionnelle chez les *Radulae* (Horn et al., 2021).

V Structures et propriétés des radulanines et de leurs analogues structuraux

Parmi les structures bibenzyliques retrouvées chez les hépatiques, les radulanines sont caractéristiques du genre *Radula* (Asakawa, 2012; Wang et al., 2017). Ces quatorze composés nommés radulanines, dont la structure est présentée sur la Figure 21 sont des bibenzyles au noyau 2,5-dihydro-1-benzoxépine (en rouge), 1-benzoxépane (en vert) ou 3,4-cyclopropanochromane (en bleu) (Asakawa, 2012; Wang et al., 2017). Elles ne sont retrouvées que chez différentes espèces du genre *Radula*. Elles peuvent à ce titre être considérées comme des espèces chimiques marqueurs du genre *Radula*, et parfois d'une espèce spécifique. Par exemple, les radulanines M et N n'ont été identifiées *R. sumatrana*, tandis que la radulanine A, au centre de ce projet de thèse, a été isolé chez 12 espèces différentes de *Radula* (Tableau 3). Les radulanines sont particulièrement abondantes chez *R. javanica*, *R. complanata*, *R. sumatrana* et *R. tokiensis*.

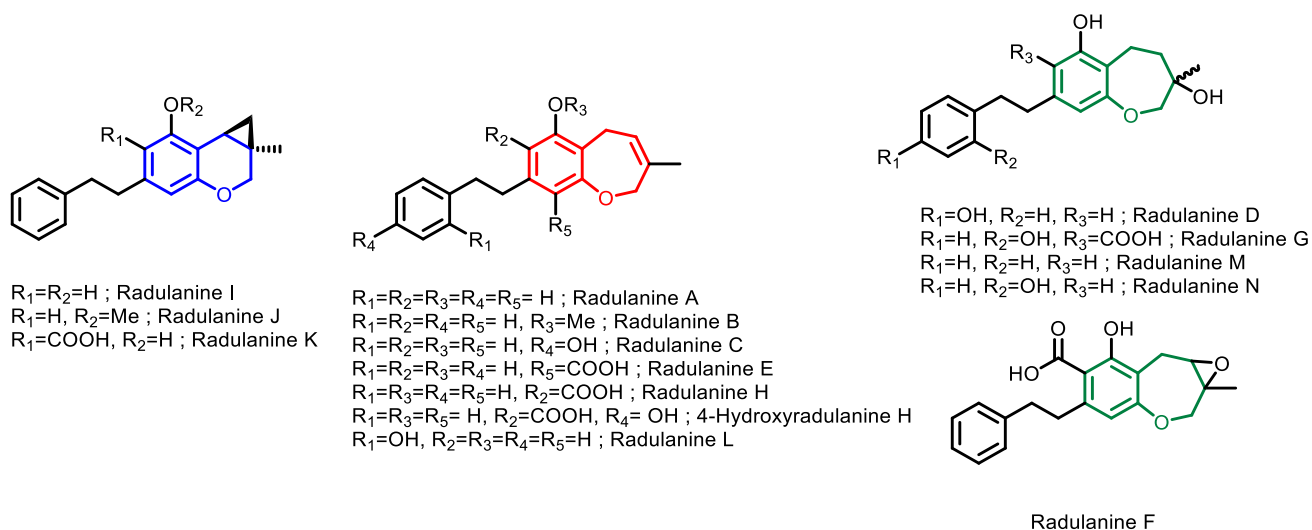


Figure 21 : Structure des différentes radulanines identifiées chez *Radula* sp.

Tableau 3 : Répartition des radulanines au sein des Radulae

	Radulanine A	Radulanine B	Radulanine C	Radulanine D	Radulanine E	Radulanine F	Radulanine G	Radulanine H	Radulanine I	Radulanine J	Radulanine K	Radulanine L	Radulanine M	Radulanine N
<i>R. amoena</i>														
<i>R. appressa</i>		•												•
<i>R. aquilegia</i>														
<i>R. boryana</i>														
<i>R. brunnea</i>														
<i>R. buccinifera</i>		•	•	•										
<i>R. carringtoni</i>						•								
<i>R. chinensis</i>														
<i>R. campanigera</i>									•					
<i>R. complanata</i>		•	•	•		•	•		•					
<i>R. constricta</i>		•							•	•			•	
<i>R. frondescens</i>						•								
<i>R. grandis</i>		•								•				
<i>R. holti</i>		•												
<i>R. japonica</i>						•			•					
<i>R. javanica</i>		•		•		•		•	•	•	•	•		
<i>R. jonesii</i>														
<i>R. kojana</i>		•	•						•					
<i>R. laxiramea</i>		•							•					
<i>R. lindenbergiana</i>														
<i>R. marginata</i>		•								•				
<i>R. nudicaulis</i>														
<i>R. obtusiloba</i>										•				
<i>R. okamurana</i>										•				
<i>R. oyamensis</i>														
<i>R. perrottetii</i>														
<i>R. sainsburiana</i>														
<i>R. sumatrana</i>		•								•	•		•	•
<i>R. tokiensis</i>		•		•	•					•			•	
<i>R. uvifera</i>														
<i>R. voluta</i>														
<i>R. wichurae</i>									•					

D'un point de vue biologique, peu d'informations sur la fonction des radulanines sont disponibles. Cependant, des études phytochimiques évaluant la bioactivité de certains composés issus des *Radulae* apportent des éléments intéressants sur la bioactivité de certaines radulanines. Les radulanines A et H ont ainsi été caractérisées comme des inhibiteurs de la calmoduline (Asakawa et al., 1991). La radulanine H a aussi été décrite comme inhibiteur de la 5-lipoxygénase, de la cyclooxygénase, et comme molécule aux propriétés antioxydantes (Asakawa et al., 1991). Ces propriétés n'ont en revanche pas été testées pour la radulanine A. Par ailleurs, l'activité antiparasitaire des bis-benzyles et des benzyles provenant des hépatiques a été étudiée. La radulanine A et, dans une moindre mesure, la radulanine H, possèdent également une activité anti-parasitaire vis-à-vis de *Trypanosoma brucei* avec une faible cytotoxicité (Otoguro et al., 2012). Il a aussi été décrit que les radulanines A et L inhibent la production de monoxyde d'azote lorsqu'elles sont appliquées sur des cellules animales RAW 264.7 traitées par des lipopolysaccharides qui

induisent une réponse inflammatoire (Harinantenaina et al., 2006). Il est suggéré que cette inhibition est directement due à l'activité antioxydante des molécules étudiées. Par ailleurs, la radulanine A a été identifiée par nos équipes comme molécule phytotoxique pour *Arabidopsis thaliana* (Figure 22), ainsi que la radulanine H (Nay et al., 2020; Zhang et al., 2019).

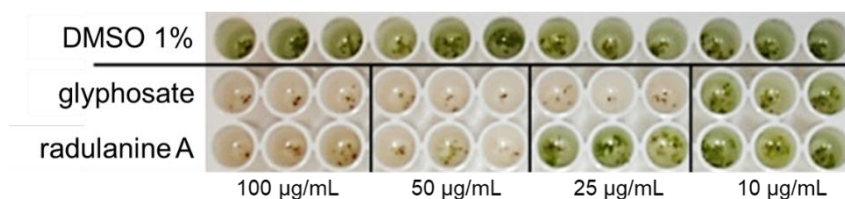


Figure 22 : Mise en évidence de la phytotoxicité de la radulanine A (adaptée de Zhang et al., 2019)

La radulanine A, dont l'étude fait l'objet de cette thèse, est composée d'un squelette bibenzyle, fusionné à un cycle 2,5-dihydrooxépine (Figure 21). Si sa structure globale est unique, on retrouve en revanche le cycle 2,5-dihydrooxépine dans des métabolites spécialisés produits par différentes espèces (Figure 23). Par exemple, le tournesol synthétise des héliannuols, dont certains possèdent aussi une structure 2,5-dihydro-1-benzoxépine, ou 1-benzoxépane (héliannuols B, C, D, F, I, et J). Ces héliannuols ont la capacité d'inhiber la croissance et la germination d'espèces mono- et dicotylédones (Macias et al., 1994). Ils ont aussi une capacité antioxydante, tout comme les ruscozépines A et B, molécules issues de *Rusci rhizoma* et possédant une structure phényl-1-benzoxépine (Barbič et al., 2012). Une structure apparentée est également retrouvée chez les ptérolones, des composés isolés de champignons des genres *Pterula* et *Mycena*. Ces composés présentent une parenté structurale avec la ptérolone, l'acide ptérolinique et la ptérolone B, des molécules incluant une structure 1-benzoxépine, parfois fusionnée à un hétérocycle (Engler et al., 1997; Grujters et al., 2002). L'acide ptérolinique ainsi que la ptérolone possèdent des propriétés antibiotiques et antifongiques, et leur mode d'action affecte la respiration mitochondriale en inhibant la NADH:ubiquinone réductase (Engler et al., 1997). La structure 1-benzoxépine est retrouvée au niveau de la pacharine et des bauhiniastatines, des molécules isolés de *Bauhinia purpurea* et *Bauhinia variegata* (Pettit et al., 2006; Reddy et al., 2003). Ces composés inhibent la croissance de cellules cancéreuses *in vitro* (Pettit et al., 2006). D'autres molécules bioactives possédant un cycle 1-benzoxépine ont également été isolées de *B. purpurea* et ont montré des activités antipaludique, antifongique, antiinflammatoire et cytotoxique (Boonphong et al., 2007).

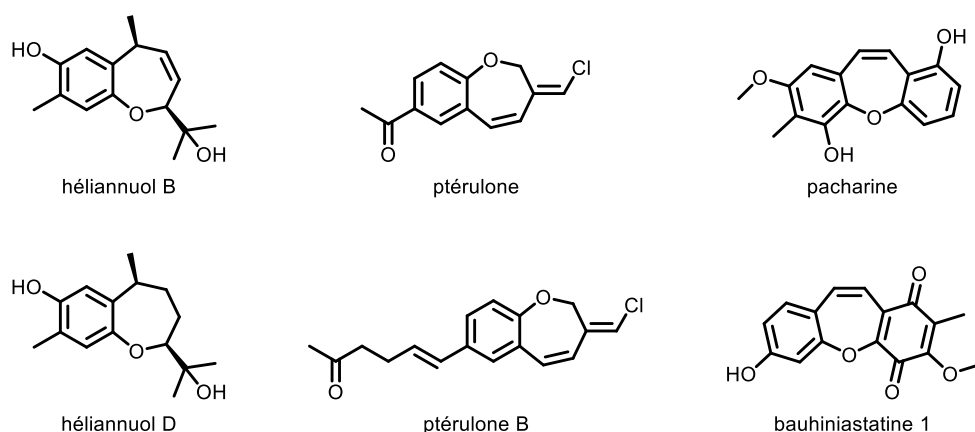


Figure 23 : Exemples de structures benzoxépines ou benzoxépanes

Parmi les molécules isolées par Boonphong et al., plusieurs composés bibenzyliques présentent une activité biologique similaire à celle des molécules pré-citées contenant une structure 1-benzoxépine (Boonphong et al., 2007). De manière intéressante, ces composés bibenzyliques sont aussi présents dans les hépatiques du genre *Radula* (Asakawa et al., 2020). En particulier, le gigantol ou la batasine III (Figure 24), ont montré des propriétés phytotoxiques sur *Amaranthus hypochondriacus* (Mata et al., 2007). Comme la radulanine A, l'érianine affecte l'activité de la calmoduline dans des cellules pulmonaires cancéreuses (P. Chen et al., 2020). Parmi les composés bibenzyliques incluant un hétérocycle, on retrouve le perrottétinène, déjà mentionné (Figure 24). Ce composé est un cannabinoïde issu de *Radula perrotteti*, *Radula marginata* et *Radula laxiramea* de structure similaire au Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) (Cullmann and Becker, 1999; Toyota et al., 2002, 1994). C'est une molécule psychoactive qui se lie aux récepteurs CB1 d'une manière similaire au THC (Chicca et al., 2018; Reis et al., 2020). Elle est composée d'une structure chromène, correspondant à un phényle fusionné à un hétérocycle à 6 chaînons, au lieu de 7 chaînons pour la 1-benzoxépine. Les chromènes sont présents dans de nombreux organismes et ont une diversité structurale importante amenant de nombreux effets biologiques (Raj and Lee, 2020). Certains chromènes tels que le quercinol ont montré des effets antiinflammatoires (Gebhardt et al., 2007). Comme la radulanine H, ce composé, isolé du champignon pathogène *Quercina daedalea*, inhibe les cyclooxygénases. De plus, c'est un inhibiteur de la 3α -hydroxystéroïde déshydrogénase, de la xanthine oxydase, et d'une peroxydase présente chez *Armoracia rusticana* (Pierce et al., 1995; Schlegel et al., 2003). Deux chromènes issus du champignon *Prionosciadium watsoni* présentent une activité phytotoxique sur *Lemna minor*, associée à une chlorose et une inhibition de la croissance (Valencia-Islas et al., 2002). D'une manière intéressante, comme la radulanine A, ces composés sont aussi des inhibiteurs de la calmoduline (Asakawa et al., 1991; Valencia-Islas et al., 2002).

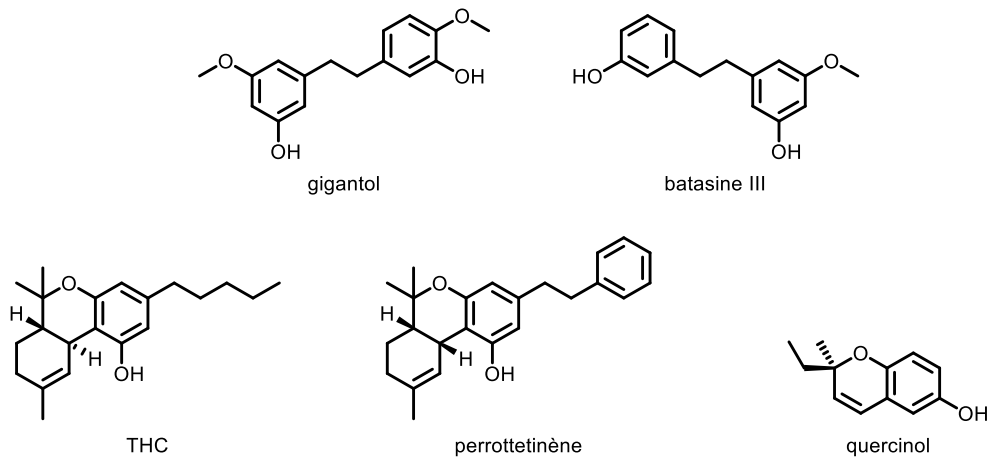


Figure 24 : Exemples de molécules bibenzylphénoliques et chromènes

VI Objectifs du projet de thèse

Bien que de nouvelles politiques tendent à restreindre leur usage, l'utilisation des herbicides reste centrale pour la conduite des cultures, l'entretien de espaces verts et des réseaux de communications (voies ferrées, aéroports), ou encore la lutte contre des plantes nuisibles (toxiques ou allergisantes). Elle est en particulier stratégique pour le maintien des rendements des grandes cultures, dans un contexte de croissance démographique constante. L'utilisation des molécules actives disponibles sur le marché, essentiellement synthétiques, est néanmoins questionnée, d'une part par l'émergence de résistances qui en limitent l'efficacité et le périmètre d'utilisation, d'autre part par un contexte sociétal en faveur de la recherche de solutions alternatives de gestion des adventices, plus respectueuses de l'environnement. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules à activité herbicide pouvant répondre à ces deux challenges est nécessaire (Dayan, 2019; Sparks and Bryant, 2021). A ce titre, les molécules phytotoxiques d'origine naturelle apparaissent comme une source à haut potentiel (Beffa et al., 2019; Peters and Streck, 2018; Peterson et al., 2018). D'une part, ces molécules couvrent une immense diversité chimique et peuvent utiliser des modes d'action susceptibles d'échapper aux résistances acquises par les adventices (Dayan and Duke, 2014). D'autre part, bien que l'origine naturelle de ces composés n'assure pas une moindre (éco)toxicité, leur rémanence, en particulier dans les sols, peut s'avérer plus faible, grâce à leur dégradation plus facile au sein de la rhizosphère.

Dans ce contexte, la découverte de l'activité phytotoxique de la radulanine A par nos équipes en 2019 a mis en lumière le potentiel herbicide d'une nouvelle classe de composés naturel (Zhang et al., 2019). Sur la base de ces travaux, l'utilisation de la radulanine A et autres 2,5-dihydrobenzoxépinines en tant qu'herbicides potentiels d'origine naturelle a été breveté (Nay et al., 2020). Cependant, les travaux réalisés n'apportaient pas d'information sur le mode d'action de cette molécule. L'objectif majeur de ce projet de thèse a donc été d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes sous-tendant la phytotoxicité de la radulanine A. Les observations initiales de la toxicité ayant été effectuées sur cette espèce, le projet a été mené sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Un verrou majeur pour aborder cette étude était la faible quantité de radulanine A disponible. En effet, si la méthode originale de synthèse développée par Zhang et al. permettait une synthèse totale de la molécule au laboratoire, les rendements atteints n'étaient pas suffisants pour générer les quantités de composé nécessaires (Zhang et al., 2019). Une partie préliminaire du projet, présentée dans le premier chapitre des résultats de cette thèse et mise en œuvre dans l'équipe de B. Nay, a donc eu pour but de développer une méthode de synthèse alternative, utilisant moins d'étapes et présentant un rendement plus élevé. Le

développement de cette méthode a également permis de synthétiser une série de précurseurs et d'analogues de la radulanine A, utilisés dans la suite du projet pour initier une étude structure-fonction de l'activité de la radulanine A.

L'étude du mode d'action de la radulanine A a été abordée en premier lieu par une analyse ciblée de son effet sur l'activité photosynthétique, et est présentée dans le second chapitre des résultats. Comme illustré dans l'introduction, un nombre important de composés de synthèse ou d'origine naturelle exercent leur activité phytotoxique au travers de l'inhibition de la photosynthèse. La mise en évidence de l'effet inhibiteur de la radulanine A sur la photosynthèse a par ailleurs permis d'utiliser cet effet pour tester la bioactivité des précurseurs et analogues de la radulanine A.

Enfin, cette étude a été complétée par une analyse sans a priori du métabolome des plantes traitées, développé dans le troisième chapitre de résultats. Sur la base des éléments acquis au travers de l'étude structure-fonction, un choix a été fait de développer l'analyse métabolomique en utilisant un composé chromène bioactif et plus facilement disponible que la radulanine A.

L'ensemble des données acquises apportent un éclairage important sur le mode d'action de la radulanine A et de ses analogues chromène en tant qu'inhibiteurs de la photosynthèse. Il confirme également l'intérêt de substances d'origine naturelles issues d'espèces peu valorisées, ici les hépatiques, dans le développement de nouvelles solutions herbicides.

Chapitre I : Synthèse totale de la radulanine A et d'analogues structuraux

I Historique et mise en contexte

I.1 Historique des procédés de synthèse totale

Le noyau 2,5-dihydrobenzoxépine présent au sein des radulanines est un système bicyclique fusionné entre un groupement 2,5-dihydrooxépine et un groupement phényle. Il est donc composé d'un hétérocycle à 7 chaînons incluant un oxygène. Cette fonction assez originale a pu être retrouvée dans différents composés naturels tels que la radulanine A (1), et a ainsi attiré l'intérêt de plusieurs chimistes organiciens avant nos travaux pour le défi de synthèse qu'elle représente (Figure 25). La radulanine A (1) a été découverte pour la première fois en 1978 au sein de *Radula javanica* (anciennement *R. variabilis*) (Asakawa et al., 1978b), et *R. complanata* (Asakawa et al., 1978a). De nos jours, cette molécule a été répertoriée dans 12 espèces sur 36 étudiées du genre *Radula* (Asakawa et al., 2020). Avant les travaux accomplis durant mon projet de thèse, trois approches distinctes avaient déjà été développées afin de synthétiser la radulanine A. Ces méthodes de synthèse sont présentées ci-dessous.

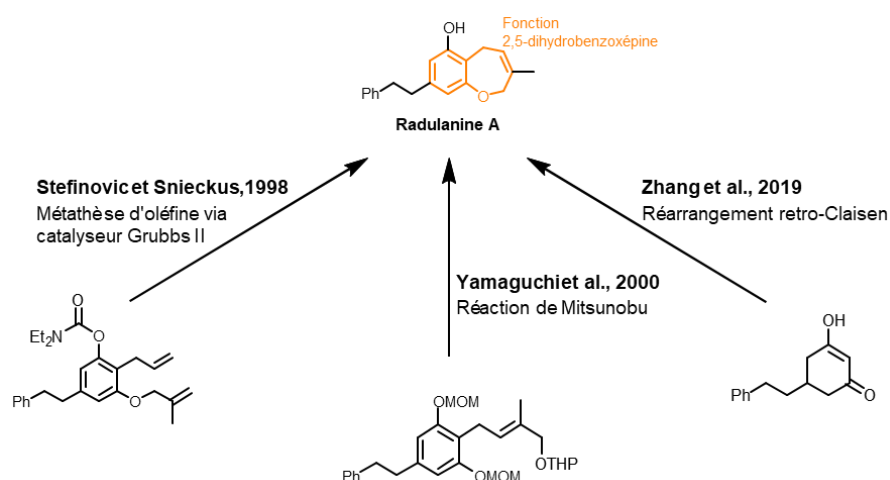
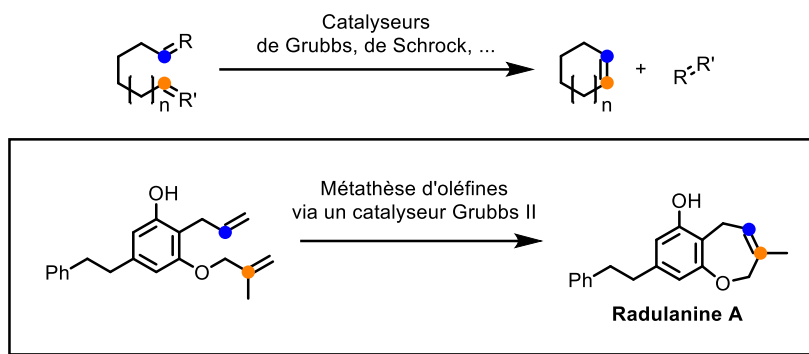


Figure 25 : Techniques utilisées pour la synthèse du cycle 2,5-dihydrobenzoxépine de la radulanine A (1)

- **Synthèses utilisant une cyclisation par métathèse d'oléfines**

L'une des grandes réactions ayant révolutionné la chimie organique durant les dernières décennies est la métathèse d'oléfines par des catalyseurs à base de ruthénium (catalyseurs de Grubbs) ou de molybdène (catalyseurs de Schrock) (Casey, 2006; Grubbs, 2004; Schrock and Hoveyda, 2003). Cette réaction permet un échange de structures entre

deux groupements alcènes. La métathèse peut être ainsi utilisée pour cycliser un composé comportant deux alcènes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).



Cette avancée aura valu le prix Nobel à Robert Grubbs, Richard R. Schrock et Yves Chauvin en 2005 (Grubbs, 2006). Depuis la commercialisation de ces catalyseurs dans les années 90 et leurs utilisations pour le traitement d'oléfines, de nombreux travaux ont été effectués afin de valoriser cet outil au sein des laboratoires de recherche. La métathèse d'oléfines utilisant des catalyseurs au ruthénium dispose d'une haute valeur ajoutée dans le domaine de la synthèse totale, ayant ouvert la voie à de nouvelles stratégies de construction. En effet, cette réaction peut être employée pour une fermeture de cycle ou pour l'ajout d'un fragment moléculaire dans des conditions relativement douce, ce qui est idéal en fin de synthèse.

Vingt ans après la découverte de la radulanine A (**1**) au sein des hépatiques, Stefinovic et Snieckus se sont intéressés à l'utilisation des catalyseurs de Grubbs pour la synthèse d'hétérocycles benzannulés (Stefinovic and Snieckus, 1998). Bien que la réaction de fermeture de cycle par métathèse ait déjà été étudiée pour divers types de structure cyclique, la synthèse d'hétérocycles fusionnés à des cycles aromatiques par cette réaction restait encore à être étudiée. Stefinovic et Snieckus ont ainsi développé cette méthodologie et l'ont appliquée à la synthèse totale de deux composés naturels : l'(\pm)-hélianane, issu de *Haliclona fascigera*, et la radulanine A (**1**), issu de certaines espèces du genre *Radula* (Figure 26).

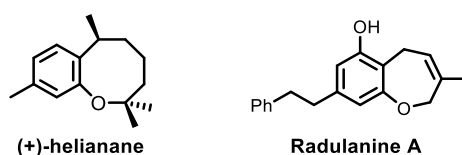


Figure 26 : Structures des composés naturels synthétisés par Stefinovic et Snieckus

La synthèse totale de la radulanine A (**1**) selon Stefinovic et Snieckus débute à partir du 3,5-diméthoxybenzaldéhyde **14** (Figure 27). Une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons

avec le benzylphosphonate de diéthyle et une hydrogénation catalytique permettent l'obtention de l'éther diméthylique de la dihydropinosylvine. Le composé est ensuite déméthylé sur l'une des deux fonctions éthers, afin de protéger le phénol résultant par une fonction diéthylcarbamate. Une déprotonation en présence de *s*-BuLi sur Sni-I en *para* de la chaîne phényléthyle, suivie de la formation d'un réactif de Grignard permettent l'allylation en présence de bromure d'allyle pour la synthèse de Sni-II. Ensuite, le composé est déméthylé par ajout de BBr₃ dans le chloroforme. Une alkylation en présence de chlorure d'isobutényle et de K₂CO₃ dans le DMF permet d'obtenir Sni-III. Ce composé subit alors la fermeture de cycle par métathèse en présence du catalyseur de Grubbs de seconde génération, permettant l'obtention de la radulanine A (1) protégée. La dernière étape de déprotection de la fonction O-carbamate permet d'obtenir la radulanine A (1). Cette synthèse, de 11 étapes au total, fut la première synthèse totale de la radulanine A (1), avec un rendement global de 14 %. Par ailleurs, l'utilisation de la fermeture de cycle par métathèse a aussi été appliquée à la synthèse totale des radulanines H et E par Yoshida et al. (Figure 28) (Yoshida et al., 2009).

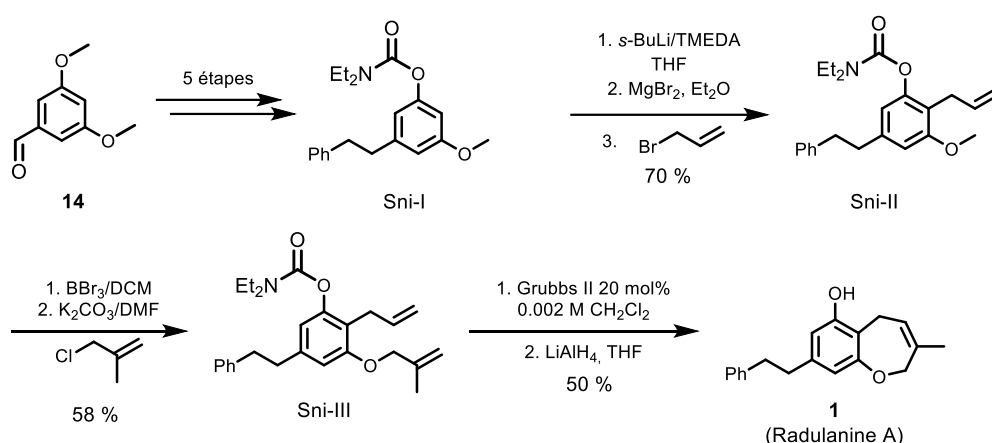


Figure 27 : Voie de synthèse développée par Stefinovic et Snieckus, utilisant une métathèse d'oléfine par catalyseur Grubbs II

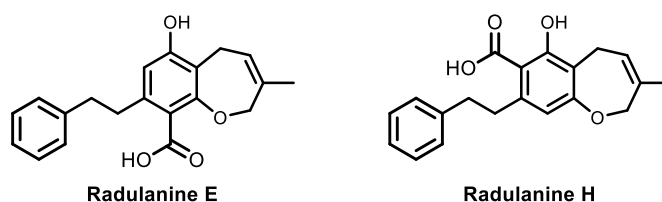


Figure 28 : Radulanines synthétisées par Yoshida et al.

- **Synthèse utilisant une réaction de Mitsunobu**

Deux années plus tard, Yamaguchi et al. publient une nouvelle synthèse de la radulanine A (1) et d'autres composés en utilisant une réaction de Mitsunobu. Pour mettre en place leur stratégie de synthèse, Yamaguchi et al. ont supposé que la voie de biosynthèse passerait par une cyclisation du même type. Cette réaction consiste en la substitution nucléophile d'un groupement hydroxyle (activé en présence d'azodicarboxylate de diéthyle ou DEAD, et de triphénylphosphine) ici par un phénol pour former une liaison C–O (Figure 29).

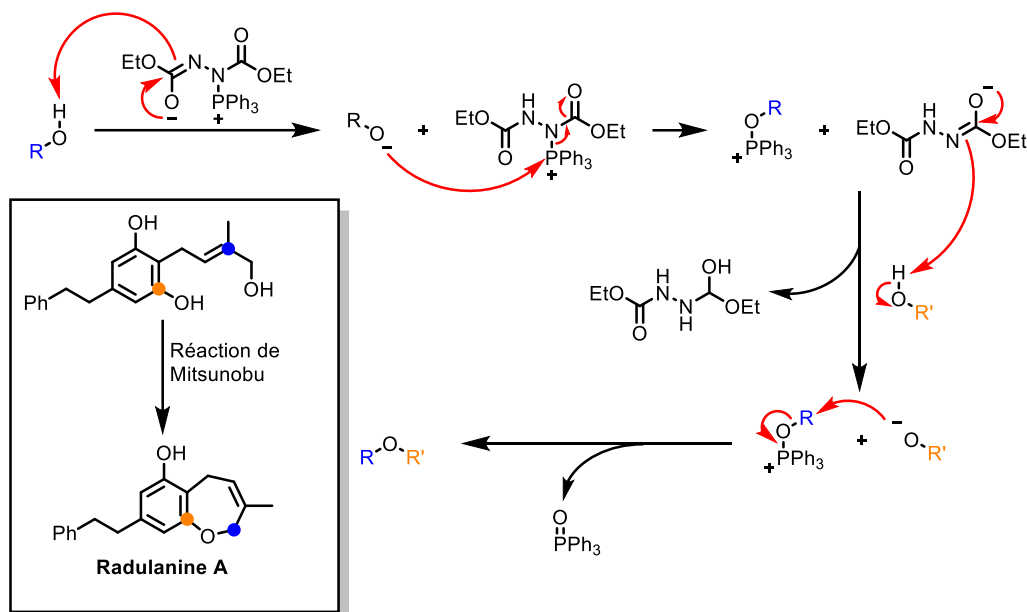


Figure 29 : Principe de la réaction de Mitsunobu

Cette stratégie de synthèse débute par la dihydropinosylvine diméthylée Mit-I, molécule retrouvée au cours de la synthèse totale précédente, disponible en début de synthèse cette fois (Figure 31). Une formylation après déprotonation par *s*-BuLi en présence de DMF a été employée, suivie d'une substitution des groupements O-méthyles par deux groupements MOM. L'aldéhyde Mit-III a ensuite été réduit par LiAlH_4 puis le groupement hydroxyle est substitué par un brome issu de PBr_3 . Cette bromation a permis l'emploi d'un couplage de Stille avec un stannane pour obtenir Mit-IV. Après déprotection des trois groupements hydroxyles en conditions acides, la réaction de Mitsunobu a été utilisée pour obtenir la radulanine A (1). Cette synthèse inclut 9 étapes pour un rendement global de 15%.

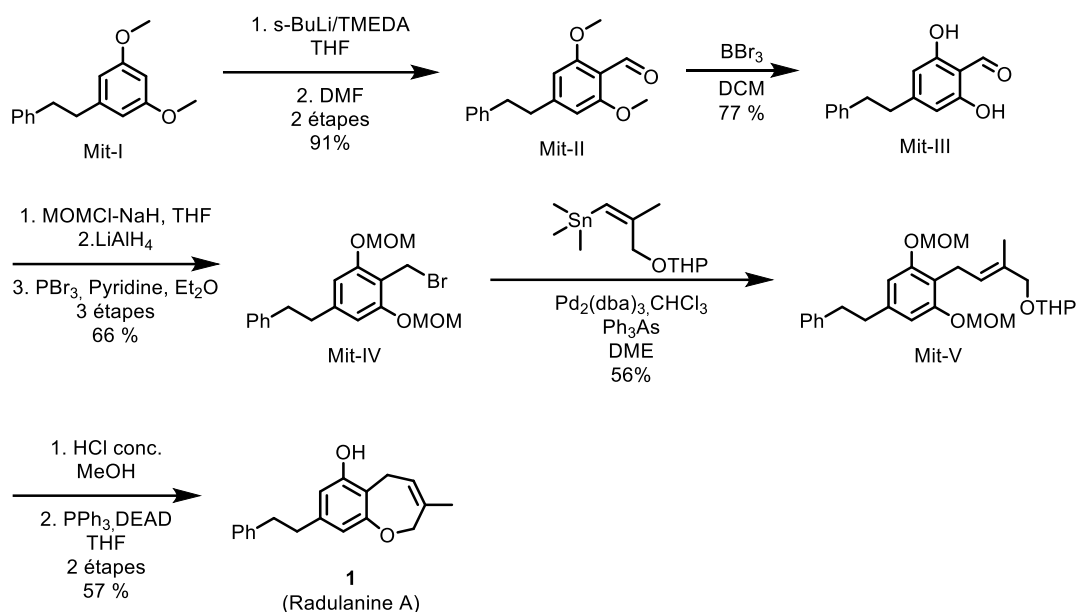


Figure 30 : Voie de synthèse développée par Yamaguchi et al., utilisant une réaction de Mitsunobu

- **Synthèse utilisant un réarrangement de type retro-Claisen**

En 2019, une méthodologie de synthèse de cycles 2,5-dihydrooxepines grâce à un réarrangement de type rétro-Claisen a été décrite par notre équipe du Laboratoire de Synthèse Organique de l'École Polytechnique (Zhang et al., 2019). Ce réarrangement n'avait été que très peu utilisé dans une stratégie de synthèse totale (Levin et al., 2011). En conséquence, cette technique a été développée puis appliquée à la synthèse totale de la radulanine A (1) (Figure 31 et Figure 32).

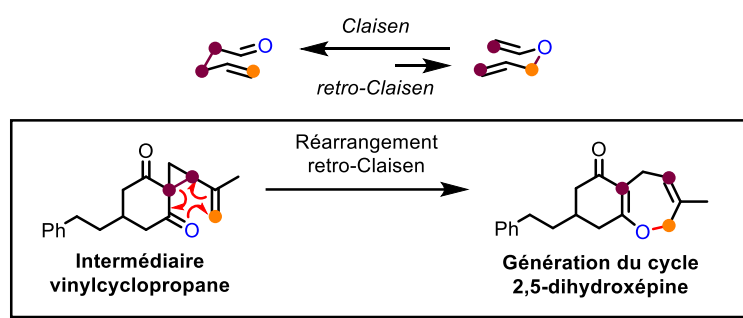


Figure 31 : Réarrangement retro-Claisen

Cette synthèse totale débute avec une extension du *trans*-cinnamaldéhyde Zha-I *via* une aldolisation avec l'acétone en condition basique. Une addition de Michaël du malonate de diméthyle suivie d'une hydrolyse des esters méthyliques a permis la synthèse du composé cyclique Zha-III par décarboxylation. Le composé Zha-IV a ensuite été obtenu grâce à une hydrogénation catalysée au Pd/C. Par réaction avec le (*E*)-1,4-dibromo-2-méthylbut-2-ène

préparé pour cette réaction, un cycle 2,5-dihydroxépine a été formé grâce au réarrangement rétro-Claisen d'un intermédiaire vinylcyclopropane (Figure 31). La dihydroxylation de l'alcène, et la méthylation du diol, ont ensuite été développées afin de permettre la formation du cycle 2,5-dihydrobenzoxépine. En effet, la dernière étape de synthèse de la radulanine A (**1**) s'effectue ici grâce à une réaction d'élimination successive des mésylates, permettant l'aromatisation. Sur les 6 étapes de ce processus, le rendement global de la synthèse de la radulanine A (**1**) est de 9 %.

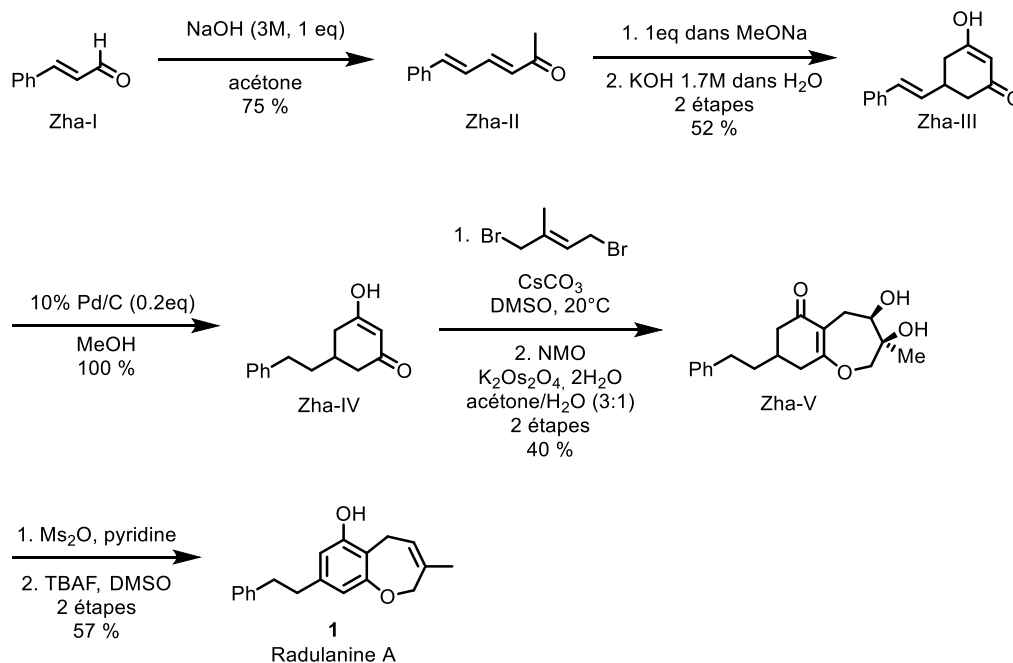


Figure 32 : Voie de synthèse de Zhang et al., utilisant un réarrangement de rétro-Claisen

La découverte des propriétés herbicides de la radulanine A (**1**) au sein de notre équipe de Biologie des Semences de Sorbonne Université fait suite à ces travaux de méthodologie appliqués à la synthèse totale de la radulanine A (**1**) (Zhang et al., 2019). Cette étude autour du réarrangement rétro-Claisen n'avait pas pour objectif initial d'optimiser la synthèse de la radulanine A (**1**), mais de montrer que cette réaction était applicable à la synthèse d'une molécule naturelle. L'intérêt de la radulanine A (**1**) suscité par ses propriétés herbicides a conduit à rechercher une nouvelle voie de synthèse plus efficace pour sa production.

Ainsi, afin d'obtenir une quantité de matière suffisante pour permettre l'étude du mode d'action de la radulanine A (**1**), il était nécessaire de développer une nouvelle méthode de synthèse totale davantage adaptable à une montée en échelle. Les travaux contenus dans ce chapitre présentent la mise au point d'une voie de synthèse originale faisant intervenir une étape de d'extension de cycle par photochimie en flux. Cette dernière étape de synthèse a été

développée par le Dr. Lockett-Walters, post-doctorant au sein du Laboratoire de Synthèse Organique, et fait l'objet de l'article publié en 2022 dans *Organic Letters* présent dans ce manuscrit (Lockett-Walters et al., 2022). Néanmoins, cette extension de cycle nécessitait la synthèse d'un précurseur contenant un motif chromène. Durant la thèse, j'ai développé en collaboration avec Dr. Lockett-Walters la synthèse de ce précurseur (**3**). Nommé « Radula chromène » dans ce manuscrit, cette molécule naturelle a aussi été extraite d'hépatiques du genre *Radula*, à l'instar de la radulanine A (**1**), et a également été étudiée pour son activité phytotoxique (Asakawa et al., 2022).

II Article : A total synthesis of phytotoxic radulanin A facilitated by the photochemical ring expansion of a 2,2-dimethylchromene in flow

Article publié en juin 2022 dans *Organic Letters*.

Auteurs: Bruce Lockett-Walters,¹ Simon Thuillier,^{1,2} Emmanuel Baudouin² and Bastien Nay^{*,1}

¹ Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, CNRS, Institut Polytechnique de Paris, 91128 Palaiseau, France.

² Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Laboratoire de Biologie du Développement, UMR7622, F-75005, Paris, France

*Auteur correspondant

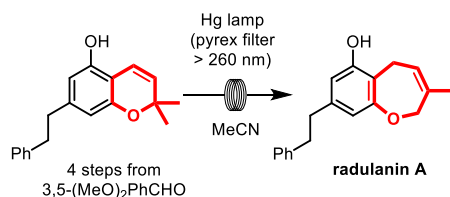
Email : bastien.nay@polytechnique.edu

A total synthesis of phytotoxic radulanin A facilitated by the photochemical ring expansion of a 2,2-dimethylchromene in flow

Bruce Lockett-Walters,¹ Simon Thuillier,^{1,2} Emmanuel Baudouin² and Bastien Nay*,¹

¹ Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, CNRS, Institut Polytechnique de Paris, 91128 Palaiseau, France.

² Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Laboratoire de Biologie du Développement, UMR7622, F-75005, Paris, France



ABSTRACT: The radulanins are biologically active bibenzyl natural products featuring a synthetically challenging 2,5-dihydro-1-benzoxepine core. In contrast with previous reports exhibiting lengthy strategies, we demonstrate the shortest synthesis of radulanin A to date, featuring a largely unexplored photochemical ring expansion reaction of a 2,2-dimethylchromene precursor. This work was adapted to a continuous flow setup for larger scale preparation, in view of biological investigations into the herbicidal properties of this natural product.

The radulanins are plant-derived natural products extracted from the leafy *Radula* genus of liverworts – a taxonomic subdivision of bryophytes.¹⁻⁷ They constitute a large group of bibenzyl compounds (*e.g.* **1-3**) involving fused oxacycles, which might be biosynthetically formed from the oxidative cyclization of *o*-prenylphenols like **4** (Figure 1a). Recently, based on structural similarities, we postulated that radulanin A (**1**) may exhibit similar biological properties to lunularic acid,⁸ a bibenzyl phenolic bearing plant-growth inhibition and allelopathic properties.^{9,10} This theory was later corroborated when an active dose of radulanin A (50 μ M) was shown to cause wilting of *Arabidopsis thaliana* seedlings (a plant commonly considered as a weed in agriculture). As a number of current agrochemical products face scrutiny,¹¹⁻¹³ we believe radulanin A may constitute a promising phytopharmaceutical alternative.

It is clear from all reported syntheses that the greatest challenge associated with the synthesis of the radulanins is the formation of the 3-methyl-2,5-dihydro-1-benzoxepin ring (Figure 1b). In the first reported synthesis of **1**, Stefinovic and Snieckus¹⁴ installed the heterocycle *via* a key ring closing olefin metathesis step on diene **5**. This approach was later adopted by Yoshida and co-workers¹⁵ for the synthesis of radulanin H. Yamaguchi and co-workers¹⁶ were able to form the dihydrobenzoxepine ring of radulanin A *via* an intramolecular Mitsunobu reaction of a 2-prenylphenol intermediate (**6**). In

2019, we reported the synthesis of bicyclic 3,5-dihydrooxepines *via* retro-Claisen rearrangements of 2-vinylcyclopropane-1-carbonyl intermediates (**7**), and applied this methodology to the synthesis of **1**.^{8,17} This rearrangement competed with a Cloke-Wilson rearrangement, possibly furnishing benzofuran side-products related to the structure of perrottetin D (**2**).

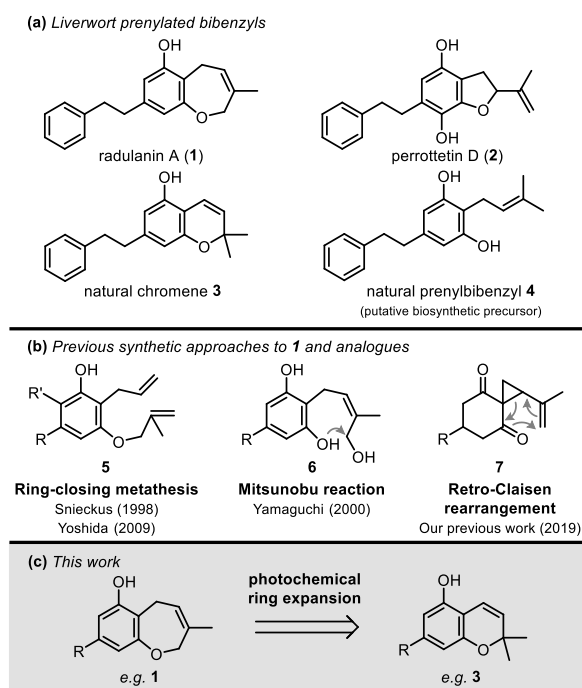


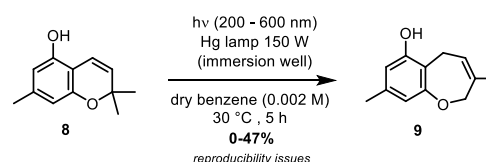
Figure 1. Structure of liverwort bibenzyl natural products (a) and comparison of past synthetic strategies for 2,5-dihydrobenzoxepines (b) and this work (c).

Despite their merit, all these strategies suffer from long reaction sequences, and involve sensitive steps which are not easily adaptable to larger scale synthesis. In 1988, Chakrabarti and Chakraborty reported a photochemical ring-expansion of the chromene moiety of a carbazole alkaloid (girinimbine) and other derivatives to afford a 2,5-dihydrobenzoxepine in moderate to good yields.¹⁸ This reaction was however never exploited for synthetic purpose. Inspired by this work, we envisaged a deployment of this methodology as a late-stage molecular edit to afford radulanin A (**1**) from readily accessible 2,2-dimethylchromenes (**3**) and in flow (Figure 1c), which has resulted in the shortest and highest yielding total synthesis of **1** to date.¹⁹ Since radulanin A and the analogous 2,2-dimethylchromene are both natural products present in the liverworts, we suspect that this rearrangement may be of some biosynthetic significance.^{5,6} Furthermore, this work allowed a larger scale preparation of **1** for extended biological assays.

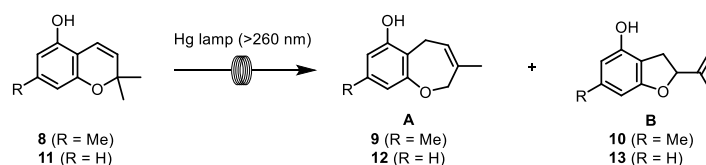
To investigate the feasibility of the photochemical ring expansion of 2,2-dimethylchromenes, preliminary studies were carried out on the model substrate **8**, which revealed a major UV/Vis absorption band at 278 nm, much similar to the analogous chromene **9**, our expected precursor to radulanin A. The chromene substrates were synthesized by the condensation of a 1,3-diphenol with prenal, catalyzed by ethylenediamine diacetate (EDDA) according to Lee *et al.*²⁰ To perform the ring

expansion, several light sources, including sunlight, with various emission spectra were tested, with and without added photosensitizer, and in various solvents (supporting information, Table S1). In particular, we deemed a light source emitting in the UV wavelength range near the absorption band of the substrate. In their previous study, Chakrabarti and Chakraborty described the chromene rearrangement of carbazole-chromene alkaloids at 254 nm (16 W) or at 365 nm (400 W) in benzene, with improved yields at 365 nm.¹⁸ Gratifyingly in our case, the irradiation of **8** by a 150 W medium pressure Hg lamp ($\lambda = 200\text{--}600$ nm) in a pyrex immersion well apparatus afforded 2,5-dihydrobenzoxepine **9** in 47% yield after 5 hours (Scheme 1). Attempts to better the yield (prolonged degassing, increased irradiation time) were not possible due to the irreproducibility of this method. Despite nearly quantitative conversions, most of the reaction mixture was seen to have decomposed.

Scheme 1. Batch photochemical ring expansion of **8** in an immersion well, characterized by poor reproducibility.



In order to improve this reaction and develop a reliable preparative method for radulanin A, foreseeing extensive biological testing, a photochemical flow process was next investigated.²¹⁻²³ Utilizing a flow chemistry system fitted with a 10 mL photochemical reactor equipped with a pyrex filter (Vapourtec E-series UV-150, Filter #3), we first sought to determine whether our preliminary batch conditions could be translated to a flow setup by retaining all possible reaction parameters: solvent, concentration, temperature and lamp power (the light source was also tested by coiling a PFA tubing around the cooling system of our previous 150 W medium pressure mercury lamp, but with no improvement). Promisingly, at a flow rate of 1 mL·min⁻¹ in benzene at a concentration of 0.002 M, a small aliquot of collected reaction mixture at steady state output revealed only 10% remaining starting material by ¹H NMR, and afforded dihydrobenzoxepine **9** and its inseparable 5-membered isomer **10** in 24% yield in a respective 88:12 ratio (Table 1, entry 1). Prior to further optimization of this process, various wavelength filters were screened (supporting information, Table S2), which ultimately showed the pyrex filter (Vapourtec #3 cuts at 260 nm) to render superior selectivity for **9** at the highest conversion. Despite the apparent cleanliness of crude ¹H NMR spectrum (supporting information, Figure S1), the final yield suggested extensive decomposition must have occurred.

Table 1. Optimization of the photochemical ring expansion in flow

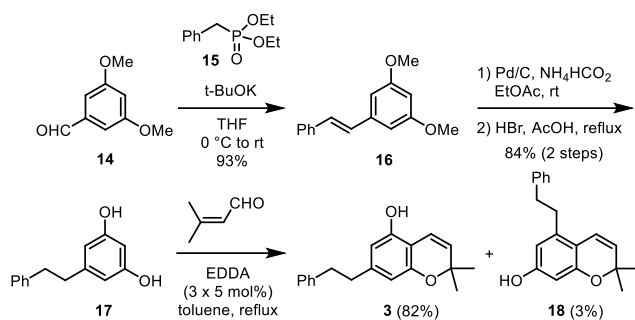
Entry	R	Solvent	Concentration (mM)	Lamp power (%) ^a	Flow rate (mL·min ⁻¹)	Conversion ^b (%)	Yield A (%) ^b	Yield B (%) ^b	Ratio A:B
1	Me	PhH	2	50	1.0	90	21	3	88:12
2	Me	PhH	10	100	1.0	67	11	0	100:0
3	Me	PhH	1	100	2.0	98	28	7	80:20
4	Me	PhH	1	50	2.0	94	18	2	90:10
5	Me	PhMe	10	100	1.0	77	9	0	100:0
6	Me	PhMe	1	100	4.0	90	17	2	89:11
7	Me	EtOAc	1	100	1.0	100	21	12	64:36
8	Me	MeCN	10	100	0.2	92	22	7	76:24
9	Me	MeCN	5	100	0.5	96	18	4	82:18
10	Me	MeCN	1	100	1.4	95	36	11	77:23
11	Me	MeCN	1	100	1.2	100	21	11	66:34
12	H	MeCN	1	100	1.4	100	55	5	92:8

^a Power refers to electrical power output of lamp, 100% being 150 W. ^b Conversion and yields determined by ¹H NMR with respect to 1,3,5-trimethoxybenzene as internal standard.

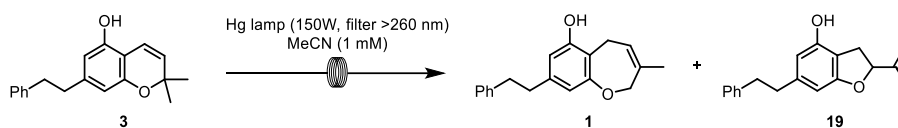
Further optimization of this process began by examining a more practical reaction concentration of 10 mM (entry 2). Although the reaction had not reached full conversion at this flow rate, several unknown signals appeared in the aromatic region of the crude NMR spectra alongside the product, likely formed from intermolecular reactions between reactive intermediates. Reducing the concentration to 1 mM proved favourable, rendering a combined yield of 35% at a flow rate of 2 mL·min⁻¹ (entry 3). Reducing the lamp power by 50% (entry 4) led to improved selectivity but a lower yield of rearranged products. In an effort to improve safety, other solvents were screened. Toluene (entries 5-6) was shown to facilitate a higher conversion rate, but with inferior yields. Ethyl acetate was briefly trialed (entry 6), but resulted in poor selectivity. We last examined acetonitrile (entries 8-11), and observed a marked decrease in rates of conversion compared to benzene. However a slight improvement in yield (entry 10) was observed by working at 1 mM at a higher flow rate. It is noteworthy that when increasing residence time in the reactor (lower flow rates) in order to achieve full conversion, selectivity worsened and simultaneously impacted yield (entry 11). To test the influence of the methyl substituent on this difficult rearrangement, we applied the best conditions (entry 10) to chromene **11** (entry 12). We were pleased to observe that dihydrobenzoxepine **12** was obtained in a 55% yield at 100% conversion, with only 5% of isomer **13** (92:8 ratio). This result shows the crucial

influence of substituents in this photochemical rearrangement. To complete this study, we explored the scope of this rearrangement to more complex 2,2-dimethylchromenes with various substitutions, possibly applicable to the synthesis of other natural products (see supporting information, Figure S2).²⁴ These attempts resulted in degradation (or no reaction when an extended chromophore was present), showing a limited scope for this reaction. However, owing to the structural similarity between radulanin chromene **3** and compound **8**, we were confident we could apply this method to a preparation of radulanin A.

Chromene intermediate **3**, a natural product first isolated from another *Radula* moss,^{2,6} was synthesized in four steps from 3,5-dimethoxybenzaldehyde **14**. The Horner-Wadsworth-Emmons reaction of **14** with diethyl benzylphosphonate **15** first afforded pinosylvin dimethyl ether **16** in 93% yield. Subsequent hydrogenation of the olefin moiety and deprotection of the phenols in presence of HBr gave dihydropinosylvin **17** in 94% yield. This nucleophilic diphenol was engaged in the formation of chromene **3** in the presence of prenal and the Brønsted acid catalyst EDDA (Scheme 2).^{20,25} On a practical point of view, adding EDDA in three portions of 5 mol% over three hours furnished the best yields of **3** (82%), which was accompanied by a small amount of regioisomer **18** (3%). Compound **18** is also a natural product found in *Radula* species.⁵

Scheme 2. Optimized total synthesis of natural chromene 3

Chromene **3** was submitted to the same photochemical flow conditions as **8** (Table 1, entries 9 and 10). Gratifyingly, it was converted into radulanin A (**1**) in a higher NMR yield of 41% (Table 2, entry 1), accompanied by 15% of five-membered isomer **19** (73:27 ratio). Despite the good conversion of 92% and after exhaustive efforts, compound **1** was found to be inseparable from the chromene substrate **3**. As a result, we were compelled to reduce the flow rate to achieve full consumption of the chromene, which inevitably impacted selectivity and yield (entry

Table 2. Photochemical rearrangement of chromene 3 into radulanin A (1)

Entry	Flow rate (mL min ⁻¹)	Conversion (%) ^a	1 (%)	19 (%)	Ratio 1 : 19
1	1.4	92	41 ^a	15 ^a	73:27
2	1.2	100	26 ^b	17 ^b	60:40

^a Conversions and yields determined by ¹H NMR with respect to trimethoxybenzene as internal standard. ^b Isolated yield.

Scheme 3. Proposed mechanism for 2,2-dimethylchromene reorganization.

§

In conclusion, the photochemical ring extension of 2,2-dimethylchromene substrates has been studied, showing the advantage of using a flow process to improve the reproducibility and scale up the reaction. It was applied to the total synthesis of radulanin A, obtained in 19% yield over five steps from aldehyde **14**. As far as we know it is the shortest preparation reported to date. Although it would need additional improvements to scale up the process, the method allowed us to prepare substantial amounts (320 mg) of radulanin A for extended biological studies as a weedkiller. Finally, to explain this rearrangement, we supposed that a quinone methide intermediate would

lead to highly reactive radical species, involving a key 1,7-hydrogen atom transfer and a possible retro-Claisen rearrangement. Considering that both the chromene substrate (**3**) and radulanin A (**1**) are natural products present in the same liverwort genus,^{2,6} it is questionable whether this rearrangement could occur in Nature.

2). These new conditions allowed to isolate **1** in 26% yield (with 17% yield of benzofuran **19**, also a natural product). With a productivity of 127 mg/24 h, we were able to afford more than 300 mg of **1** for biological investigations. Despite the simplicity of this transformation, no obvious rearrangement mechanism can be drawn at first sight. A key intermediate could be quinone methide isomer **20** (Scheme 3, see also Scheme S1 in the supporting information). Under UV excitation, we supposed that it could generate a reactive oxy radical species (**21**), substrate of a 1,7-hydrogen atom transfer (1,7-HAT) leading to intermediate **22**. From this symmetrical diphenol, the benzylic radical would be reduced through 1,5-HAT leading to **23**, which could evolve through several routes. First, the new 1,3-diradical could recombine into 2-vinylcyclopropanecarbonyl intermediate **24** (route a), a good substrate for spontaneous but reversible retro-Claisen rearrangement according to our previous study,⁸ leading to kinetically favoured 2,5-dihydrobenzoxepine **1**. Second, resonance and radical recombination could also directly lead to **1** (route b). Finally, resonance form **25** could be an intermediate toward benzofuran product **19** (route c), which tends to be the thermodynamic end-product when increasing irradiation times.

lead to highly reactive radical species, involving a key 1,7-hydrogen atom transfer and a possible retro-Claisen rearrangement. Considering that both the chromene substrate (**3**) and radulanin A (**1**) are natural products present in the same liverwort genus,^{2,6} it is questionable whether this rearrangement could occur in Nature.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website.

Supplementary tables, figures, and schemes experimental procedures and copies of spectra (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Email: bastien.nay@polytechnique.edu

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge financial supports from CNRS, Institut Polytechnique de Paris (IP Paris), Ecole Polytechnique and Sorbonne Université (SU). BLW¹ thanks CNRS and IP Paris for funding his postdoc fellowship. ST^{1,2} thanks SU for providing a PhD fellowship. BN¹ gratefully thanks Professor Samir Zard¹ for fruitful discussions on the reaction mechanism. We thank Reviewer 2 for suggesting an alternative mechanism that is presented in the supporting information for further discussion.

REFERENCES

- (1) Asakawa, Y. Biologically Active Compounds from Bryophytes. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 557–580. <https://doi.org/10.1351/pac200779040557>.
- (2) Asakawa, Y.; Toyota, M.; Takemoto, T. Seven New Bibenzyls and a Dihydrochalcone from *Radula Variabilis*. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 2005–2010. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88752-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88752-X).
- (3) Asakawa, Y.; Kusube, E.; Takemoto, T.; Suire, C. New Bibenzyls from *Radula Compladata*. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 2115–2117. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89292-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89292-4).
- (4) Asakawa, Y.; Takeda, R.; Toyota, M.; Takemoto, T. Bibenzyls from *Radula Tokiensis* and *R. Japonica*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 858–859. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85201-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85201-6).
- (5) Asakawa, Y.; Hashimoto, T.; Takikawa, K.; Tori, M.; Ogawa, S. Prenyl Bibenzyls from the Liverworts *Radula Perrottetii* and *Radula Compladata*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 235–251. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84130-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84130-K).
- (6) Asakawa, Y.; Kondo, K.; Takikawa, N. K.; Tori, M.; Hashimoto, T.; Ogawa, S. Prenyl Bibenzyls from the Liverwort *Radula Kojana*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 219–234. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84129-G](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84129-G).
- (7) Asakawa, Y.; Kondo, K.; Tori, M. Cyclopropanochroman Derivatives from the Liverwort *Radula Javanica*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 325–328. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84147-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84147-K).
- (8) Zhang, W.; Baudouin, E.; Cordier, M.; Frison, G.; Nay, B. One-Pot Synthesis of Metastable 2,5-Dihydrooxepines through Retro-Claisen Rearrangements: Method and Applications. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 8643–8648. <https://doi.org/10.1002/chem.201901675>.
- (9) Valio, I. F. M.; Schwabe, W. W. Growth and Dormancy in *Lunularia Cruciata* (L.) Dum: VII. The Isolation and Bioassay of Lunularic Acid. *J. Exp. Bot.* **1970**, *21*, 138–150. <https://doi.org/10.1093/jxb/21.1.138>.
- (10) Whitehead, J.; Wittmann, M.; Cronberg, N. Allelopathy in Bryophytes - a Review. *Lindbergia* **2018**, *41*. <https://doi.org/10.25227/linbg.01097>.
- (11) Guyton, K. Z.; Loomis, D.; Grosse, Y.; El Ghissassi, F.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Scoccianti, C.; Mattock, H.; Straif, K. Carcinogenicity of Tétrachlorvinphos, Parathion, Malathion, Diazinon, and Glyphosate. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 490–491. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8).
- (12) Foucart, S.; Horel, S. Risks Associated with Glyphosate Weedkiller Resurface. *Nature* **2018**, *555*, 443. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-03394-z>.
- (13) Andreotti, G.; Koutros, S.; Hofmann, J. N.; Sandler, D. P.; Lubin, J. H.; Lynch, C. F.; Lerro, C. C.; De Roos, A. J.; Parks, C. G.; Alavanja, M. C.; Silverman, D. T.; Beane Freeman, L. E. Glyphosate Use and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 509–516. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx233>.
- (14) Stefinovic, M.; Snieckus, V. Connecting Directed Ortho Metalation and Olefin Metathesis Strategies. Benzene-Fused Multiring-Sized Oxygen Heterocycles. First Syntheses of Radulanin A and Helianane. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2808–2809. <https://doi.org/10.1021/jo980299s>.
- (15) Yoshida, M.; Nakatani, K.; Shishido, K. Total Synthesis of Radulanin H and Proposed Structure of Radulanin E. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5702–5708. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.05.027>.
- (16) Yamaguchi, S.; Furihata, K.; Miyazawa, M.; Yokoyama, H.; Hirai, Y. A New Preparation of 2,5-Dihydro-1-Benzoxepins Using Mitsunobu Cyclization, and the Synthesis of Natural Radulanins. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4787–4790. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)00676-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00676-6).
- (17) Zhang, W.; Nay, B. The Retro-Claisen Rearrangement of 2-Vinylcyclopropylcarbonyl Substrates and the Question of Its Synthetic Potential. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 3517–3525. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202000136>.
- (18) Chakrabarti, A.; Chakraborty, D. P. Photochemical Rearrangements of Pyranocarbazole Alkaloids: Part-I. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6625–6627. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)82414-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)82414-4).
- (19) A preprint of this article is available: Lockett-Walters, B.; Thuillier, S.; Baudouin, E.; Nay, B. A Concise Total Synthesis of Phytotoxic Radulanin A Facilitated by the Photochemical Ring Expansion of a 2,2-Dimethylchromene in Flow. **2022**. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-68n6r-v2>.
- (20) Lee, Y. R.; Choi, J. H.; Yoon, S. H. Efficient and General Method for the Synthesis of Benzopyrans by Ethylenediamine Diacetate-Catalyzed Reactions of Resorcinols with α,β -Unsaturated Aldehydes. One Step Synthesis of Biologically Active (\pm)-Confluentin and (\pm)-Daurichromenic Acid. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7539–7543. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.08.159>.
- (21) Rehm, T. H. Flow Photochemistry as a Tool in Organic Synthesis. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 16952–16974. <https://doi.org/10.1002/chem.202000381>.
- (22) Knowles, J. P.; Elliott, L. D.; Booker-Milburn, K. I. Flow Photochemistry: Old Light through New Windows. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2025–2052. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.229>.
- (23) Elliott, L. D.; Knowles, J. P.; Koovits, P. J.; Maskill, K. G.; Ralph, M. J.; Lejeune, G.; Edwards, L. J;

- Robinson, R. I.; Clemens, I. R.; Cox, B.; Pascoe, D. D.; Koch, G.; Eberle, M.; Berry, M. B.; Booker-Milburn, K. I. Batch versus Flow Photochemistry: A Revealing Comparison of Yield and Productivity. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 15226–15232. <https://doi.org/10.1002/chem.201404347>.
- (24) Sokol, K. R.; Magauer, T. Total Synthesis of Oxepin and Dihydrooxepin Containing Natural Products. *Synthesis* **2021**, *53*, 4187–4202. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1610776>.
- (25) Park, B.-H.; Lee, Y.-R.; Kim, S.-H. Efficient Synthesis of Bibenzyl Derivatives Bearing Pyranyl Moieties: First Total Synthesis of Bauhinol D. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 566–570. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.2.5>

III Supplementary Material

A concise total synthesis of phytotoxic radulanin A facilitated by the photochemical ring expansion of a 2,2-dimethylchromene in flow

Bruce Lockett-Walters,¹ Simon Thuillier,^{1,2} Emmanuel Baudouin² and Bastien Nay*,¹

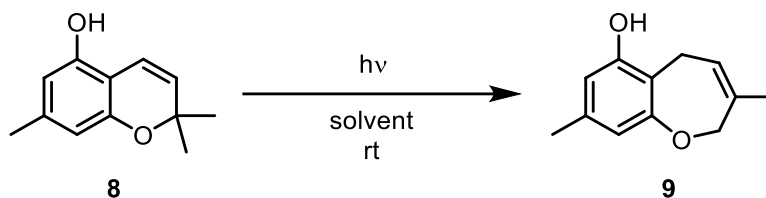
¹ Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, CNRS, Institut Polytechnique de Paris, Palaiseau 91128, France.

² Laboratoire de Biologie du Développement, Institut de Biologie Paris Seine, Sorbonne Université, CNRS, Paris 75005, France

Supplementary Information

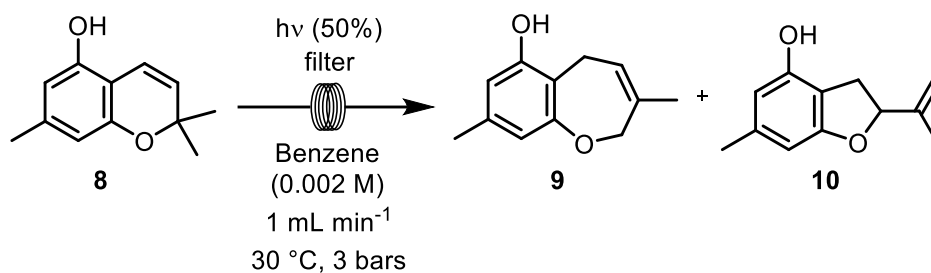
Supplementary tables and figures	68
Table S1. Screening of light sources	68
Table S2. Screening of filters for the photochemical ring expansion in flow	69
Figure S1. Comparison of ¹ H NMR spectra of 8, 9 and the crude mixture of the reaction	70
Figure S2. Attempts to perform the chromene ring expansion on other substrates	71
Experimental section.....	72
General	72
Experimental procedures and data	73
Table S3: Comparison of NMR data of synthetic chromene 3 with the literature (CDCl ₃)	82
Table S4: Comparison of NMR data of synthetic chromene 18 with the literature (CDCl ₃)	83
Table S5: Comparison of NMR data of synthetic Radulanin A 1 with the literature (CDCl ₃)	84
Table S6: Comparison of NMR data of synthetic 19 with the literature (CDCl ₃).....	85

Supplementary tables and figures

Table S1. Screening of light sources to facilitate photochemical ring expansion of **8** to **9**. All reactions performed in quartz cuvette, apart from entry 12.

Entry	Light source	λ (nm)	Solv.	PS	Conc. (M)	Time (h)	Observation
1	Blue LED ^a	400-450	-	-	Neat	20	No reaction
2	Blue LED	400-450	PhH	-	0.01	20	No reaction
3	Blue LED	400-450	DMSO	-	0.01	20	No reaction
4	Blue LED	400-450	CH ₂ Cl ₂	-	0.01	20	No reaction
5	White LED ^b	390-700	CH ₂ Cl ₂	methylene blue (10%)	0.01	20	No reaction
6	White LED	390-700	CH ₂ Cl ₂	eosin Y (10%)	0.01	20	No reaction
7	White LED	390-700	CH ₂ Cl ₂	TPP (10%)	0.01	20	No reaction
8	Black light ^c	365	-	-	Neat	20	No reaction
9	Black light	365	PhH	-	0.01	20	No reaction
10	Black light	365	CH ₂ Cl ₂	-	0.01	20	No reaction
11	Black light	365	DMSO	-	0.01	20	No reaction
12	150W Hg lamp ^d	200-600	PhH	-	0.002	5	1:1 mixture of 8 and 9 , 47% isolated yield of 9 (not reproducible)

^a6 W output; ^b12 W output; ^c15 W output; ^d150W Hg lamp equipped with cooling jacket in an immersion well setup.

Table S2. Screening of filters for the photochemical ring expansion in flow.

Filter ^a	λ (nm)	Integral ratio by ¹ H NMR		
		8	9	10
2	225-425	0	46	54
3	260-600	10	79	11
4	290-410	100	0	0
5	260-490	85	15	0
6	310-600	100	0	0
7	255-600	47	53	0
8	280-600	29	72	7
9	320-600	100	0	0

^a Vapourtec filter number¹

¹ More information can be found at the following address (available on 26 April 2022): <https://www.vapourtec.com/products/flow-reactors/photochemistry-uv-150-photochemical-wavelength-filters/>

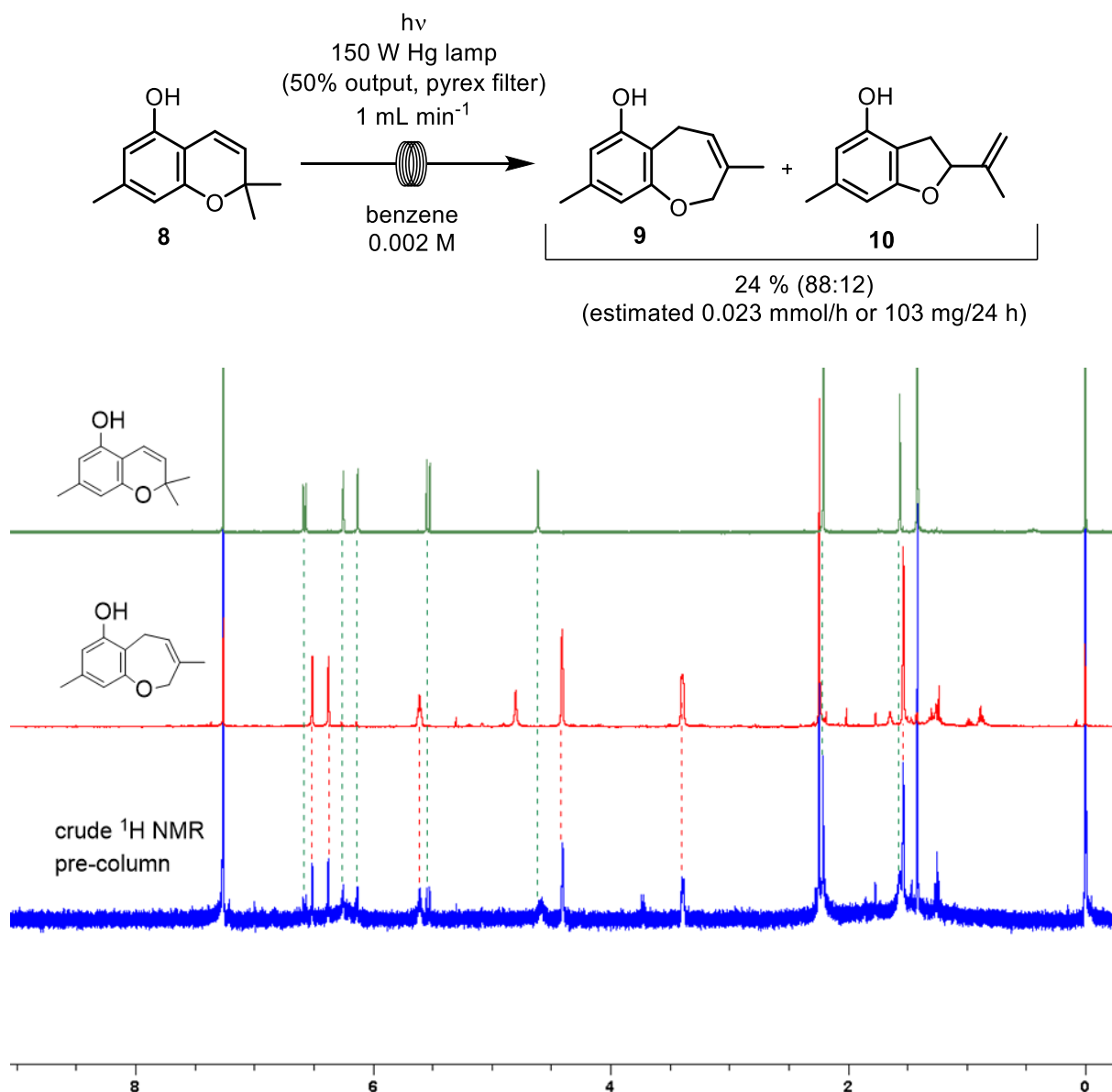


Figure S1. Comparison of ¹H NMR spectra of **8**, **9** and the crude mixture of the reaction. Green: ¹H NMR of starting material **8** (CDCl₃, 400 MHz); Red: ¹H NMR of isolated product **9** (CDCl₃, 400 MHz); Blue: ¹H NMR of crude mixture (CDCl₃, 400 MHz), showing **8** and **9**.

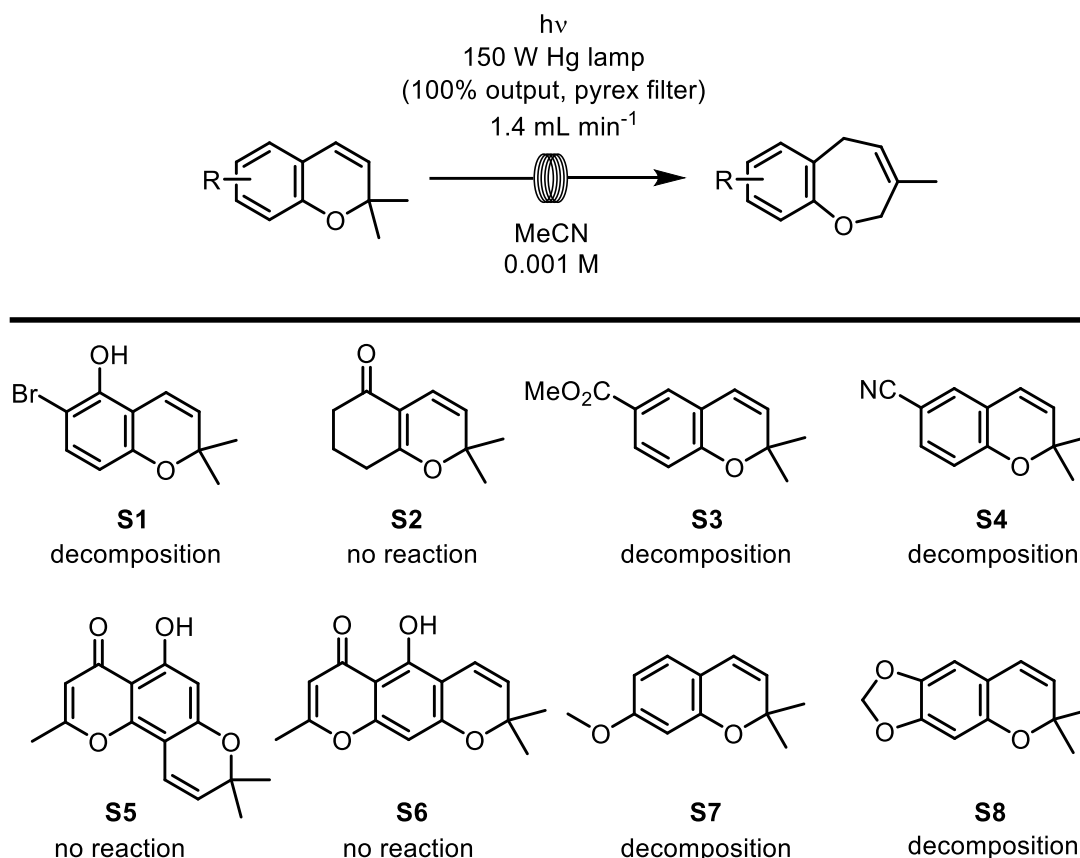


Figure S2. Attempts to perform the chromene ring expansion on other substrates. Notes: **S1** was synthesised according to general procedure A (see section 1.7) using 4-bromoresorcinol (8% yield); **S2** was synthesised according to a literature procedure¹ (83% yield); **S3** was synthesised according to a literature procedure² (11% yield); **S4** was synthesised according to a literature procedure³ (20% yield); **S5** and **S6** were synthesised according to general procedure A (see section 1.7) from the corresponding chromone (10% and 3% respective yields); **S7** was synthesised according to a literature procedure⁴ (53% yield); **S8** was synthesised according to a literature procedure⁴ (40% yield).

Experimental section

General

Reagents and solvents were bought from Sigma Aldrich, Alfa Aesar and Fluorochem. Toluene, acetonitrile and benzene were distilled over CaH₂ prior to use, and where mentioned, degassed by bubbling through nitrogen gas.

Nuclear magnetic resonance spectra (¹H NMR and ¹³C NMR) were recorded at ambient temperature with a Bruker Avance 400 (400 MHz, ¹H at 400 MHz, ¹³C NMR at 100 MHz) instrument using CDCl₃ as solvent referenced relative to residual CHCl₃ ($\delta_{\text{H}} = 7.26$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77.1$ ppm). Chemical shifts are reported in ppm and coupling constants (*J*) in Hertz. Data for ¹H NMR spectra are reported as follows: chemical shift ppm, referenced to protium (br s = broad singlet, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = double doublet, td = triplet of doublets, ddd = double double doublet, m = multiplet, coupling constants, integration).

Infrared spectra were recorded on a PerkinElmer FTIR equipped with ATR. Absorption maxima (ν_{max}) are reported in wavenumbers (cm⁻¹).

High resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a Bruker tims-TOF mass spectrometer (ESI+) and reported as *m/z*. The quoted masses are accurate to +/- 5ppm.

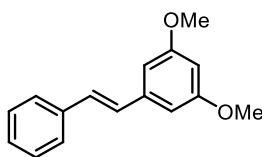
Analytical thin layer chromatography (TLC) was carried out using precoated silica gel plates (silica gel 60, F254, Merck) and visualised by exposure to ultraviolet light and/or exposure to a basic solution of potassium permanganate or *p*-anisaldehyde stain followed by heating. Flash column chromatography was carried out on Kieselgel 60 (40-63 μm).

Batch photochemical experiments were performed in a 500 mL immersion well apparatus or 10 mL pyrex England sealed tubes using a Heraeus 150 W medium pressure Hg lamp.

Flow photochemical experiments were performed on a Vapourtec E series system with an attached UV-150 photoreactor equipped with a medium pressure Hg lamp (75 – 150 W) used in combination with a pyrex filter (Vapourtec filter n°3).

Experimental procedures and data

(E)-3,5-Dimethoxystilbene (**16**)



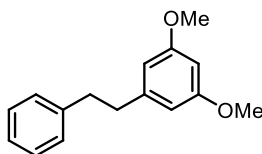
To a flame dried 500 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar under an inert atmosphere was added *t*-BuOK (10.8 g, 96.3 mmol) followed by dry THF (120 mL). The mixture was cooled on ice then diethyl benzylphosphonate (20.6 mL, 90.3 mmol) was added drop-wise over 30 minutes, followed by portion-wise addition of 3,5-dimethoxybenzaldehyde (10.0 g, 60.2 mmol). The mixture was allowed to reach ambient temperature then stirred for 2 h. The majority of the THF was removed *in vacuo* then a mixture of H₂O:MeOH (2:1, approx. 60 mL) was added until precipitation of the product occurred. Subsequent filtration and vacuum drying afforded **16** as a white solid (13.5 g, 56.0 mmol, 93%).

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature.⁵

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.53 – 7.49 (m, 2H), 7.39 – 7.33 (m, 2H), 7.29 – 7.23 (m, 1H), 7.09 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.69 – 6.66 (m, 2H), 6.40 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.83 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 161.1, 139.5, 137.3, 129.3, 128.8 (2), 127.8, 126.7, 104.7, 100.12, 55.5.

1,3-Dimethoxy-5-phenethylbenzene (**S9**)



To a flame dried 500 mL round bottomed flask was added stilbene **16** (14.0 g, 58.2 mmol) and 10% Pd/C (1.40 g, 10% wt.) followed by ethyl acetate (243 mL, 0.245 M). Ammonium formate (18.4 g, 291 mmol) was then charged and the mixture allowed to stir over night at room temperature. The reaction mixture was then filtered over a pad of celite and reduced *in vacuo*. CH₂Cl₂ was added to precipitate remaining ammonium formate and the mixture filtered again

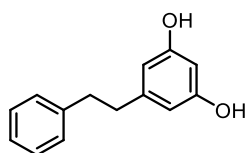
then reduced *in vacuo* to afford the title compound **S9** as a clear yellow oil (12.7 g, 52.4 mmol, 90%).

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature.⁶

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 – 7.25 (m, 2H), 7.23 – 7.17 (m, 3H), 6.36 – 6.30 (m, 3H), 3.76 (s, 6H), 2.95 – 2.82 (m, 4H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 160.9, 144.3, 141.8, 128.6, 128.5, 126.1, 106.6, 98.1, 55.4, 38.4, 37.8.

Dihydropinosylvin (**17**)



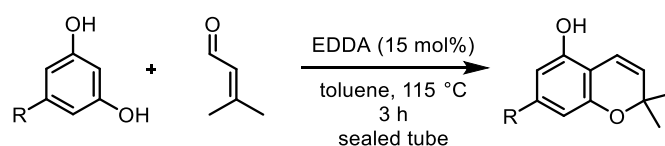
To a 250 mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirring bar was added **S9** (2.03 g, 8.38 mmol) followed by HBr (24.6 mL, 48% wt in water) and glacial acetic acid (24.6 mL, HBr:AcOH 1:1 v/v, final concentration of 0.15 M). The reaction mixture was then refluxed for 4 h and allowed to cool to room temperature. The reaction mixture was then diluted with water (50 mL) and extracted with Et₂O (3 x 50 mL). The organic layer was treated with activated charcoal, filtered and reduced *in vacuo* to afford **17** as an off white solid (1.68 g, 7.86 mmol, 94%).

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature.⁶

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.33 – 7.25 (m, 2H), 7.24 – 7.15 (m, 3H), 6.31 – 6.18 (m, 3H), 4.71 (br s, 2H), 2.93 – 2.75 (m, 4H).

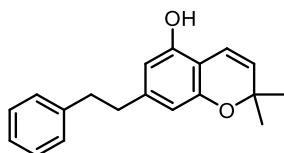
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 156.7, 145.1, 141.7, 128.6, 128.5, 126.1, 108.3, 100.6, 37.8, 37.5.

General procedure A for the synthesis of chromenes



To a flame dried sealed tube equipped with a magnetic stirring bar under an inert atmosphere was added the relevant substituted resorcinol (1 equiv.) followed by dry toluene (0.1 M) and prenal (1.5 equiv.). Ethylenediammonium diacetate (EDDA, 5 mol%) was then added, the vessel stoppered and heated to 115 °C for 1 h. The mixture was allowed to cool to ambient temperature, then EDDA was charged (5 mol%), the vessel stoppered and heated to 115 °C for another hour. This procedure was repeated once more (totalling a 15 mol% addition of EDDA), the mixture allowed to cool to ambient temperature, a small portion of silica was charged and the solvent removed *in vacuo*. The crude material was purified by flash column chromatography (dry loading), eluting in hexanes/EtOAc to afford the relevant substituted chromene.

2,2-Dimethyl-7-phenethyl-2H-chromen-5-ol (**3**)



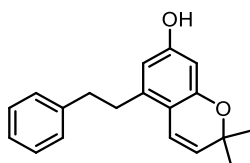
Synthesised according to general procedure **A** using dihydropinosylvins **17** (4.00 g, 18.7 mmol) to afford **3** as a viscous brown liquid (4.28 g, 15.3 mmol, 82%).

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature (Table S3).^{7,8}

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.31 – 7.24 (m, 2H), 7.22 – 7.15 (m, 3H), 6.58 (d, *J* = 10.0, 1H), 6.32 – 6.29 (m, 1H), 6.14 – 6.10 (m, 1H), 5.55 (d, *J* = 10.0, 1H), 4.59 (br s, 1H), 2.92 – 2.83 (m, 2H), 2.80 – 2.73 (m, 2H), 1.42 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 154.0, 151.2, 143.7, 141.8, 128.6 (2), 128.5, 126.1, 116.4, 109.4, 108.0, 107.6, 76.1, 38.0, 37.5, 27.9.

2,2-Dimethyl-5-phenethyl-2H-chromen-7-ol (**18**)



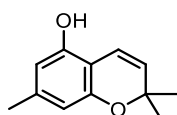
The natural product **18** was isolated as a regiomer side-product (brown oil, 81 mg, 0.289 mmol, 3%) in the synthesis of chromene **3**, according to general procedure A starting from dihydropinosylvin **17** (2.00 g, 9.35 mmol).

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature (Table S4).⁹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 – 7.26 (m, 2H), 7.25 – 7.15 (m, 3H), 6.44 (d, *J* = 10.1, 1H), 6.22 – 6.18 (m, 2H), 5.50 (d, *J* = 10.1, 1H), 2.86 – 2.81 (m, 4H), 1.40 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 156.2, 154.7, 141.7, 139.2, 128.5 (2), 128.1, 126.1, 118.8, 113.0, 108.9, 102.2, 75.8, 37.5, 34.5, 27.8 (2).

2,2,7-Trimethyl-2H-chromen-5-ol (**8**)



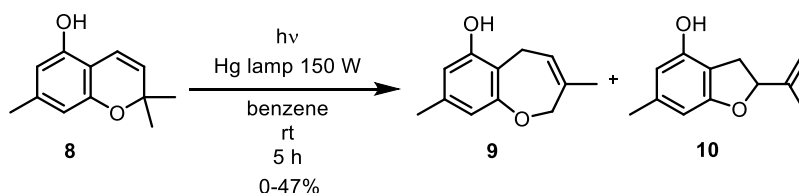
Prepared according to general procedure **A** using orcinol (5.00 g, 40.3 mmol) to afford **8** as a light-yellow solid (4.29 g, 22.6 mmol, 56%).

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature.¹⁰

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.57 (d, *J* = 10.0, 1H), 6.26 – 6.24 (m, 1H), 6.14 – 6.11 (m, 1H), 5.53 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.60 (br s, 1H), 2.22 – 2.20 (m, 3H), 1.41 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 153.9, 151.2, 139.7, 128.4, 116.4, 110.1, 108.7, 107.1, 76.0, 27.9, 21.6.

Photochemical ring expansion of **8** to 3,8-dimethyl-2,5-dihydrobenzoxepin-6-ol **9** in batch process



To a 500 mL immersion well apparatus equipped with a 150 W hG lamp, water cooling jacket and magnetic stirring bar under an inert atmosphere was added chromene **8** (75.0 mg, 0.394 mmol) and dry benzene (250 mL, 0.00158 M). The reaction mixture was then stirred and

irradiated for 30 minutes, the lamp turned off, and the solution allowed to return to room temperature. This procedure was repeated until the mixture had been irradiated for a total of 5 hours. The reaction mixture was then transferred to a round-bottomed flask, reduced *in vacuo* and the crude material was purified by flash column chromatography eluting in hexane:CH₂Cl₂ 1:1 to afford a mixture of **9** and **10** (95:5) as a yellow oil (35 mg, 0.185 mmol, 47%).

R_f = 0.19 (hexane/CH₂Cl₂ 1:1)

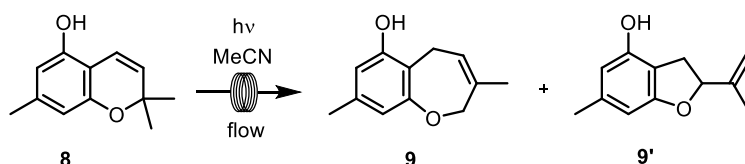
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.50 – 6.52 (m, 1H), 6.39 – 6.36 (m, 1H), 5.65 – 5.57 (m, 1H), 4.80 (br s, 1H), 4.44 – 4.37 (m, 2H), 3.43 – 3.36 (m, 2H), 2.25 – 2.23 (m, 3H), 1.56 – 1.51 (m, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 159.7, 152.0, 137.4, 134.0, 120.7, 120.1, 114.5, 112.2, 74.3, 21.6, 21.0, 20.1.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3350, 2931, 1715, 1619, 1583, 1450, 1378, 1311, 1207, 1068, 986, 836, 753.

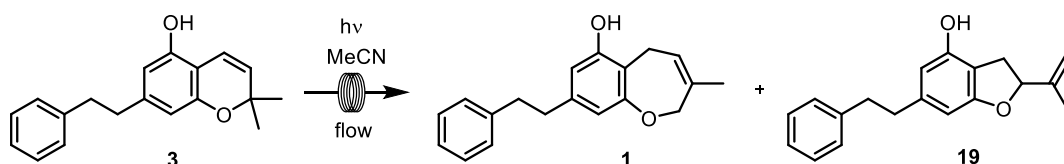
HRMS (ESI+): Calcd. for C₁₂H₁₅O₂⁺ [MH⁺]: 191.1067; Found: 191.1064.

Photochemical ring expansion of **8** to 3,8-dimethyl-2,5-dihydrobenzoxepin-6-ol **9** in flow



To a flame-dried round-bottomed flask under a nitrogen atmosphere was added chromene **8** and dry nitrogen-degassed benzene (0.00158 M). The flow system was first flushed with dry degassed acetonitrile then the reagent solution was injected into the photochemical reactor fitted with a pyrex filter at a lamp power of 50% (75 W), a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ (8.44 min residence time), a system pressure of 3 bars and a reactor temperature of 30 °C. At steady state output, 266 mL (0.420 mmol) was reaction mixture was collected, reduced *in vacuo*, and the crude material purified by flash column chromatography eluting in hexane:CH₂Cl₂ 1:1 to afford an inseparable mixture of **9** and **10** (88:12) as a yellow oil (19 mg, 0.1 mmol, 24%).

Photochemical ring expansion of chromene **3** to afford **1** and **19** in flow



To a flame-dried round-bottomed flask under a nitrogen atmosphere was added chromene **3** followed by dry, nitrogen-degassed acetonitrile (0.001 M). The flow system was first flushed with dry degassed acetonitrile then the reagent solution was injected into the photochemical reactor fitted with a pyrex filter at a lamp power of 100% (150 W), a flow rate of 1.2 mL min⁻¹ (8.44 min residence time), a system pressure of 3 bars and a reactor temperature of 30 °C. At steady state output, 713 mL (0.713 mmol) of reaction mixture was collected, reduced *in vacuo*, then purified by flash column chromatography eluting in 2 – 10% EtOAc:hexanes to afford radulanin A **1** as a brown oil (52 mg, 0.186 mmol, 26%) and natural product **19** as a brown oil (34 mg, 0.12 mmol, 17%).

Radulanin A (**1**)

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature (Table S5).^{9,11}

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 – 7.24 and 7.22 – 7.14 (m, 5H), 6.53 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 5.64 – 5.57 (m, 1H), 4.84 (br s, 1H), 4.44 – 4.37 (m, 2H), 3.44 – 3.34 (m, 2H), 2.91 – 2.83 and 2.83 – 2.75 (m, 4H), 1.57 – 1.50 (m, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 159.9, 152.2, 141.8, 141.5, 134.2, 128.6, 128.5, 126.1, 120.8 (2), 113.9, 111.7, 74.4, 37.7, 37.6, 21.8, 20.2.

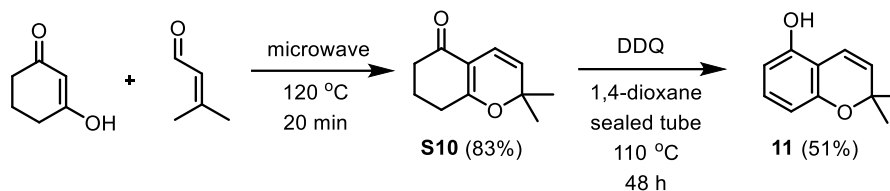
2,3-Dihydro-4-hydroxy-2-isopropenyl-6-(2-phenethyl)benzofuran (**19**)

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature (Table S6).⁹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.33 – 7.24 and 7.24 – 7.15 (m, 5H), 6.33 – 6.29 (m, 1H), 6.17 – 6.14 (m, 1H), 5.20 (app t, 1H), 5.12 – 5.07 (m, 1H), 4.94 – 4.90 (m, 1H), 4.80 (br s, 1H), 3.27 (dd, J = 15.0, 9.7 Hz, 1H), 2.95 (dd, J = 15.0, 8.0 Hz, 1H), 2.92 – 2.85 and 2.85 – 2.77 (m, 4H), 1.80 – 1.77 (m, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 161.8, 152.1, 144.1, 144.0, 141.9, 128.5$ (2), 126.1, 112.1, 109.9, 108.0, 102.5, 86.5, 38.0, 37.9, 31.7, 17.3.

2,2-Dimethyl-2H-chromen-5-ol (**11**)



S10 was prepared according to a literature procedure.¹²

A flame-dried 2 mL sealed microwave vessel was charged with 1,3-cyclohexandione (200 mg, 1.78 mmol) and prenal (205 μL , 2.14 mmol), stoppered, then irradiated at 300 W up to 120 °C for 20 minutes. The crude residue was then purified by flash column chromatography eluting in 10% EtOAc:hexanes to afford **S10** as a yellow oil (264 mg, 1.48 mmol, 83%).

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature.¹²

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.39$ (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.22 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 2.42 – 2.32 (m, 4H), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 1.38 (s, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 195.0, 171.6, 123.0, 116.0, 110.7, 79.8, 36.6, 28.8, 28.5, 20.8$.

11 was prepared from **S10** according to a literature procedure.¹²

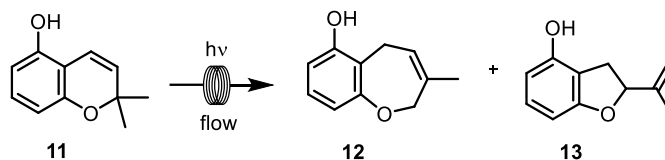
To a flame-dried 10 mL sealed tube equipped with a magnetic stirring bar was added DDQ (151 mg, 0.667 mmol) followed by 1,4-dioxane (4.3 mL) and **S10** (54.0 mg, 0.303 mmol). The vessel was then stoppered and heated to 110 °C for 48 h. The reaction mixture was allowed to cool to room temperature, filtered over a pad of celite, reduced *in vacuo* and purified by flash column chromatography eluting in 10% EtOAc:hexanes to afford **11** as an off white solid (27 mg, 0.15 mmol, 51%).

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature.¹²

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.94$ (t, $J = 8.1$, 1H), 6.62 (dd, $J = 10.0, 1.0$, 1H), 6.41 (dt, $J = 8.1, 1.0$, 1H), 6.29 (dd, $J = 8.1, 1.0$, 1H), 5.60 (d, $J = 10.0$, 1H), 4.64 (br s, 1H), 1.43 (s, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 154.1, 151.4, 129.4, 129.1, 116.5, 109.7, 109.5, 107.9, 76.1, 27.9$.

Photochemical ring expansion of chromene **11** to afford **12** and **13** in flow



To a flame-dried round-bottomed flask under a nitrogen atmosphere was added chromene **11** and dry, nitrogen-degassed acetonitrile (0.001 M). The flow system was first flushed with dry degassed acetonitrile then the reagent solution was injected into the photochemical reactor fitted with a pyrex filter at a lamp power of 100% (150 W), a flow rate of 1.2 mL min^{-1} (8.44 min residence time), a system pressure of 3 Bar and a reactor temperature of 30°C . At steady state output, 567 mL (0.567 mmol) reaction mixture was collected, reduced *in vacuo*, then purified by flash column chromatography eluting in 2 – 10% EtOAc:hexanes to afford **12** as a yellow oil (55 mg, 0.31 mmol, 55%) and **13** as a yellow oil (5 mg, 0.028 mmol, 5%).

2,5-Dihydro-6-hydroxy-3-methylbenzoxepine (**12**)

$R_f = 0.23$ (hexane/EtOAc 9:1)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.00$ (t, $J = 8.1$, 1H), 6.69 (dd, $J = 8.1, 1.0$, 1H), 6.55 (dd, $J = 8.1, 1.0$, 1H), 5.65 – 5.58 (m, 1H), 5.12 (br s, 1H), 4.47 – 4.41 (m, 2H), 3.51 – 3.40 (m, 2H), 1.57 – 1.51 (m, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 159.9, 152.4, 134.1, 127.2, 123.5, 120.5, 113.7, 111.6, 74.3, 21.7, 20.0$.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3354, 2924, 1589, 1465, 1283, 1202, 1046$.

HRMS (ESI+): Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_2^+$ [MH^+]: 177.0910; Found: 177.0905.

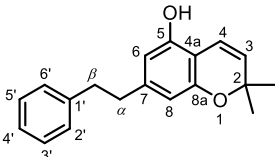
2,3-Dihydro-4-hydroxy-2-isopropenylbenzofuran (**13**)

Spectral data for this compound were consistent with those found in the literature.¹³

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.99 (t, J = 8.0, 1H), 6.43 (app d, J = 8.1, 1H), 6.31 (app d, J = 8.0, 1H), 5.21 (app t, J = 8.8, 1H), 5.12 – 5.08 (m, 1H), 4.93 – 4.90 (m, 1H), 4.79 (br s, 1H), 3.31 (dd, J = 15.3, 9.7, 1H) 2.98 (dd, J = 15.3, 7.9, 1H), 1.80 – 1.76 (m, 3H).

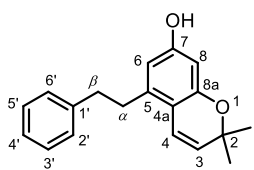
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 161.7, 152.5, 144.0, 129.3, 112.3 (2), 107.7, 102.4, 86.3, 31.8, 17.3.

Table S3: Comparison of NMR data of synthetic chromene 3 with the literature (CDCl₃).^a

	¹ H	Reference (δ ppm, 400 MHz) ⁸	Synthetic compound 3 (δ ppm, 400 MHz)
	3	5.55 d (10.0)	5.55 (d, <i>J</i> = 10.0, 1H)
	4	6.59 d (10.0)	6.58 (d, <i>J</i> = 10.0, 1H)
	6	6.11 s	6.14 – 6.10 (m, 1H)
	8	6.30 s	6.32 – 6.29 (m, 1H)
	(2-CH ₃) ₂	1.42 s	1.42 (s, 6H)
	α	2.77 m	2.80 – 2.73 (m, 2H)
	β	2.86 m	2.92 – 2.83 (m, 2H)
	2'6'	7.17 m	7.22 – 7.15 (m, 3H)
	4'	7.18 m	
	3'5'	7.28 m	7.31 – 7.24 (m, 2H)
	OH	4.82 br s	4.59 (br s, 1H)
		¹³ C	Reference chromene (δ ppm, 100 MHz) ⁸
	2	75.9	76.1
	3	128.5	128.6
	4	116.3	116.4
	4a	107.4	107.6
	5	151.1	151.2
	6	107.9	107.6
	7	143.5	143.7
	8	109.3	109.4
	8a	153.9	154.0
	(2-CH ₃) ₂	27.8	27.9
	α	37.4	37.5
	β	37.9	38.0
	1'	141.7	141.8
	2'6'	128.3	128.5
	3'5'	128.4	128.6
	4'	125.9	126.1

^a¹H and ¹³C NMR calibration performed on solvent peaks at 7.26 and 77.16 ppm respectively.

Table S4: Comparison of NMR data of synthetic chromene **18** with the literature (CDCl₃).^a

	¹ H	Reference (δ ppm, 400 MHz) ⁸	Synthetic compound 18 (δ ppm, 400 MHz)	
		3	5.50 d (10.0)	5.50 (d, <i>J</i> = 10.1, 1H)
4		6.44 d (10.0)	6.44 (d, <i>J</i> = 10.1, 1H)	
6		6.18 s	6.22 – 6.18 (m, 2H)	
8		6.19 s	6.22 – 6.18 (m, 2H)	
(2-CH ₃) ₂		1.40 s	1.40 (s, 6H)	
α		2.80 br s	2.86 – 2.81 (m, 4H)	
β		2.80 br s	2.86 – 2.81 (m, 4H)	
2'6'		7.17 m	7.25 – 7.15 (m, 3H)	
3'5'		7.28 m	7.32 – 7.26 (m, 2H)	
4'		7.18 m		
OH		4.83 br s	Not observed (exchangeable)	
		¹³ C	Reference chromene (δ ppm, 100 MHz) ⁸	Synthetic compound 18 (δ ppm, 101 MHz)
		2	75.6	75.8
		3	127.9	128.1
	4	118.7	118.8	
	5	139.1	139.2	
	6	108.7	108.9	
	7	155.9	154.7	
	8	102.0	102.2	
	9	154.6	154.7	
	10	112.9	113.0	
	(2-CH ₃) ₂	27.7	27.8	
	α	34.4	34.5	
	β	37.4	37.5	
	1'	141.6	141.7	
	2'6'	128.4	128.5	
	3'5'	128.4	128.5	
	4'	126.0	126.1	

^a ¹H and ¹³C NMR calibration performed on solvent peaks at 7.26 and 77.16 ppm respectively.

Table S5: Comparison of NMR data of synthetic Radulanin A **1** with the literature (CDCl₃).^a

	¹ H	Reference (δ ppm, 400 MHz) ¹¹	Synthetic compound 1 (δ ppm, 400 MHz)
	2	4.42–4.40 (m)	4.44 – 4.37 (m, 2H)
	4	5.63–5.59 (m)	5.64 – 5.57 (m, 1H)
	5	3.43–3.39 (m)	3.44 – 3.34 (m, 2H)
	7	6.54 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz),	6.53 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 1H)
	9	6.38 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz)	6.37 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 1H)
	10	1.54 (brs)	1.57 – 1.50 (m, 3H)
	11	2.83–2.78 (m)	2.83 – 2.75 (m)
	12	2.90–2.86 (m)	2.83 – 2.75 (m)
	Ph-H	7.22–7.16 (m)	7.22 – 7.14 (m)
		7.31–7.26 (m)	7.22 – 7.14 (m)
	OH	4.78 (br s)	4.84 (br s)
	¹³ C	Reference (δ ppm, 400 MHz) ¹¹	Synthetic compound 1 (δ ppm, 101 MHz)
	2	74.4	74.4
	3	134.2	134.2
	4	120.7	120.8
	5	21.7	21.8
	5a	120.7	120.8
	6	152.1	152.2
	7	111.6	111.7
	8	141.5 or 141.7	141.8 or 141.5
	9	113.9	113.9
	9a	159.9	159.9
	10	20.3	20.2
	11 and 12	37.6 and 37.7	37.6 and 37.7
	1'	141.5 or 141.7	141.8 or 141.5
	2'3'5'6'	128.5 and 128.6	128.5 and 128.6
	4'	126.1	126.1

^a ¹H and ¹³C NMR calibration performed on solvent peaks at 7.26 and 77.16 ppm respectively.

Table S6: Comparison of NMR data of synthetic **19** with the literature (CDCl₃).^a

	¹ H	Reference (δ ppm, 400 MHz) ⁹	Synthetic compound 19 (δ ppm, 400 MHz)	
	2	5.19 dd (9.5, 7.8)	5.20 (app t, 1H)	
	3	2.93 dd (15.1, 7.8) 3.25 dd (15.1, 9.5)	2.95 (dd, <i>J</i> = 15.0, 8.0 Hz, 1H) 3.27 (dd, <i>J</i> = 15.0, 9.7 Hz, 1H)	
	5	6.13 s	6.17 – 6.14 (m, 1H)	
	7	6.30 s	6.33 – 6.29 (m, 1H)	
	2'	4.90 s 5.08 s	4.94 – 4.90 (m, 1H) 5.12 – 5.07 (m, 1H)	
	3'	1.76 s	1.80 – 1.77 (m, 3H)	
	α	2.79 m	2.85 – 2.77 (m, 4H)	
	β	2.85 m	2.92 – 2.85	
	2''	7.15 m	7.24 – 7.15 (m, 3H)	
	3''	7.29 m	7.33 – 7.24 (m, 2H)	
	4''	7.16 m		
	5''	7.29 m		
	6''	7.16 m		
	OH	5.16 br s	4.80 (br s, 1H)	
		¹³ C	Reference (δ ppm, 400 MHz) ⁹	Synthetic compound 19 (δ ppm, 101 MHz)
		2	86.4	86.5
		3	31.6	31.7
	3a	109.8	109.9	
	4	152.0	152.1	
	5	107.9	108.0	
	6	143.9	144.0	
	7	102.3	102.5	
	7a	161.6	161.8	
	1'	143.9	144.0	
	2'	112.1	112.1	
	3'	17.2	17.3	
	α	37.7	37.9	
	β	37.9	38.0	
	1''	141.7	141.9	
	2''	128.3	128.5	
	3''	128.4	128.5	
	4''	125.9	126.1	
	5''	128.4	128.5	
	6''	128.3	128.5	

^a ¹H and ¹³C NMR calibration performed on solvent peaks at 7.26 and 77.16 ppm respectively.

References

- 1 N. Edayadulla, and Y. R. Lee, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 2013, **34**, 2963 – 2967.
 - 2 L. R. Smith, N. Mahoney and R. J. Molyneux, *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, 169 - 176.
 - 3 P. C. Bulman Page, Y. Chan, A. H. N. Armylisas, M. Alahmdi, *Tetrahedron*, 2016, **72**, 8406 – 8416.
 - 4 V. Dimakos, T. Singh and M. Taylor, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 6703 – 6711.
 - 5 S. C. Soiderman and A. L. Schwan, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 10978 – 10984.
 - 6 L. W. K Moodie, R. Trepos, G. Cervin, K. A. Brathen, B. Lindgard, R. Reiersen, P. Cahill, H. Pavia, C. Hellio and J. Svenson, *J. Nat. Prod.*, 2017, **80**, 2001 – 2011.
 - 7 G-H Min, T. Yim, H. Y. Lee, D. H. Huh, E. Lee, J. Mun, S. M. Oh and Y. G. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2011, **32**, 566 – 570.
 - 8 Y. Asakawa, K. Kondo, M. Tori, T. Hashimoto, S. Ogawa, *Phytochemistry*, 1991, **30**, 219 – 234.
 - 9 Y. Asakawa, T. Hashimoto, K. Takikawa, M. Tori, S. Ogawa, *Phytochemistry*, 1991, **30**, 235 – 251.
 - 10 Y. R. Lee, J. H. Choi, S. H. Yoon, *Tet. Lett.*, 2005, **46**, 7539–7543.
 - 11 W. Zhang, E. Baudouin, M. Cordier, G. Frison and B. Nay, *Chem. Eur. J.*, 2019, **25**, 8643 –8648.
 - 12 P. F. Schuda and W. A Price, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 1972 – 1979.
 - 13 S. C. Pelly, S. Govender, M. A. Fernandes, H.-G. Schmalz and C. B. de Koning, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2857 – 2864.
-

IV Résultats & discussion complémentaires

L'article se concentrant sur l'extension de l'hétérocycle du chromène, la mise au point de la voie de synthèse du précurseur chromène n'y a pas été développée. La réaction de condensation d'un aldéhyde α,β -insaturé avec la dihydropinosylvine **17** utilisée pour la synthèse du Radula chromène a été étendue à la synthèse de différents analogues chromènes (Figure 33). La condensation d'un 1,3-diphénol et d'un aldéhyde α,β -insaturé pour la synthèse de chromènes avait déjà été étudiée avant nos travaux (Lee et al., 2005). Lee et al. ont étudié cette réaction avec l'orcinol et ont employé différents catalyseurs (InCl_3 , $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, pyridine et $\text{Ca}(\text{OH})_2$) sans succès. Ils ont ensuite essayé le diacétate d'éthylènediammonium (EDDA) en tant que catalyseur, et ont pu synthétiser le chromène **29** à partir du résorcinol et du 3-méthyl-2-buténal. En effet, cet acide de Brønsted permet la réaction d'un groupement hydroxyle de la dihydropinosylvine **17** nucléophile avec l'insaturation du 3-méthyl-2-buténal en activant le groupement aldéhyde par protonation. L'efficacité de l'EDDA pour la synthèse du chromène **29** a été étudiée dans 4 solvants différents. Le meilleur rendement a été obtenu lors d'une réaction dans le toluène.

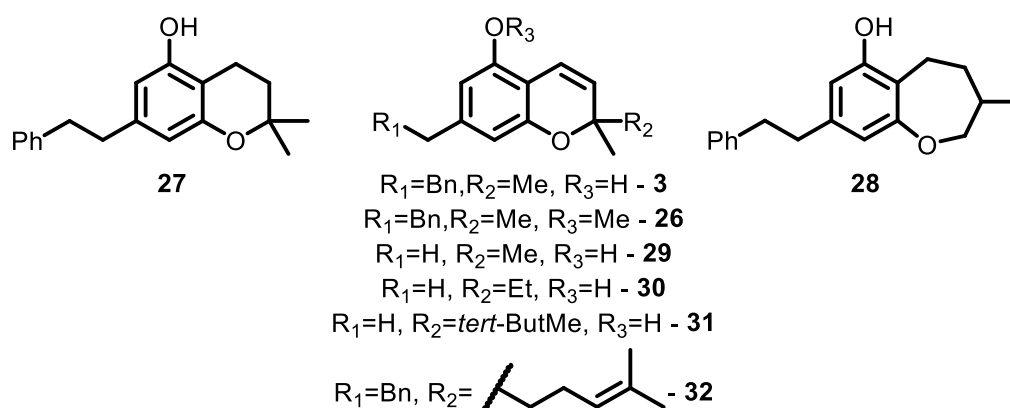


Figure 33 : Composés supplémentaires synthétisés

Au cours de cette thèse, certains analogues, non-mentionnés dans l'article, ont été synthétisés et utilisés pour l'étude des relations structure-activité de la radulanine A (**1**) (Figure 34). J'ai synthétisé le chromène **32** à partir du citral et de la dihydropinosylvine **17** avec un rendement de 64 %. Dr. Lockett-Walters a synthétisé les chromènes **29**, **30** et **31** avec un rendement de 56 %, 39 % et 19 %, respectivement (Figure 34). De plus, j'ai généré deux autres analogues, le Radula chromène O-méthylé **26** ($\eta = 96\%$) et l'analogue chromane **27** ($\eta = 97\%$) par des réactions classiques de méthylation et d'hydrogénation catalytique (Figure 35). L'hydrogénation catalytique de la radulanine A effectué par Dr. Lockett-Walters a permis

la synthèse de l'analogue 1-benzoxépane **28** ($\eta = 29\%$). La phytotoxicité de l'ensemble de ces composés a été étudiée et est développée dans le chapitre II. La partie expérimentale de ces composés supplémentaires (**26** à **32**) se trouve donc en Supporting Information de l'article inclus dans ce deuxième chapitre.

Dans notre article, la réaction de condensation du résorcinol avec le 3-méthyl-2-buténal a permis la synthèse du chromène **29**. Pour la synthèse du Radula chromène, le rendement a été plus important (82 %) que pour le chromène **29**. La longueur de chaîne aliphatique en *meta* des fonctions hydroxyles entre donc en corrélation avec une amélioration du rendement de la condensation. Cette observation est appuyée par les différences de réactivité entre le résorcinol et l'orcinol au cours des études de Lee et al, et suit les règles d'électrophilie aromatique (Lee et al., 2005). De plus, la gamme d'analogues chromènes synthétisés permet d'observer que la longueur de la chaîne aliphatique en *gamma* de l'aldéhyde α,β -insaturé influence de manière négative le rendement de la réaction de condensation. L'encombrement stérique plus important autour de l'alcène entre donc en corrélation avec une baisse de réactivité. Un autre paramètre pouvant expliquer la diminution de rendement en fonction de l'allongement de la chaîne aliphatique est l'augmentation de l'effet inductif donneur sur l'alcène en α,β de l'aldéhyde.

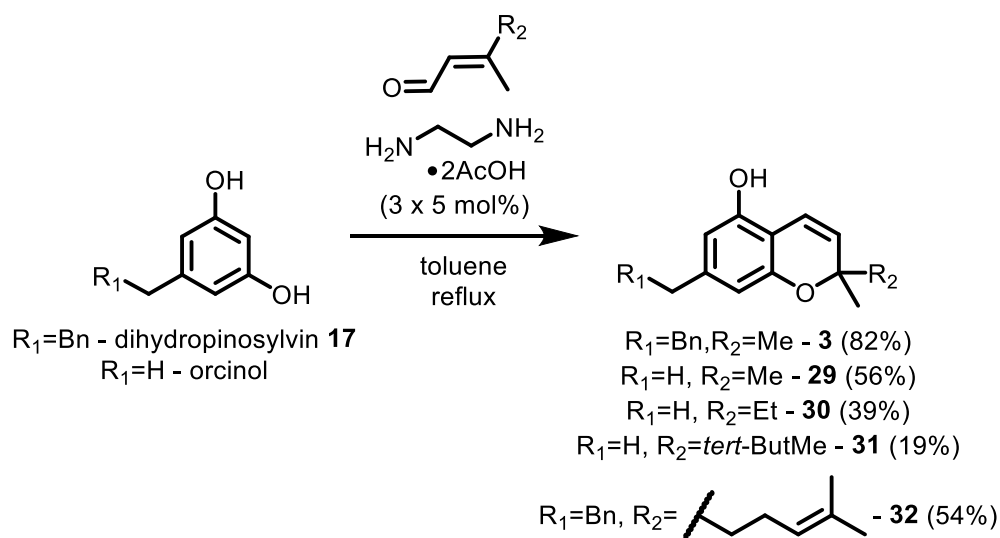


Figure 34 : Synthèse des chromènes supplémentaires issus de la réaction de condensation

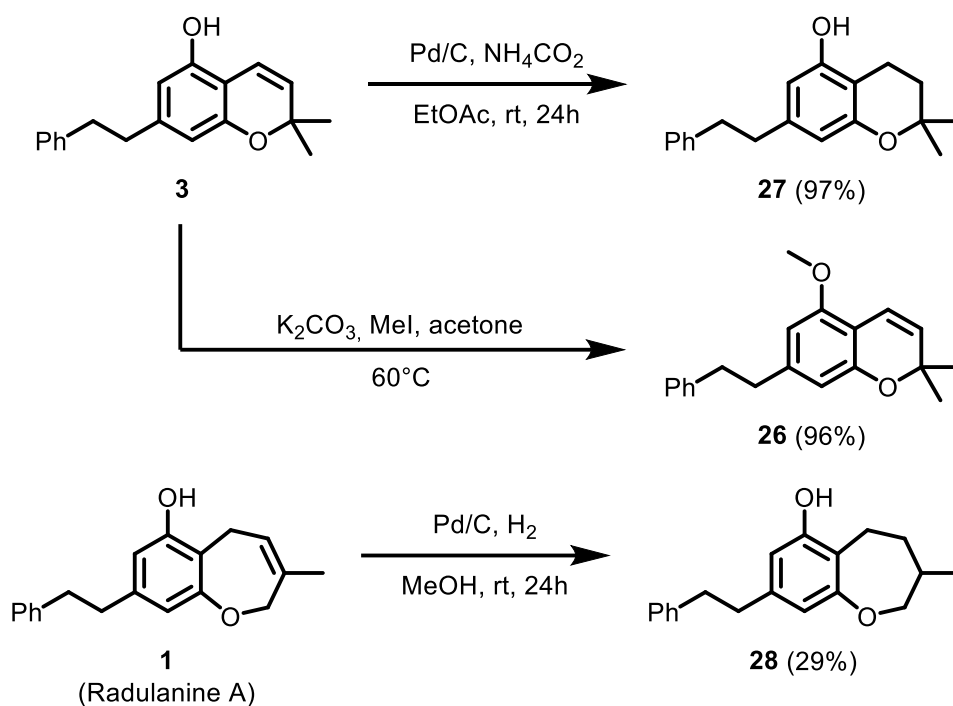


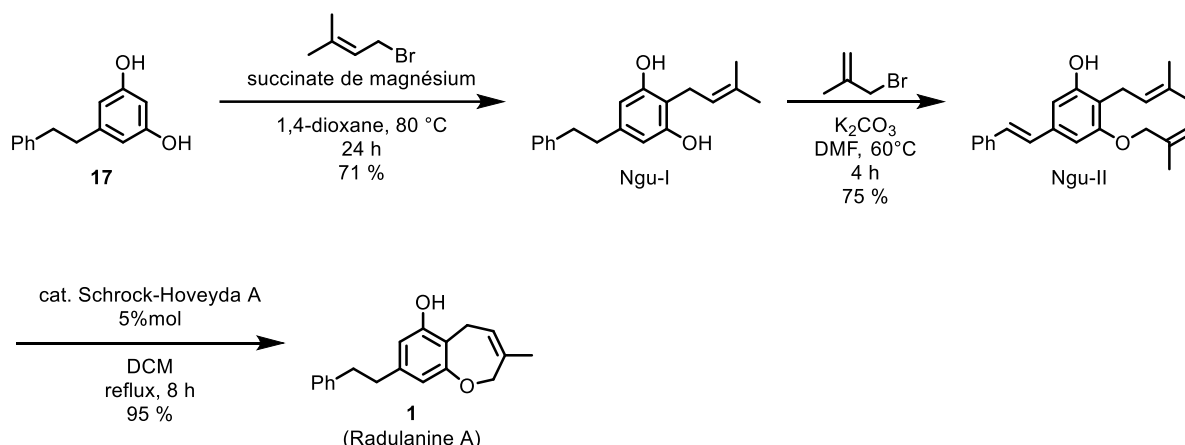
Figure 35 : Synthèse d'analogues structuraux supplémentaires pour l'étude de phytotoxicité

En comparaison avec les procédés de synthèse précédant nos travaux, notre stratégie de synthèse se place comme la plus efficace en termes de rendement si l'on prend en compte la totalité des étapes de synthèse, tout en augmentant la quantité de radulanine A produite (Tableau 4). Depuis la publication de notre travail de synthèse totale, une nouvelle voie employant une métathèse *via* le catalyseur de Schrock-Hoveyda A a permis d'obtenir la radulanine A (**1**) avec un rendement trois fois supérieur à nos travaux (Nguyen et al., 2022). Leur stratégie débute à partir de la dihydropinosylvine **17**, et propose une synthèse en 3 étapes : une allylation catalysée par un carboxylate de magnésium, une réaction de Williamson sur un des deux groupes hydroxyles, puis la fermeture de cycle par métathèse précédemment évoquée (Figure 36). L'ensemble de ces 3 étapes offre un rendement de 51%, là où notre stratégie de synthèse présente un rendement total de 19%. Leur stratégie débute en revanche par la dihydropinosylvine (**17**). En incluant l'obtention de la dihydropinosylvine (**17**) à partir du 2,5-diméthoxybenzaldéhyde (**14**) dans leur stratégie de synthèse (telle qu'effectuée dans notre stratégie), alors le rendement total de leur synthèse revient à 40%.

Tableau 4 : Récapitulatif des synthèses totales publiées de la radulanine A

Année de publication	Auteurs	Méthode de synthèse du cycle 2,5-dihydro-1-benzoxépine	Nb étapes	η_{total}	Echelle de synthèse
1998	Stefinovic & Snieckus	Métathèse d'oléfine via catalyseur Grubbs II	11	14%	-
2000	Yamaguchi et al.	Réaction de Mitsunobu	9	15%	-
2019	Zhang et al.	Réarrangement rétro-Claisen suivi d'une aromatisation	6	9%	24 mg
2022	Lockett-Walters et al.	Extension de l'hétérocycle d'un chromène par photochimie en flux	5	19%	127 mg/24h
2022	Nguyen et al.	Métathèse d'oléfine via catalyseur Schrock-Hoveyda A	6*	40 %*	798 mg

*Etapes et rendement incluant la synthèse de la dihydropinosylvine (17) à partir du 2,5-diméthoxybenzaldéhyde (14) de Lockett-Walters et al., pour comparaison.

**Figure 36 : Stratégie de synthèse de Nguyen et al.**

Notre stratégie utilise du palladium sur charbon dans le cadre de l'hydrogénation catalytique permettant l'obtention de la dihydropinosylvine 17. Le palladium est un métal dont le recyclage est un enjeu majeur face à la demande et la diversité d'utilisation (Paiva, 2017). De nouveaux outils d'hydrogénation catalytique sans métaux tels que les paires frustrées de Lewis (FLPs) sont en développement et pourrait être étudiées pour rendre cette étape plus optimale (Hounjet and Stephan, 2014). Cependant, l'hydrogénation des oléfines par ces FLPs emploient actuellement des solvants éthers à maîtriser avec précaution dans le cadre d'une mise en échelle (Hounjet et al., 2013). La stratégie efficace de Nguyen et al. utilise en fin de

synthèse le 1,4-dioxane en tant que solvant pour la métathèse d'oléfine qui présente les mêmes risques. Par ailleurs, le catalyseur de Schrock-Hoveyda A utilisé contient du molybdène, un métal dont l'emploi doit être réduit afin d'éviter une pénurie potentielle d'ici le prochain siècle (Henckens et al., 2018). Notre stratégie n'utilise pas de métaux rares en fin de synthèse, tel que le ruthénium ou le molybdène utilisés pour une métathèse d'oléfine (Nguyen et al., 2022; Stefinovic and Snieckus, 1998), ou l'osmium utilisé dans la voie du réarrangement rétro-Claisen (Zhang et al., 2019). Par ailleurs, notre voie de synthèse présente un intérêt économique si l'on compare le coût de ces catalyseurs composés de métaux rares (molybdène, ruthénium) face aux réactifs utilisés tels que l'EDDA. Face à ces enjeux de coût, de risques et de chimie durable dans l'éventualité d'une production à plus haute échelle, l'extension de cycle par photochimie en flux conserve donc un intérêt certain, bien qu'une optimisation soit capitale afin d'améliorer le rendement de cette réaction encore limitante pour la synthèse de la radulanine A (**1**).

Une meilleure connaissance des facteurs expérimentaux critiques, *i.e.* la ou les longueurs d'onde à utiliser pour générer l'extension de cycle et le flux de photons à l'intérieur du réacteur, représenterait un point essentiel pour poursuivre l'optimisation de la réaction d'extension de cycle par photochimie en flux. Premièrement, plusieurs états excités $S_{n \geq 1}$ peuvent être induits pour une même molécule, dépendamment de la longueur d'onde utilisée. Ce point est également à prendre en compte pour la température, pouvant générer différents états vibrationnels $T_{n \geq 1}$. Cette multiplicité d'états peut expliquer la formation de différents produits en photochimie (Protti et al., 2019). Les molécules n'absorbant la lumière qu'à des longueurs d'onde spécifiques, Tuten et al. ont étudié le taux de conversion de sulfides de pyrèneacyle en thioaldéhydes en fonction de la longueur d'onde utilisée (Tuten et al., 2017). De façon intéressante, ils ont constaté que le taux de conversion était directement lié au spectre d'absorption des sulfides de pyrèneacyle. Cette recherche constitue un exemple de la dépendance de certaines réactions vis-à-vis de la longueur d'onde utilisée. Un meilleur contrôle sur la ou les longueurs d'onde utilisées pourrait participer à une meilleure sélectivité et une meilleure efficacité de la conversion du Radula chromène (**3**) en radulanine A (**1**), tout en évitant d'éventuelles dégradations (Bonfield et al., 2020). Les filtres utilisés dans notre étude ont été un premier outil de contrôle du spectre de longueurs d'onde auquel le Radula chromène (**3**) est exposé durant la réaction. Dans un objectif de contrôle de la longueur d'onde employée, les LEDs représentent une source d'intérêt car elles permettent une meilleure spécificité des longueurs d'onde engagées. Elle nécessite également moins d'énergie, notamment pour le système de refroidissement à considérer dans l'optique d'une montée en échelle (Bonfield et al., 2020). Ainsi l'utilisation de LEDs en flux, adaptées au spectre

d'absorption du Radula chromène (**3**), pourrait représenter une première voie d'optimisation. Quelle que soit la source utilisée pour la réaction photochimique, définir le flux de photons (exprimé généralement en $\mu\text{mol photons}\cdot\text{s}^{-1}$) au sein du système sera un atout important pour permettre une optimisation plus complète de la réaction. En effet, d'après de la loi d'Einstein-Stark, un photon active une molécule. Ainsi, les photons doivent être considérés comme un réactif à employer, souvent de manière stœchiométrique, et devraient donc être quantifiés. A l'heure actuelle, peu d'études menées sur des réactions photochimiques décrivent cette quantification (Vandekerckhove et al., 2022). Cette dernière est généralement effectuée par actinométrie, *i.e.* par l'utilisation d'une réaction au rendement quantique connu permettant de calculer le nombre de photons absorbés (Bonfield et al., 2020; Vandekerckhove et al., 2022). Le ferrioxalate, dont le spectre d'utilisation inclut la longueur d'onde d'absorption du Radula chromène (**3**), pourrait être utilisé en tant qu'actinomètre. Son utilisation pour la photochimie en flux en revanche est sujet à certaines limitations notamment issues de la formation de bulles de CO_2 ou de solides au sein du tube (Vandekerckhove et al., 2022; Wriedt and Ziegenbalg, 2021). Vandekerckhove et al. ont proposé certaines approches pour palier à ces limitations qui pourront être considérés pour une mesure du flux de photons dans le cadre d'une optimisation de la synthèse de la radulanine A (**1**) (Vandekerckhove et al., 2022).

Dans l'optique d'une amélioration de la synthèse totale de la radulanine A (**1**), notamment pour une montée en échelle, il est également envisageable d'utiliser des moyens biotechnologiques comme outil de synthèse totale (Zhang et al., 2022). Le paclitaxel (Taxol®) est un composé extrait des aiguilles et de l'écorce de *Taxus sp.*, et correspond à l'un des produits anti-cancéreux les plus utilisés mondialement (Gallego-Jara et al., 2020). Sa synthèse repose majoritairement sur la 10-désacétylbaccatine III, un précurseur naturel plus abondant (Baloglu and Kingston, 1999). Malgré tout, cette hémisynthèse nécessite une quantité considérable de matériel végétal pour la production de Taxol® (Li et al., 2017). Ainsi, plusieurs études ont été menées afin de trouver une alternative de biologie synthétique utilisant des endophytes, ou des micro-organismes modifiés (Sabzehzari et al., 2020). Ces études ont pour objectif la synthèse d'un intermédiaire du paclitaxel, le taxadiène, avec un maximum de 1000 mg/L obtenu *via* une culture d'*Escherichia. coli* (Ajikumar et al., 2010). Un autre exemple d'hémisynthèse assisté par un micro-organisme est la production d'artésunate par *Saccharomyces cerevisiae*, permettant ensuite la synthèse de l'artémisinine aux propriétés antipaludiques (Paddon and Keasling, 2014; Ro et al., 2006). Ce processus est utilisé à l'échelle industrielle et représentait un tiers de la production mondiale d'artémisinine en 2014 (PATH, 2014). Néanmoins, certains processus de synthèse totale complets ont été mis au point au sein d'un micro-organisme, tel que la synthèse totale d'opioïdes à partir de la (S)-

réticuline avec *Saccharomyces cerevisiae* (Galanie et al., 2015). Par ces exemples, l'utilisation de micro-organismes pour la synthèse de composés naturels représente un sujet d'étude en pleine expansion, s'incluant de plus en plus dans les chaînes de production des industries chimiques (R. Chen et al., 2020; Galanie et al., 2015). Il est donc intéressant de noter que chacun des intermédiaires synthétiques dans notre stratégie de synthèse est une molécule d'origine naturelle, retrouvée aussi dans les hépatiques du genre *Radula* (Asakawa et al., 2020). La voie de synthèse développée durant la thèse ouvre ainsi la possibilité de s'aider d'un microorganisme conçu pour couvrir certaines étapes du processus de synthèse totale. La biosynthèse de dérivés de la dihydropinosylvine **17** a notamment été étudiée avec les phytocannabinoïdes (Blatt-Janmaat and Qu, 2021; Gülck and Møller, 2020). Un brevet a par exemple été déposé sur une méthode de production de phytocannabinoïdes faisant intervenir l'olivétol, un analogue structural de la dihydropinosylvine **17** dont la chaîne phényléthyle est remplacée par une chaîne pentyle contenue dans le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Figure 37) (Mookerjee et al., 2021).

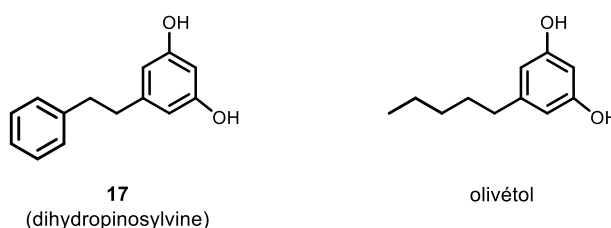


Figure 37 : Comparaison de la dihydropinosylvine à un précurseur biosynthétique de phytocannabinoïdes, l'olivétol

De plus, certains gènes ont été identifiés au sein de *Radula marginata* dont le rôle serait putativement impliqués dans la biosynthèse de phytocannabinoïdes issus des hépatiques du genre *Radula* telle que la perrottétinène (Hussain et al., 2018). En somme, ces récentes découvertes et notre travail de synthèse totale représentent donc une entrée vers une approche de synthèse bio-assistée de la radulanine A (**1**). De plus, notre voie de synthèse totale a permis le développement d'une production plus importante de la radulanine A (**1**), à l'échelle de la centaine de milligrammes, et a ainsi ouvert la voie aux études biologiques présentées dans les chapitres suivants.

Chapitre II : Etude de l'impact de la radulanine A et de certains de ses analogues structuraux sur la photosynthèse

I Contexte et objectifs de l'étude

Parmi les modes d'action phytotoxiques recensés, un grand nombre de molécules, naturelles ou synthétiques, ont été décrites pour leur effet délétère sur la photosynthèse (cf Introduction Générale – III.1). Quelques données suggèrent que certains analogues structuraux de la radulanine A, tels que l'acide lunularique ou encore la pinosylvine, inhibent la photosynthèse, bien que leur mode d'action sur ce processus soit pour l'heure inconnu (Gorham and Coughlan, 1980). Durant ma thèse, le travail effectué sur l'étude de la phytotoxicité de la radulanine A et de ses analogues structuraux a montré que la cinétique d'apparition de la chlorose, phénotype marqueur de l'effet phytotoxique de la radulanine A, est modulée par l'exposition à la lumière.

Compte tenu de cette observation, une collaboration a été établie avec B. Bailleul à l'Institut de Biologie Physico-Chimique (UMR7141 « Biologie du Chloroplaste et Perception de la Lumière chez les Microalgues) afin de rechercher l'impact éventuel de la radulanine A et de ses analogues sur la photosynthèse. Cette collaboration avait pour objectif d'étudier l'effet des molécules obtenues au chapitre I sur la fonctionnalité de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique, principalement par analyse de la fluorescence des chlorophylles. Afin d'affiner cette analyse, j'ai effectué une mission à l'Imperial College de Londres, en collaboration avec S. Viola. Cette collaboration m'a permis d'étudier plus directement l'effet de la radulanine A et du Radula chromène sur les sous-structures du PSII, par une approche de thermoluminescence. L'ensemble des résultats obtenus a permis de mettre en évidence le mode d'action de la Radulanine A en tant qu'inhibiteur du PSII. Ils ont également permis de mettre en lumière l'impact de la structure de la radulanine A sur sa phytotoxicité (tel que représenté dans l'Annexe 1). Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Pest Management Science*, qui représente le corps de ce chapitre. Une aide à la compréhension des techniques utilisées dans cet article est présentée dans l'Annexe 2.

II Article : Mode of action of the natural herbicide radulanin A as an inhibitor of photosystem II.

Article publié en Juin 2023 dans *Pest Management Science*

Auteurs : Simon THUILLIER^{1,2}, Stefania VIOLA^{3,#}, Bruce LOCKETT-WALTERS², Bastien NAY², Benjamin BAILLEUL⁴ and Emmanuel BAUDOIN^{1,*}

¹Laboratoire de Biologie du Développement, Institut de Biologie Paris Seine, Sorbonne Université, CNRS, Paris 75005, France

²Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, CNRS, Institut Polytechnique de Paris, Palaiseau 91128, France

³Department of Life Sciences, Imperial College – South Kensington Campus, London, UK

⁴Chloroplast Biology and Light-sensing in Microalgae-UMR7141, IBPC, CNRS-Sorbonne Université, Paris, France

#Current address : Photosynthesis & Environment team, Institut de Biosciences & Biotechnologies d'Aix-Marseille-UMR7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-Lez-Durance 13115, France

*Auteur correspondant :

Email : emmanuel.baudouin@sorbonne-universite.fr

Mode of action of the natural herbicide radulanin A as an inhibitor of photosystem II.

Running title: Mode of action of radulanin A phytotoxicity

Simon THUILLIER^{1,2}, Stefania VIOLA^{3,#}, Bruce LOCKETT-WALTERS², Bastien NAY², Benjamin BAILLEUL⁴ and Emmanuel BAUDOIN^{1,*}

¹Laboratoire de Biologie du Développement, Institut de Biologie Paris Seine, Sorbonne Université, CNRS, Paris 75005, France

²Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, CNRS, Institut Polytechnique de Paris, Palaiseau 91128, France

³Department of Life Sciences, Imperial College – South Kensington Campus, London, UK

⁴Chloroplast Biology and Light-sensing in Microalgae-UMR7141, IBPC, CNRS-Sorbonne Université, Paris, France

#Current address : Photosynthesis & Environment team, Institut de Biosciences & Biotechnologies d'Aix-Marseille-UMR7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-Lez-Durance 13115, France

Simon Thuillier (simon.thuillier@sorbonne-universite.fr)

Stefania Viola (stefania.viola@cea.fr)

Bruce Lockett-Walters (brucewalters74@gmail.com)

Bastien Nay (bastien.nay@polytechnique.edu)

Benjamin Bailleul (bailleul@ibpc.fr)

Emmanuel Baudouin (emmanuel.baudouin@sorbonne-universite.fr)

*Corresponding author :

Emmanuel Baudouin

Sorbonne Université, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS)

Laboratoire de Biologie du Développement, UMR CNRS 75622

Bâtiment C/2, boîte courrier 24

9 quai St Bernard

75252 PARIS cédex 05 -France-

Email : emmanuel.baudouin@sorbonne-universite.fr

Tel : (+33) 1-44-27-59-87

Abstract

BACKGROUND

Radulanin A is a natural 2,5-dihydrobenzoxepin synthesized by several liverworts of the *Radula* genus. Breakthroughs in the total synthesis of radulanin A paved the way to the discovery of its phytotoxic activity. Nevertheless, its mode of action remained so far unknown and was investigated in *Arabidopsis thaliana*.

RESULTS

Radulanin A phytotoxicity was associated with cell death and partially depended on light exposure. Photosynthesis measurements based on chlorophyll *a* fluorescence evidenced that radulanin A and a *Radula* chromene inhibited photosynthetic electron transport with IC₅₀ of 95 μM and 100 μM, respectively. We established a strong correlation between inhibition of photosynthesis and phytotoxicity for a range of radulanin A analogs. Based on these data, we also determined that radulanin A phytotoxicity was abolished when the hydroxyl group was modified and was modulated by the presence of the heterocycle and its aliphatic chain. Thermoluminescence studies highlighted that radulanin A targeted the Q_B site of the Photosystem II with a similar mode of action as 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU).

CONCLUSION

We establish that radulanin A targets Photosystem II, expanding Q_B sites inhibitors to bibenzyl compounds. The identification of an easy-to-synthesize analog of radulanin A with similar MoA and efficiency might be useful for future herbicide development.

Keywords : Radulanin A ; dihydrooxepines ; photosynthesis ; *Arabidopsis thaliana* ; Photosystem II ; Q_B site

1 INTRODUCTION

Weed management is a major issue for agriculture and essentially relies on the use of synthetic herbicides that represent more than half of the pesticide quantities sold annually.¹ Among synthetic herbicides, glyphosate holds a highly dominant position because of its broad-spectrum efficacy, relatively low cost, and the introduction of glyphosate-resistant crops in the 1990s. Herbicides cause severe damages to plant organs, possibly leading to the death of the entire plant. They differ in their phytotoxic dose range and host spectra, which can reflect a variety of modes of penetration and modes of action (MoA).² Nevertheless, the synthetic herbicides currently used target a limited array of metabolic pathways including photosynthesis, protein and lipid synthesis or cell wall formation, thereby favoring the selection of resistant weeds and jeopardizing weed management (² and references therein). The emergence of extensive herbicide resistance, together with the strengthening of environmental and health policies that restrict the use of synthetic herbicides, have raised new challenges and renewed interest in the search for new and environmentally-safer molecules.³ In this context, natural products represent a wide source of bioactive molecules still under-utilized as herbicides. Interestingly, natural compounds structures generally lack halogen atoms or 'unnatural' rings, which could reduce their environmental impact by limiting their effective duration in the field compared to synthetic herbicides.⁴

The bryophyte lineage, that includes liverworts, hornworts and mosses, gathers the closest living relatives of the ancestral land plant species.⁵ It rapidly diverged from the tracheophyte lineage and may therefore have retained ancestral traits present in land plant ancestors and lost in tracheophytes. Interestingly, bryophytes exhibit a remarkable and specific chemical diversity that has been poorly studied.⁶ Nevertheless, more than 2,000 secondary metabolites have been characterized in bryophytes, including a variety of

terpenoids, flavonoids and lipids.⁷ Among bryophytes, liverworts present the largest repertoire of natural products. In particular, they synthesize a huge diversity of bibenzyl-related compounds that has been recently reviewed in *Marchantiophyta* and in *Radula* genera.^{8,9} Although their bioactivity is generally unknown, several bibenzyl-related compounds such as marchantins and perrottetins, exhibit antifungal, antimicrobial, anti-trypanosomal, and/or anti-viral activities and affect a large range of physiological and biochemical processes.⁹ Beside these rare reports, no information is available on their possible phytotoxicity and potential as herbicide.

Radulanin A, 3-methyl-8-(2-phenylethyl)-2,5-dihydro-1-benzoxepin-6-ol, belongs to the 2,5-dihydrobenzoxepin group of bibenzyl compounds and has been isolated from liverworts of the *Radula* genus.⁸ Scarce information on the bioactivity of radulanin A and its relatives, e.g. radulanin H and L, include the inhibition of calmodulin and lipoxygenase activities and the inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated macrophages.^{10,11} Recently, together with the development of a new and simpler total synthesis of radulanin A, its phytotoxicity to the model plant *Arabidopsis thaliana* was described.^{12,13}

In the present study, radulanin A phytotoxicity and MoA were further investigated using radulanin A analogs and synthetic intermediates. We report that radulanin A and a *Radula* chromene¹⁰ which is also a synthetic precursor of radulanin A, impair *Arabidopsis* photosynthetic activity and thereby trigger plant death. Both compounds target photosystem II (PSII) at the Q_B site and therefore expand the structural diversity of herbicidal Q_B site inhibitors. We also report the requirement of the phenol group for chromene bioactivity.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Culture and treatment of *Arabidopsis thaliana* seedlings

Seeds of *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 (Col-0) were surface-sterilized as previously described.¹⁴ Fifteen seeds were sown per well in sterile 96-well plates in the presence of 150 μL of sterile distilled water and stratified for 3 days at 4 °C. Plates were then transferred in a growth chamber at 21°C, under continuous light (40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). After 9-13 days, water was removed and replaced by 200 μL of sterile distilled water supplemented with the proper concentrations of tested chemicals, that we prepared through known procedure¹² by the condensation of dihydropinosylvin and appropriate aldehydes (for full description, refer to Supplementary Material). Stock solutions (40 mM in DMSO) were stored at -20 °C and diluted extemporaneously in water (35-400 μM final) for plantlet treatment. For all conditions, the final concentration of DMSO represented $\leq 1\%$ of the total volume used for treatment. Bromoxynil and 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Stocks solutions (100 mM for bromoxynil and 10 mM for DCMU in ethanol) were diluted extemporaneously before treatment in water (100 μM and 10 μM final, respectively). In all experiments, plantlets treated with 1% DMSO were used as controls.

2.2 Chlorophyll fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence measurements were performed on seedlings (10-15 per well) in a 96-well plate at room temperature using a fluorescence imaging setup (Speedzen, JBeamBio, France). Samples were dark adapted for 10 min prior to analysis. Green LEDs provided actinic light at 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and saturating pulses at 2600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Measurement pulses were provided by blue LEDs. Maximal quantum efficiency of PSII was calculated as $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, where F_o and F_m are the fluorescence emission measured before and at the end of a 200 ms saturating pulse, respectively, in dark adapted leaves. Φ_{PSII} was calculated as $(F_m' - F)/F_m'$, with F being the steady-state fluorescence

reached in presence of illumination with actinic light and F_m' being the fluorescence emission measured at the end of a 200 ms saturating pulse, in the light-adapted leaves. Non photochemical quenching (NPQ) was calculated as $(F_m - F_m')/F_m'$.¹⁵ Data were obtained from two independent experiments gathering 6 biological samples (60-90 plantlets).

2.3 P700 redox state measurements

P700 redox state was measured at room temperature through transient absorption changes by a Joliot-type spectrophotometer (JTS-10, Biologic, Grenoble, France). The absorption changes were measured at 705 ± 6 nm. The actinic light was provided by a crown of red LEDs ($\lambda = 619$ nm) at $26 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, that also provided the 20 ms saturating light pulses at $5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Seedlings from 4 wells treated separately were pooled to cover the light path for each replicate. Data from each condition represent the mean \pm S.D from 3 independent biological replicates.

2.4 Thermoluminescence

Thermoluminescence curves were measured with a laboratory-built apparatus, described in De Causmaecker et al. (<https://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/68272>). Samples were cooled to -20 °C and excited with a single turnover saturating laser flash (Continuum Minilite II, frequency doubled to 532 nm, 5 ns FWHM). The samples were then incubated in the dark at -20 °C for 30 s, before heating from -20 °C to 80 °C at 1 °C s^{-1} . When used, Arabidopsis seedlings immersed in water were incubated in the dark at room temperature in presence of $400 \mu\text{M}$ radulanin A, $10 \mu\text{M}$ DCMU or $100 \mu\text{M}$ bromoxynil for the indicated amount of time before the measurements. PSII-enriched membrane fragments from spinach, prepared according to Berthold et al.¹⁶ were diluted to a final chlorophyll concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ in

ice-cold resuspension buffer (50 mM MES-NaOH pH 6.5, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 1.2 M betaine, 20 % w/v glycerol). The samples were pre-illuminated with room light for 10 s and then kept in the dark on ice for at least 1 hour before measurement. When tested, 400 µM radulanin A, 10 µM DCMU or 100 µM bromoxynil were added to the dark-adapted samples either right before measurement or for a specific incubation time. As controls, thermoluminescence curves were measured using plantlets or membrane fragments treated with 1% DMSO.

2.5 Statistical analysis

Results are represented as mean ± standard deviation (SD). Differences between control condition and other treatments were analyzed with GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego USA) using One-Way ANOVA followed by post-hoc Dunn's test.

3 RESULTS

3.1 Radulanin A and its precursors and structural analogs present different level of phytotoxicity on *Arabidopsis*.

As previously reported, radulanin A exhibited a phytotoxic effect on *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* in the following) seedlings.¹³ To obtain insights into the structures required for radulanin A biological activity, we compared its toxicity to that of its synthetic precursors and several structural analogs that we synthesized according to the procedure described in Supplementary material and in Lockett-Walters et al.¹² Thus, the phytotoxicity of these 11 structural analogs of radulanin A was compared using chlorosis as a proxy for plantlet death (Fig. 1). As reported previously¹³, chlorosis was observed upon radulanin A (4) treatment. Chlorosis was obvious after 7 days of treatment and for doses above

100 μM (Fig. 1). Radulanin A cyclic analogs and their saturated versions (compounds **3**, **5**, **7**, and **8**) had a similar efficiency. In contrast, dihydropinosylvin (**2**) was slightly less active, with a minimum concentration of 150 μM required to induce chlorosis. This lower activity was more obvious with chromene **9** and chromene **10**, for which only the higher dose tested induced bleaching. Finally, *O*-methylated dihydropinosylvin (**1**), *O*-substituted chromene **6**, chromene **11** and chromene **12** were not phytotoxic. The same effects were observed when the death of seedlings was directly analyzed using Trypan blue staining, indicating that the effect of radulanin A and its bioactive analogs led to cell death (Fig. S1). As a whole, these data indicate that the bioactivity of radulanin A requires the presence of its hydroxyl group and is modulated by the presence of the heterocycle and its aliphatic chain.

3.2 Radulanin A and several analogs impair photosynthesis.

When radulanin A treatments were carried out in darkness, no chlorotic phenotype was observed, indicating that light was required for phytotoxicity (Fig. S2). We therefore postulated that photosynthesis was likely targeted by radulanin A and its analogs. To assess their impact on photosynthesis, we first treated plants for 12 h and then used chlorophyll *a* fluorescence to probe PSII activity (Fig. 2). We measured the maximal quantum yield of PSII and its quantum yield under illumination (F_v/F_m and Φ_{PSII} respectively, see Material and Methods). F_v/F_m is measured in dark-adapted plants, and represents the maximum capacity of PSII for photochemistry. The F_v/F_m of control seedlings was 0.79 ± 0.01 , a typical value for healthy plants (Fig. 2A), and was not statistically altered in the presence of 1% DMSO (Fig. S3). It indicates that approximately 79 % of the photons absorbed by the PSII end up being converted into a photochemical event when the PSII is not constrained by downstream reactions. Treatments with radulanin A or Radula chromene **3** resulted in a dose-dependent decrease in F_v/F_m in a concentration range of 35-400 μM , indicating that the integrity/photochemical capacity of PSII is impaired (IC_{50} are 95 μM and 100 μM for radulanin A and

Radula chromene **3**, respectively; Table 1). The quantum yield of PSII was also measured under a 10 min green illumination ($120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, see Material and Methods). Once steady state photosynthesis is achieved, Φ_{PSII} does not only depend on the intrinsic photochemical capacity of PSII but also on the rate-limiting step of the photosynthetic electron transfer chain (ETC) downstream of it, because of the serial work of photosynthetic complexes. Similarly to F_v/F_m , Φ_{PSII} was inhibited by both molecules in the same concentration range and with a comparable calculated IC_{50} ($89 \mu\text{M}$ and $101 \mu\text{M}$ for radulanin A and Radula chromene **3**, respectively) (Fig. 2B and Table 1).

The effect of the different analogs on Φ_{PSII} was compared after 12h of treatment at $400 \mu\text{M}$ (Fig. 2C). Compared to DMSO treatment, radulanin A and all compounds inducing seedling chlorosis (Fig. 1) inhibited Φ_{PSII} . The Φ_{PSII} inhibition was less pronounced for chromene **9** and **10**, in agreement with their lower phytotoxicity and was absent for compounds that did not induce chlorosis, such as *O*-methylated compounds (**1** and **6**) and chromene **12**. At a lower dose ($100 \mu\text{M}$), only radulanin A, Radula chromene (**3**), tylimanthin B (**5**) and chromane (**7**) statistically inhibited Φ_{PSII} (Fig. 2D). Together, these data indicate a strong correlation between ETC inhibition and chlorosis-based phytotoxicity assessment, suggesting that the primary target of the herbicide radulanin A is photosynthetic ETC.

To clarify the primary target of radulanin A in photosynthetic ETC, we followed the kinetics of F_v/F_m and Φ_{PSII} as a function of treatment duration (Fig. 3A and 3B). The magnitude and kinetics of the F_v/F_m decrease depended on the concentration of radulanin A. The final F_v/F_m values after 12 h of treatment were 0.49 ± 0.14 , 0.20 ± 0.10 and 0.12 ± 0.09 for 100, 150 and $400 \mu\text{M}$ of radulanin A, respectively. In water without any addition or in the presence of 1% DMSO (Fig. S3A), the F_v/F_m remained constant throughout the experiment (0.80 ± 0.01). The rate of decline in F_v/F_m over time was also correlated with radulanin A concentration: F_v/F_m values reached steady state after approximately 8 h with $400 \mu\text{M}$ but still decreased after 12 h with $100 \mu\text{M}$ radulanin A (Fig. 3A). Φ_{PSII} decreased over time for all radulanin A concentrations and reached a plateau after 5 to 10 h (Fig. 3B). No effect was observed in the presence of 1 % DMSO compared to water conditions, with values of 0.59-0.6 throughout the

experiment (Fig. S3B). After 12 h of treatment, Φ_{PSII} was 0.28 ± 0.13 , 0.13 ± 0.08 and 0.07 ± 0.08 at 100 μM , 150 μM and 400 μM radulanin A, respectively. The inhibition of the photosynthetic electron transfer also resulted in a decrease of Non-Photochemical Quenching (NPQ) (Fig. 3C). The fast fluorescence rise at the dark-to-light transition (which is similar to the OJ part of the OJIP curves, see (Stirbet and Govindjee, 2011)) displays a higher magnitude after 15 minutes of 400 μM radulanin A treatment, compared to the control (Fig. 3D).

Similar magnitudes and kinetics of F_v/F_m and Φ_{PSII} inhibition were measured for Radula chromene (**3**) and similar effects were also observed on NPQ or fluorescence increase at the light onset (Fig. S4). Interestingly, after 15 min of treatment, Φ_{PSII} was reduced under radulanin A or Radula chromene treatment when F_v/F_m remained unchanged (Fig. 3A and 3B, Fig. S4A and S4B). The fact that the decrease of Φ_{PSII} preceded that of F_v/F_m indicates that the initial target of radulanin A is not the photochemistry of PSII *per se* but another step of the ETC and that the degradation of the integrity/photochemical capacity of PSII comes later or is an indirect consequence of inhibition of this step of ETC.

3.3 The site of action of radulanin A is located in the inter-system chain.

Since radulanin A and its structural analogs inhibit photosynthetic ETC, we wanted to localize more precisely the site of inhibition and wondered whether the inhibition was downstream or upstream of Photosystem I (PSI). For this, we investigated the redox state of P700, the chlorophyll PSI, during continuous illumination under treatments of different durations with radulanin A or analogs (Fig. 4). Under control conditions, Arabidopsis seedlings have 47 ± 3 % of P700 oxidized (compared to the maximum of photo-oxidizable P700) under illumination conditions (see Material and Methods). A similar value (46 ± 2 %) was obtained after treatment with the hitherto ineffective *O*-methylated chromene **6** at 400 μM (Fig 4A and 4B). As expected, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), a well-known and effective PSII inhibitor (used at 10 μM), led to an accumulation of 97 ± 1 % of P700⁺.

Radulanin A and chromene **3** (both used at a concentration of 400 μM) induced the accumulation of $69 \pm 4 \%$ and $72 \pm 5 \%$ of P700^+ , respectively. The higher oxidation of P700 after treatment with radulanin A and chromene **3** implies that the site of inhibition is located upstream of PSI photochemistry in the ETC. Together with the higher amplitude of the OJ phase at the light onset in the presence of radulanin A and its analogs, this pinpoints the site of inhibition between PSII and PSI photochemical events, *i.e.* in the inter-system chain. Such phenotypes are characteristic of PSII Q_B site inhibitors such as DCMU and prompted us to test the hypothesis that radulanin A and its analogs target the Q_B site of PSII with thermoluminescence (TL) ¹⁷.

3.4 Radulanin A and chromene 3 are Q_B site inhibitors.

PSII-enriched membrane fragments from spinach were employed to study the effect of radulanin A and two structural analogs, Radula chromene **3** and its *O*-methylated analog **6**, as well as two control Q_B site inhibitors, bromoxynil and DCMU ¹⁸ on thermoluminescence curves (Fig. 5A and 5B). All compounds were applied at 400 μM , except bromoxynil and DCMU which were used at 100 μM and 10 μM respectively, as previously described ^{19,20}. In DMSO-treated control samples, maximum thermoluminescence was observed at 44°C (Fig. 5). Such temperature which corresponds to T_{max} is typical for the $\text{S}_2\text{Q}_\text{B}^-$ recombination ¹⁷. Treatments with DCMU and bromoxynil led to a shift of T_{max} towards 16 °C and 4°C, respectively (Fig. 5A). Such change in T_{max} values reflects a recombination of the $\text{S}_2\text{Q}_\text{A}^-$ state, where the electron is blocked at the Q_A site ^{17,18}. In the presence of radulanin A, maximum thermoluminescence was reached for a T_{max} of 14 °C, similar to that of DCMU (Fig. 5A). The thermoluminescence curve measured in the presence of Radula chromene **3** overlapped that of radulanin A, with a similar T_{max} of 15 °C (Fig. 5B). In contrast, application of *O*-methylated chromene **6** did not modify the T_{max} (41°C) measured under control conditions. As observed in Fig. 5C, the effect of radulanin A on T_{max} shift depended on the concentration applied. Indeed, T_{max} decreased to 33°C, 19°C and 15°C when 50 μM , 200 μM and 400 μM of radulanin A were applied, respectively. Finally, to

examine the kinetics of radulanin effect on T_{max} , thermoluminescence curves were acquired after different duration of treatment (Fig 5D). The effect of radulanin A addition on the T_{max} shift was immediate, and no further changes in the TL peak were observed during further 6 h of treatment. As a whole, these results indicated that radulanin A and Radula chromene **3** function as Q_B inhibitors.

To further address the effect of radulanin A *in planta*, thermoluminescence measurements were also performed on Arabidopsis seedlings (Fig. 6). In DMSO-treated plantlets thermoluminescence arising from $S_2Q_B^-$ recombination was observed, having a T_{max} of 40-50 °C. As observed in PSII-enriched membrane fragments, a shift of the T_{max} (to 0.5°C, in seedlings) was observed 6h after radulanin A treatment (Fig. 6A and 6B). Interestingly, this shift occurred progressively (Fig. S5), in contrast to experiments performed on PSII-enriched membrane fragments where changes were immediate (Fig. 5D). Compared to radulanin A, DCMU and bromoxynil treatments led to similar changes in T_{max} (Fig. 6A). As observed in Fig. 5B, application of chromene **3** to plantlets mimicked the effect of radulanin A, when its O-methylated analog did not modify T_{max} significantly (Fig. 6B). Radulanin A and Radula chromene **3** therefore appear as potent Q_B site inhibitors *in planta*.

4 DISCUSSION

Radulanin A is a 2,5-dihydrobenzoxepin found in numerous liverworts of the *Radula* genus that exhibits phytotoxicity towards *Arabidopsis thaliana*¹³. In the present study, we evidenced that the herbicide activity of radulanin A involves the inhibition of photosynthetic electron transport and requires specific structural features shared by some of its bioactive precursors and analogs. Through our investigation, chlorosis and permanent damage were correlated with the inhibition of photosynthesis. Chlorophyll *a* fluorescence brought a first insight in the alteration of the photosynthetic ETC after treatment. Since short treatment times induced a decrease of ϕ_{PSII} but not of

Fv/Fm, it was concluded that the studied phytotoxic compounds did not inhibit the capacity of PSII to perform photochemistry.

Most of the herbicides, but also structurally-unrelated natural products, affecting the photosynthetic ETC specifically target the Q_B site of PSII, mainly formed by its D1 protein subunit²¹⁻²⁶. Others, such as diquat or paraquat, divert photosynthetic electrons downstream PSI^{27,28}. The higher oxidation of P700 during illumination induced by radulanin A indicated that the site of inhibition is located upstream of PSI. As we evidenced by thermoluminescence studies performed on PSII-enriched membrane fragments, radulanin A and chromene **3** function as photosynthesis inhibitors by binding to the Q_B site. Indeed, treatments with either compound led to TL curves and T_{max} similar to those observed after treatment with the Q_B site inhibitor DCMU, but higher than those observed in presence of the herbicide bromoxynil, another well-known Q_B site inhibitor. Such differences in thermoluminescence curves have been previously reported for bromoxynil and DCMU and serve for herbicide classification¹⁸. Interestingly, contrarily to PSII-enriched membrane fragments, TL ratio between 0.5 °C and 50 °C was modified in radulanin A-treated seedling in a time-dependent manner. This variation illustrates a progressive increase of Q_A^- and decrease of Q_B^- ¹⁷ which was not observed in PSII-enriched membrane fragments where only $S_2Q_A^-$ recombination TL peak is present right after the addition of the inhibitor. While the binding of the inhibitor to the Q_B site is instantaneous as observed for PSII-enriched membrane fragments, such delay in intact seedlings reflects the time-dependent diffusion towards the site of action. Moreover, DCMU-treated seedlings displayed a low TL at 50 °C while TL at 0 °C was very intense, in contrast to radulanin A treatment. This difference implies that more Q_B sites are occupied by DCMU than by radulanin A after 5 h of treatment and suggests that radulanin A binds to the Q_B site less efficiently than DCMU. Because comparable TL curves and T_{max} are observed for radulanin A and DCMU treatments, it is likely that radulanin A (and Radula chromene **3**) binds to Q_B site in a similar way to DCMU, possibly *via* a hydrogen bond to D1-Ser264 as reported for DCMU²⁹. In contrast, radulanin A binding to Q_B site differs from bromoxynil binding, although both

molecules share a phenol group that is absent in DCMU and is important for bromoxynil binding ²⁹. Docking studies evidenced that bromoxynil binding within Q_B site depends on the protonation of the phenol group. Indeed, protonated bromoxynil docks in the Q_B site by interacting with D1-Phe265/Ser264 whereas its deprotonated form binds to D1-His215 ²⁹. *In vivo*, bromoxynil scarcely binds to D1-Phe265/Ser264 because the low pKa (4.2) of its phenol group ³⁰ compared to stromal pH (7-8) ³¹ makes the phenol group mostly deprotonated. This behavior can be extrapolated to our experimental setup in which pH was maintained to 6.5. In these conditions, based on its chemical environment, the phenol group of radulanin A is expected to be essentially protonated within the Q_B site due to a pKa (~9.5) higher than external pH, which could account for the differences observed between radulanin A and bromoxynil. Docking studies are now required to further investigate these hypotheses and to determine if radulanin A docking only involves a hydrogen bond with D1-Ser264 or involves additional bonds, as reported for a range of natural herbicides. Compared to other natural Q_B site inhibitors *e.g.* stigmatellin³², sorgoleone²³, fischerellin³³ or patulin²² and with the exception of gliotoxin³⁴ and tenuazonic acid³⁵, radulanin A presents a high I₅₀ for Φ_{PSII} , suggesting it is a rather weak inhibitor of PSII. Therefore, beside its action at Q_B site, it cannot be ruled out that radulanin A also impacts the function of additional targets, as has been observed for other natural inhibitors of the Q_B site. For instance, stigmatellin from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* not only targets the Q_B site but also inhibits the cytochrome *b₆f* complex ³².

The identification of radulanin A as a potent photosynthesis inhibitor made it possible to investigate the structural requirements for radulanin A bioactivity. To address this issue, we synthesized radulanin A precursors and analogs ¹² and tested their inhibitory effect on ETC. Interestingly, seven of the compounds (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6** and **12**) tested in these experiments are also naturally found in *Radula* species ⁸ and in a variety of other plant species in the case of **1** and **2** ³⁶⁻⁴². On the one hand, the absence or substitution of the phenol group abolished ETC inhibition. To a lesser extent, the absence of the phenylethyl chain and the elongation of the lipophilic chain of the

heterocycle, also reduced inhibition, that was only observed for the highest doses tested. The cyclic analogs and their hydrogenated versions, instead, showed a similar inhibition efficiency as radulanin A. Strikingly, the efficiency of radulanin A analogs to inhibit photosynthetic ETC fully correlated with their ability to trigger plant death, indicating that the inhibition of photosynthetic ETC activity is an essential aspect of their phytotoxicity. Moreover, the comparison of the modes of action of radulanin A and Radula chromene **3** highlighted that both molecules impair ETC through the inhibition of Q_B site. In the same experiments, *O*-methylated chromene did not inhibit ETC and did not bind Q_B site. It is therefore likely that the biologically-active radulanin A analogs, *i.e.* based on a phenolic bibenzyl backbone, share the same MoA. Beside those tested, numerous radulanin A analogs have been identified in *Radula* species ⁸ that could be screened for ETC inhibition to further investigate the structural bases of radulanin A bioactivity. Furthermore, several natural products from the orchid *Epidendrum rigidum* reported as phytotoxic also share a phenolic bibenzyl backbone, suggesting that the relationship between structure and function highlighted in our study could be extended to other natural analogs ⁴³. Noteworthy, two of these bibenzyl compounds, batatacin III and gigantol, also share anti-calmodulin activity with radulanin A, which strengthens the hypothesis of common structurally-based functionalities ^{44,45}.

5 Conclusions

Radulanin A has been the first compound from liverworts reported for its herbicide activity ¹³. In this study, we further unraveled the MoA of this compound that makes it the only 2,5-dihydrobenzoxepin, and more generally bibenzyl, characterized so far as a potent Q_B site inhibitor. Because of the conservation of Q_B site structure and function among plants, radulanin A could be phytotoxic towards a large range of weeds. Its chemical structure and liverwort origin makes it also an original compound for the development of new herbicides. Although radulanin A appears as a rather

weak PSII inhibitor, its herbicidal efficiency can be greatly improved by the structure-based design of new analogs as performed with other natural herbicides ⁴⁶. Beside the herbicidal efficiency, the availability of large amounts of active principle is crucial for herbicide development. Even though we improved the simplicity and yield of production by recently establishing a new synthesis ¹², the total synthesis of radulanin A remains challenging and a bottleneck for future developments. In this respect, our study suggests that Radula chromene **3**, that is also a natural product ¹⁰ and a synthetic precursor of radulanin A, is a valuable alternative, as it presents similar I₅₀ and MoA and can be synthesized more easily than radulanin A ¹².

Acknowledgements

We acknowledge financial support from CNRS, Institut Polytechnique de Paris (IP Paris), Ecole Polytechnique and Sorbonne Université (SU). S.T. is the recipient of a fellowship from the SU PhD program "Interface pour le Vivant". B.L.W. was supported by a post-doc fellowship from CNRS and IP Paris.

Conflict of Interest Declaration

Authors declare no conflicts of interest.

References

- 1 Qu RY, He B, Yang JF, Lin HY, Yang WC, Wu QY, *et al.*, Where are the new herbicides?, *Pest Manag Sci* **77**:2620-2625 (2021).
- 2 Dayan FE, Current status and future prospects in herbicide discovery, *Plants* **8** (2019).
- 3 Sparks TC and Bryant RJ, Crop protection compounds – trends and perspective, *Pest Manag Sci* **77**:3608–3616 (2021).
- 4 Soltys D, Krasuska U, Bogatek R, Gniazdowska A, Soltys D, Krasuska U, *et al.*,

- Allelochemicals as bioherbicides — present and perspectives, *Herbic - Curr Res Case Stud Use*, IntechOpen (2013).
- 5 Wang Q-H, Zhang J, Liu Y, Jia Y, Jiao Y-N, Xu B, *et al.*, Diversity, phylogeny, and adaptation of bryophytes: insights from genomic and transcriptomic data, *J Exp Bot* **73**:4306–4322 (2022).
 - 6 Horn A, Pascal A, Lončarević I, Volpatto Marques R, Lu Y, Miguel S, *et al.*, Natural products from bryophytes: from basic biology to biotechnological applications, *Crit Rev Plant Sci* **40**:191–217 (2021).
 - 7 Sabovljević MS, Sabovljević AD, Ikram NKK, Peramuna A, Bae H, and Simonsen HT, Bryophytes – an emerging source for herbal remedies and chemical production, *Plant Genet Resour* **14**:314–327 (2016).
 - 8 Asakawa Y, Nagashima F, and Ludwiczuk A, Distribution of bibenzyls, prenyl bibenzyls, bis-bibenzyls, and terpenoids in the liverwort genus *Radula*, *J Nat Prod* **83**:756–769 (2020).
 - 9 Asakawa Y, Ludwiczuk A, Novakovic M, Bukvicki D, and Anchang KY, Bis-bibenzyls, bibenzyls, and terpenoids in 33 genera of the *Marchantiophyta* (liverworts): structures, synthesis, and bioactivity, *J Nat Prod* **85**:729–762 (2022).
 - 10 Asakawa Y, Hashimoto T, Takikawa K, Tori M, and Ogawa S, Prenyl bibenzyls from the liverworts *Radula perrottetii* and *Radula complanata*, *Phytochemistry* **30**:235–251 (1991).
 - 11 Harinantenaina L, Takahara Y, Nishizawa T, Kohchi C, Soma GI, and Asakawa Y, Chemical constituents of malagasy liverworts, part V: prenyl bibenzyls and clerodane diterpenoids with nitric oxide inhibitory activity from *Radula appressa* and *Thysananthus spathulistipus*, *Chem Pharm Bull* **54**:1046–1049 (2006).
 - 12 Lockett-Walters B, Thuillier S, Baudouin E, and Nay B, Total synthesis of phytotoxic Radulanin A facilitated by the photochemical ring expansion of a 2,2-dimethylchromene in flow, *Org Lett* **24**:4029–4033 (2022).
 - 13 Zhang W, Baudouin E, Cordier M, Frison G, and Nay B, One-pot synthesis of metastable 2,5-dihydrooxepines through retro-Claisen rearrangements: method and applications, *Chem – Eur J* **25**:8643–8648 (2019).
 - 14 Cantrel C, Vazquez T, Puyaubert J, Rezé N, Lesch M, Kaiser WM, *et al.*, Nitric oxide

- participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*, *New Phytol* **189**:415–427 (2011).
- 15 Maxwell K and Johnson GN, Chlorophyll fluorescence—a practical guide, *J Exp Bot* **51**:659–668 (2000).
 - 16 Berthold DA, Babcock GT, and Yocum CF, A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes, *FEBS Lett* **134**:231–234 (1981).
 - 17 Ducruet J-M and Vass I, Thermoluminescence: experimental, *Photosynth Res* **101**:195–204 (2009).
 - 18 Vass I and Demeter S, Classification of photosystem II inhibitors by thermodynamic characterization of the thermoluminescence of inhibitor-treated chloroplasts, *Biochim Biophys Acta* **682**:496–499 (1982).
 - 19 Ahmadova N, Ho FM, Styring S, and Mamedov F, Tyrosine D oxidation and redox equilibrium in photosystem II, *Biochim Biophys Acta* **1858**:407–417 (2017).
 - 20 Fufezan C, Rutherford AW, and Krieger-Liszskay A, Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II, *FEBS Lett* **532**:407–410 (2002).
 - 21 Dayan FE and Duke SO, Natural compounds as next-generation herbicides, *Plant Physiol* **166**:1090–1105 (2014).
 - 22 Guo Y, Liu W, Wang H, Wang X, Qiang S, Kalaji HM, *et al.*, Action mode of the mycotoxin patulin as a novel natural photosystem II inhibitor, *J Agric Food Chem* **69**:7313–7323 (2021).
 - 23 Czarnota MA, Paul RN, Dayan FE, Nimbal CI, and Weston LA, Mode of action, localization of production, chemical Nature, and activity of sorgoleone: a potent PSII inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates, *Weed Technol* **15**:813–825 (2001).
 - 24 Spyridaki A, Fritzsich G, Kouimtzoglou E, Baciou L, and Ghanotakis D, The natural product capsaicin inhibits photosynthetic electron transport at the reducing side of photosystem II and purple bacterial reaction center: structural details of capsaicin binding, *Biochim Biophys Acta* **1459**:69–76 (2000).
 - 25 Nain-Perez A, Barbosa LCA, Maltha CRA, Giberti S, and Forlani G, Tailoring natural abenquines to Inhibit the photosynthetic electron transport through interaction with the D1 protein in photosystem II, *J Agric Food Chem* **65**:11304–11311 (2017).

- 26 Chen S, Kim C, Lee JM, Lee H-A, Fei Z, Wang L, *et al.*, Blocking the QB-binding site of photosystem II by tenuazonic acid, a non-host-specific toxin of *Alternaria alternata*, activates singlet oxygen-mediated and EXECUTER-dependent signalling in *Arabidopsis*, *Plant Cell Environ* **38**:1069–1080 (2015).
- 27 Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), HRAC Mode of Action Classification 2022.
- 28 Preston C, Resistance to photosystem I disrupting herbicides, *in* Herbicide resistance in plants, ed. by Powles SB, CRC Press, Boca Raton, pp 61-82 (1994).
- 29 Takahashi R, Hasegawa K, Takano A, and Noguchi T, Structures and binding sites of phenolic herbicides in the QB pocket of photosystem II, *Biochemistry* **49**:5445–5454 (2010).
- 30 Cessna AJ and Grover R, Spectrophotometric determination of dissociation constants of selected acidic herbicides, *J Agric Food Chem USA* **26**:289-292 (1978).
- 31 Kramer DM, Sacksteder CA, and Cruz JA, How acidic is the lumen?, *Photosynth Res* **60**:151–163 (1999).
- 32 Oettmeier W, Godde D, Kunze B, and Höfle G, Stigmatellin. A dual type inhibitor of photosynthetic electron transport, *Biochim Biophys Acta* **807**:216–219 (1985).
- 33 Srivastava A, Jüttner F, and Strasser RJ, Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II, *Biochim Biophys Acta* **1364**:326–336 (1998).
- 34 Guo Y, Cheng J, Lu Y, Wang H, Gao Y, Shi J, *et al.*, Novel action targets of natural product gliotoxin in photosynthetic apparatus, *Front Plant Sci* **10** (2020).
- 35 Chen S, Xu X, Dai X, Yang C, and Qiang S, Identification of tenuazonic acid as a novel type of natural photosystem II inhibitor binding in QB-site of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim Biophys Acta* **1767**:306–318 (2007).
- 36 Lindstedt G, Misiorny A, Rubin I, Saluste E, Stjernholm R, and Ehrensvärd G, Constituents of pine heartwood. XXV. Investigation of forty-eight pinus species by paper partition chromatography., *Acta Chem Scand* **5**:121–128 (1951).
- 37 Fagboun D, Ogundana S, Adesanya SA, and Roberts M, Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea rotundata*, *Phytochemistry* **26**:3187–3189 (1987).
- 38 Fang JM, Su W-C, and Cheng YS, Flavonoids and stilbenes from armand pine, *Phytochemistry* **27**:1395–1397 (1988).

- 39 Kaganda NG and Adesanya SA, A new dihydrostilbene from diseased *Dioscorea mangenotiana*, *J Nat Prod* **53**:1345–1346 (1990).
- 40 Yamaki M, Kato T, Bai L, Inoue K, and Takagi S, Methylated stilbenoids from *Bletilla striata*, *Phytochemistry* **30**:2759–2760 (1991).
- 41 KostECKI K, Engelmeier D, Pacher T, Hofer O, Vajrodaya S, and Greger H, Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona cf. pierreii*, *Phytochemistry* **65**:99–106 (2004).
- 42 Boonphong S, Puangsombat P, Baramée A, Mahidol C, Ruchirawat S, and Kittakoop P, Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities, *J Nat Prod* **70**:795–801 (2007).
- 43 Hernández-Romero Y, Acevedo L, de Los Ángeles Sánchez M, Shier WT, Abbas HK, and Mata R, Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum*, *J Agric Food Chem* **53**:6276–6280 (2005).
- 44 Hernández-Romero Y, Rojas J-I, Castillo R, Rojas A, and Mata R, Spasmolytic effects, mode of action, and structure–activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*, *J Nat Prod* **67**:160–167 (2004).
- 45 Asakawa Y, Biologically active compounds from bryophytes, *Pure Appl Chem* **79**:557–580 (2007).
- 46 Wang H, Yao Q, Guo Y, Zhang Q, Wang Z, Strasser RJ, *et al.*, Structure-based ligand design and discovery of novel tenuazonic acid derivatives with high herbicidal activity, *J Adv Res* **40**:29–44 (2022).

	Φ_{PSII}			F_v/F_m		
	IC ₅₀ (μM)	95% CI	R ²	IC ₅₀ (μM)	95% CI	R ²
Radula chromene (3)	101	85-109	0.90	100	85-106	0.92
Radulanin A (4)	89	80-102	0.92	95	84-105	0.93

Table 1 : IC₅₀ of radulanin A and its chromene precursor regarding Φ_{PSII} and Fv/Fm parameters. IC₅₀ was calculated upon data shown Figure 2A and 2B. 95% confidence interval (95% CI) is presented. R² was determined by non-linear fit regression.

Figure legends

Figure 1: Effect of radulanin A and its structural analogs on Arabidopsis seedling viability.

Pictures were taken 1 week after treatment and are representative of 3 experiments. Control refers to 1% DMSO treatment. Dark squares indicate the minimal bioactive concentration for each molecule. Compounds are identified by their numbers in the text, together with current names for 2 (dihydropinosylvin), 3 (Radula chromene), 4 (radulanin A), 5 (tylimanthin B), 6 (O-methylated chromene) and 7 (chromane). The main compounds used in this study (**3**, **4** and **6**) are color-labeled and the color code is maintained across the different figures.

Figure 2: Effect of radulanin A and its analogs on PSII maximal efficiency (Fv/Fm) and PSII quantum yield activity (Φ_{PSII}).

Fv/Fm (**A**) and Φ_{PSII} (**B**) were measured on Arabidopsis seedlings after 12 h of treatment with different concentrations of radulanin A (orange circles) or Radula chromene **3** (green triangles). **C**, Φ_{PSII} was measured after 12 h of treatment with 400 μ M of radulanin A or with its analogs. **D**, Φ_{PSII} was measured after 12 h of treatment with 100 μ M of the molecules identified as bioactive in panel C. Control corresponds to treatment with 1% DMSO. Results are given as mean \pm S.E (n=3-6). Asterisks indicate statistical differences between control and treatments as determined by One-Way ANOVA followed by post-hoc Dunn's test (** P<0.01, **** P<10⁻⁴).

Figure 3: Evolution of PSII parameters after radulanin A treatment.

Chlorophyll fluorescence measurements were performed on Arabidopsis seedlings treated with 1% DMSO (control) or different concentrations of radulanin A. **A**. PSII maximal efficiency (F_v/F_m), **B**. PSII quantum yield activity (Φ_{PSII}), **C**. Non-photochemical quenching (NPQ), **D**. Measured relative fluorescence. Represented data are the means \pm SD of 6 independent biological replicates.

Figure 4: Effect of radulanin A on P700 redox activity.

Transient absorption changes were measured at 705 nm for Arabidopsis seedlings treated with 1% DMSO (control), 10 μ M DCMU or radulanin A and different structural analogs at 400 μ M. The seedlings were harvested after 15 min of treatment and measurements were performed after 2 min under actinic light (26

$\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). **A.** The $\Delta I/I$ was measured during actinic illumination (negative time values) and during and after a saturating light pulse given at time point zero. The decay was followed for 1565 ms in the dark after the pulse offset, before actinic light was switched on again. All the recorded traces were normalised on the difference between the $\Delta I/I$ recorded during actinic illumination and the one recorded at the end of the dark decay. **B.** Percentage of reduced P700 after 15 min of treatment. Represented data are the means \pm SD of 3 independent biological replicates. Asterisks indicate statistical differences between control and treatments as determined by One-Way ANOVA followed by post-hoc Dunn's test (***) $P < 0.001$, **** $P < 10^{-4}$).

Figure 5: Thermoluminescence of treated PSII-enriched membrane fragments. Control refers to 1% DMSO treatment. Except in panel D, measurements were performed immediately after treatment. **A.** Effect of radulanin A (400 μM), and Q_B site inhibitors (DCMU 10 μM , bromoxynil 100 μM). **B.** Effect of radulanin A, Radula chromene **3** and its *O*-methylated analog (400 μM) on thermoluminescence., **C.** Dose-response study over radulanin A treatment, **D.** Effect of radulanin A (400 μM) treatment duration.

Figure 6: Thermoluminescence of Arabidopsis treated seedlings. Control refers to 1% DMSO treatment. Measurements were performed 6 h after treatment. **A.** Effect of radulanin A (400 μM), and Q_B site inhibitors (DCMU 10 μM , bromoxynil 100 μM). **B.** Effect of radulanin A, Radula chromene **3** and its *O*-methylated analog (400 μM) on thermoluminescence.

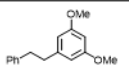





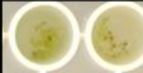
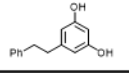




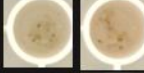

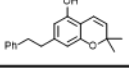





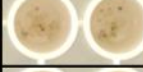
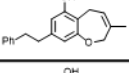
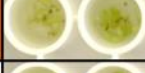
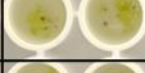
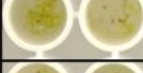


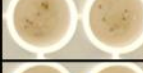
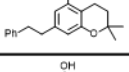

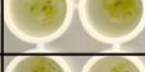


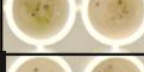
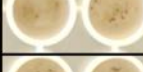
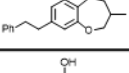
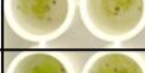

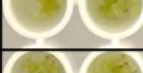


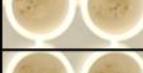
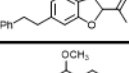

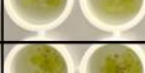
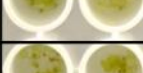

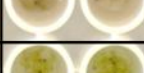
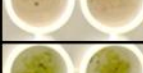
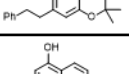


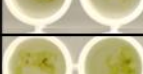

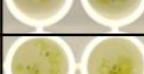

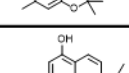

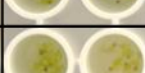




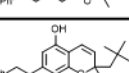



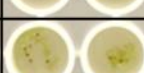

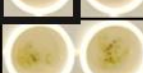
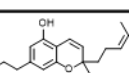













Compound	n°	Control	35 μ M	50 μ M	100 μ M	150 μ M	400 μ M
	1						
	2						
	3						
	4						
	7						
	8						
	5						
	6						
	9						
	10						
	11						
	12						

Figure 1

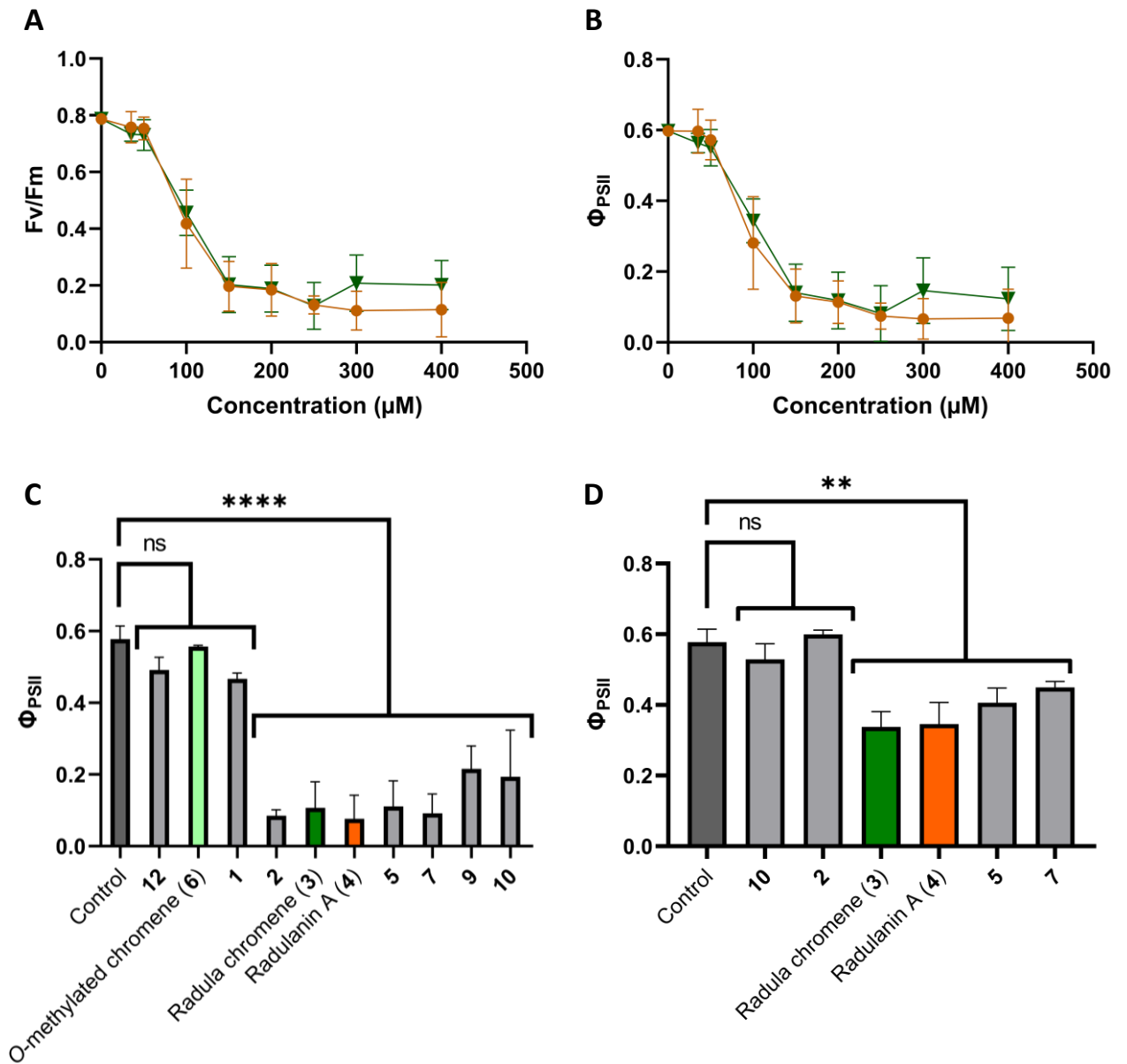


Figure 2

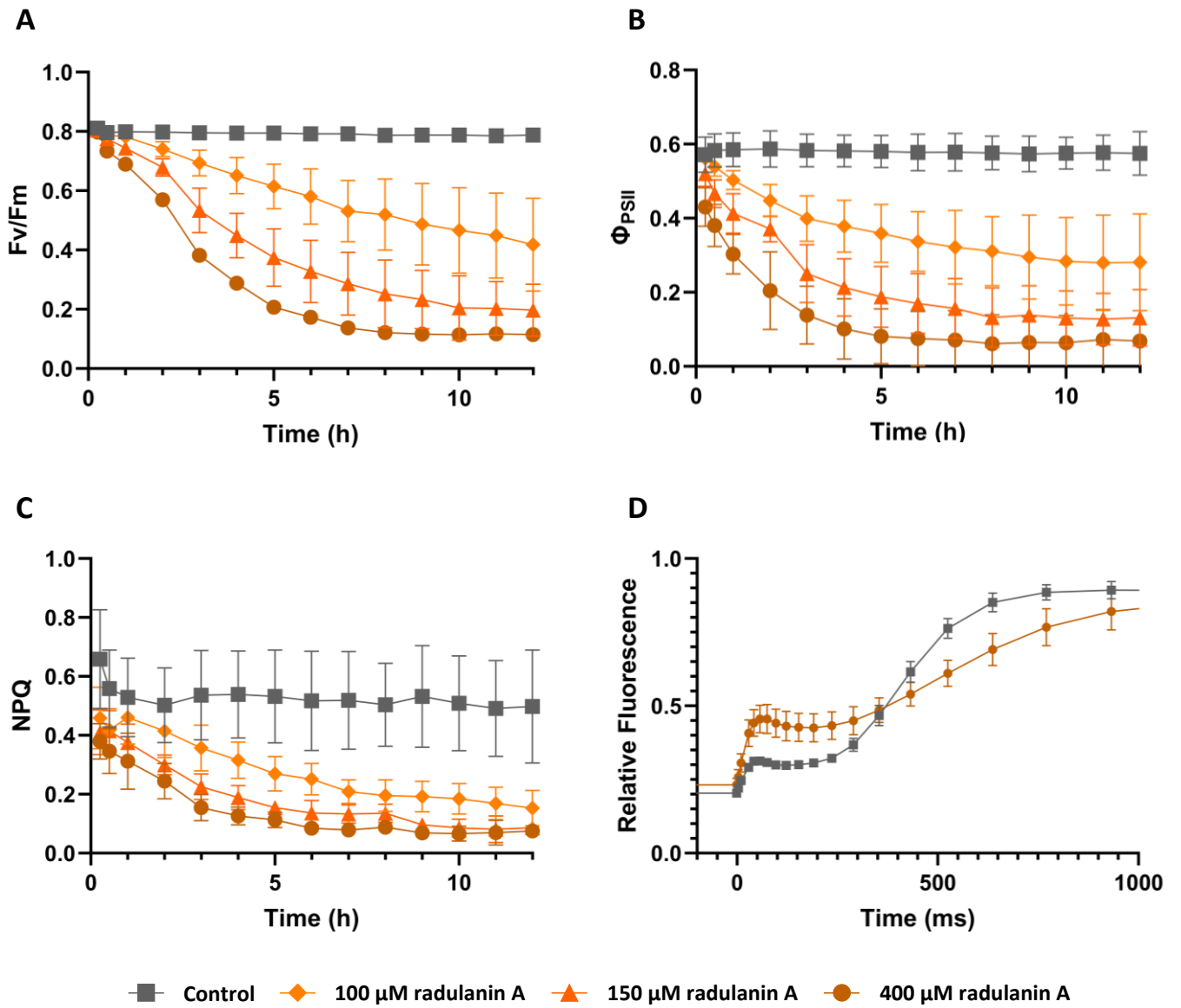
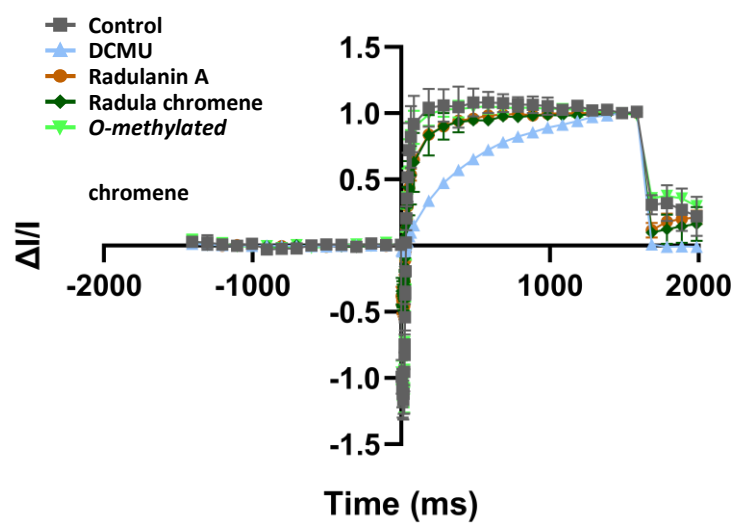


Figure 3

A



B

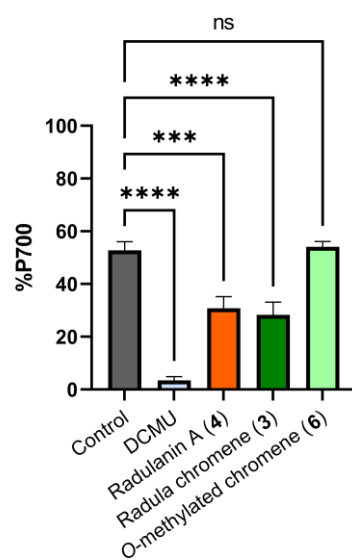


Figure 4

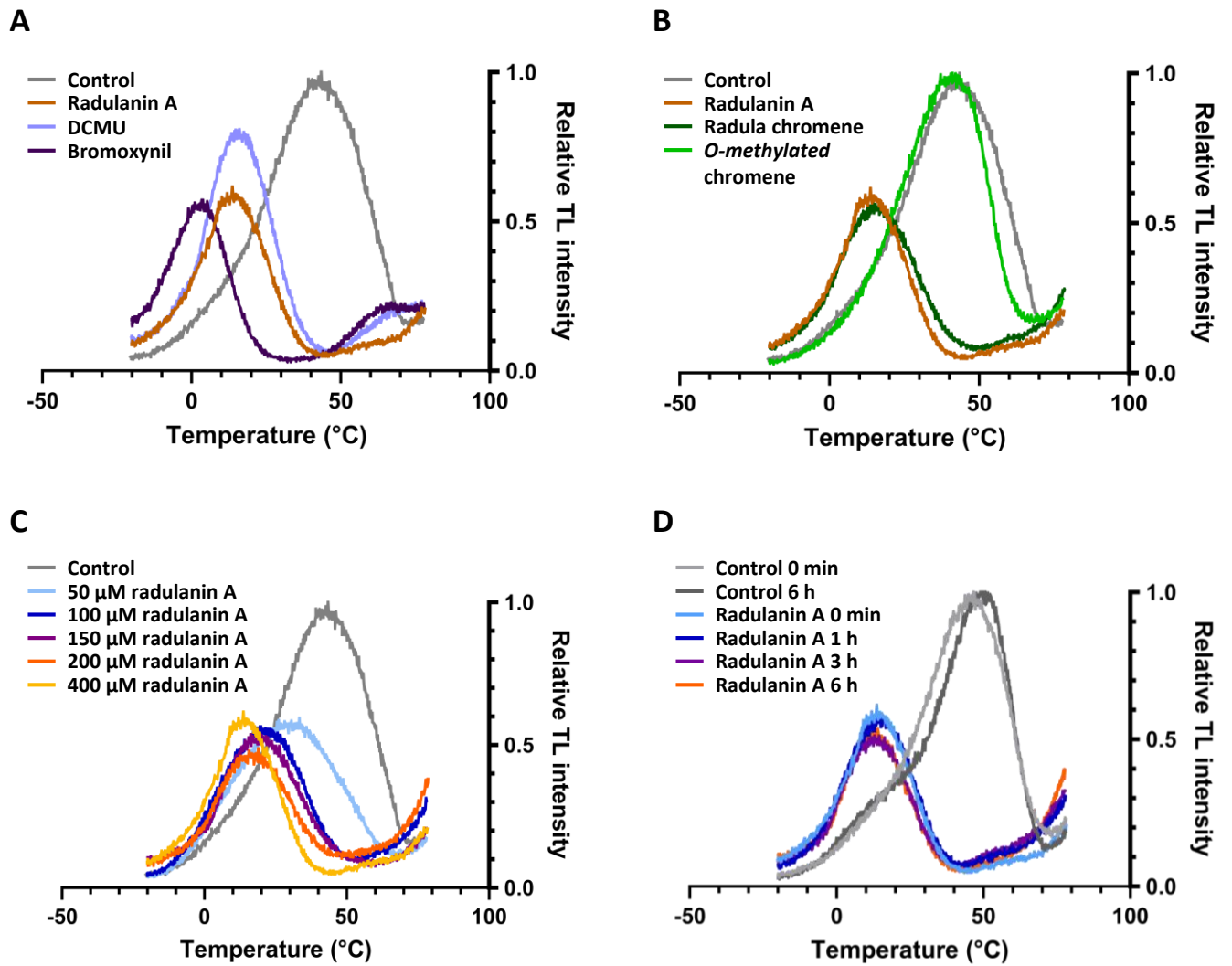


Figure 5

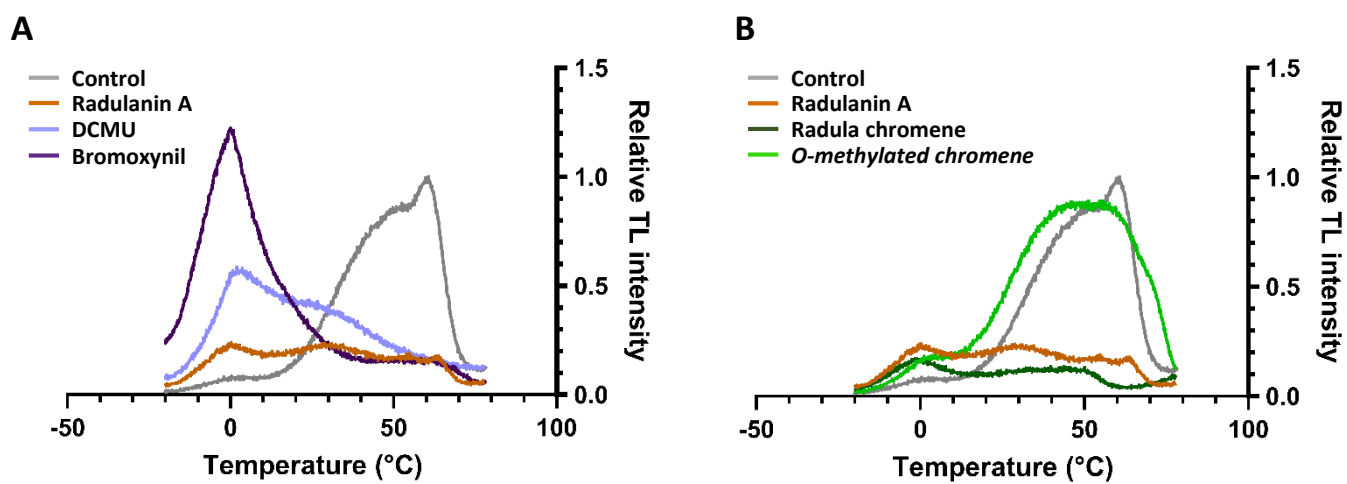


Figure 6

III Supplementary Figures

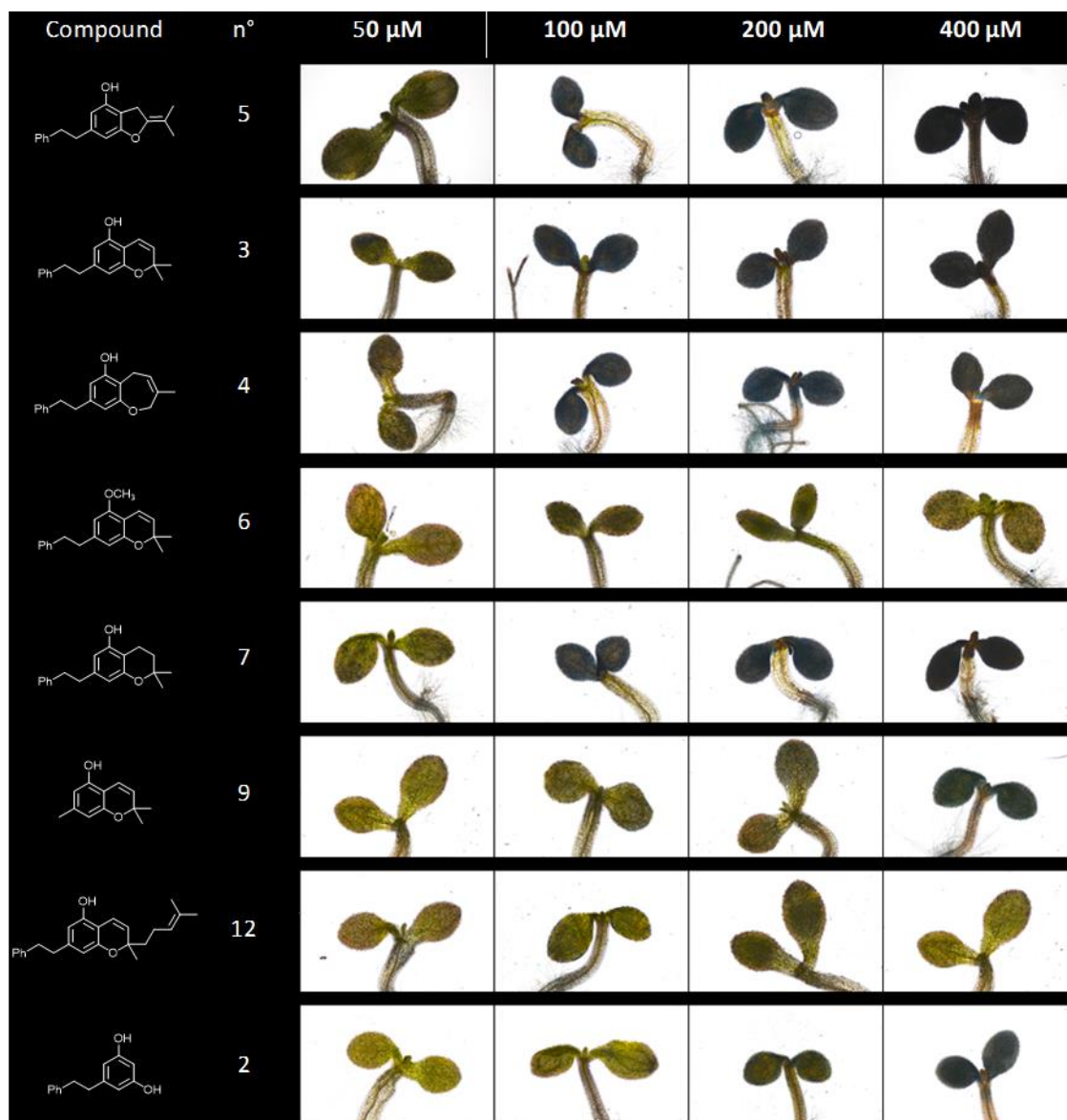


Figure S1: Effect of radulanin A and its structural analogs on cell death. Arabidopsis seedlings were stained with Trypan Blue after 72 h of treatment under constant light exposure (40 μ mol photon.m⁻².s⁻¹). Each picture is representative of 5-10 observed seedlings among 30 treated seedlings. Compounds tested are as in Figure 1.

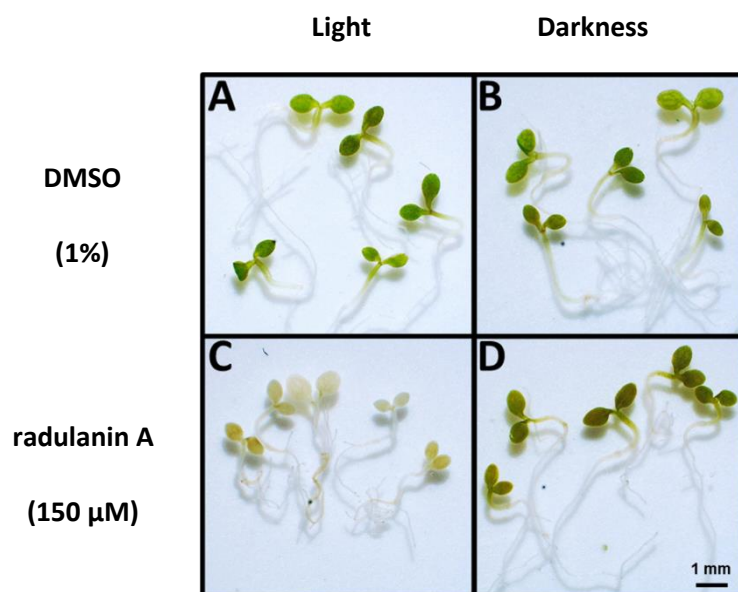


Figure S2: Effect of light exposure on radulanin A bioactivity. Seven-day-old seedlings were treated with 1% DMSO (**A, B**) or 150 μM radulanin A (**C, D**) and incubated in darkness (**B, D**) or under constant light ($40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; **A, C**). Pictures were taken after 84 h treatment and are representative of 3 independent experiments.

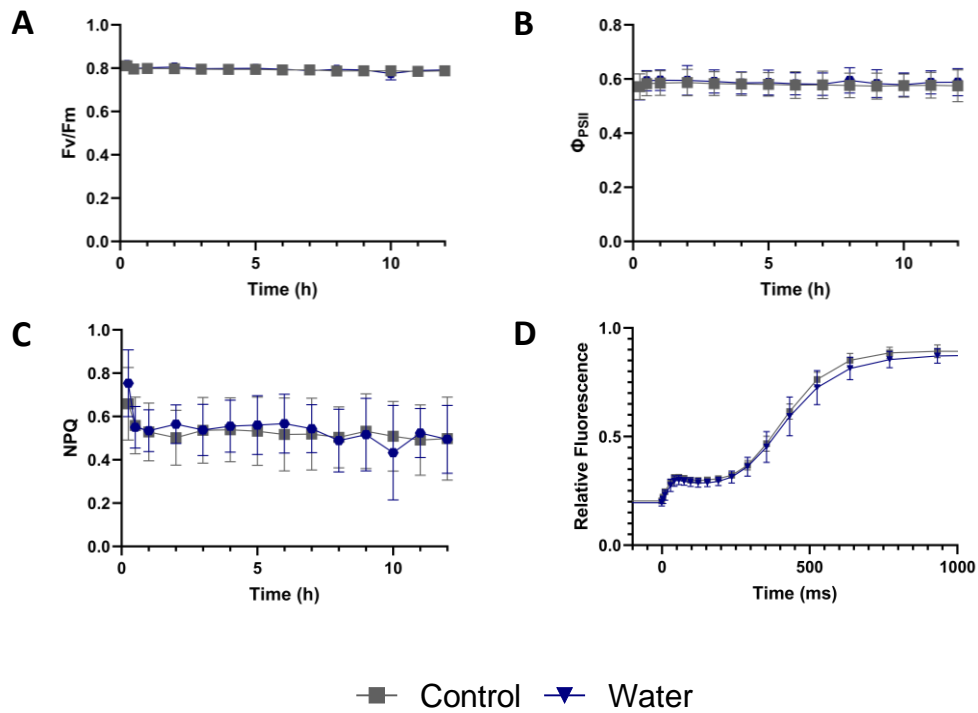


Figure S3: Evolution of PSII parameters under control conditions. Chlorophyll fluorescence measurements were performed on Arabidopsis seedlings treated with distilled water, pure or supplemented with 1% DMSO (control). **A.** PSII maximal efficiency (F_v/F_m), **B.** PSII quantum yield activity (Φ_{PSII}), **C.** Non-photochemical quenching (NPQ), **D.** Measured relative fluorescence. Represented data are the means \pm SD of 6 independent biological replicates.

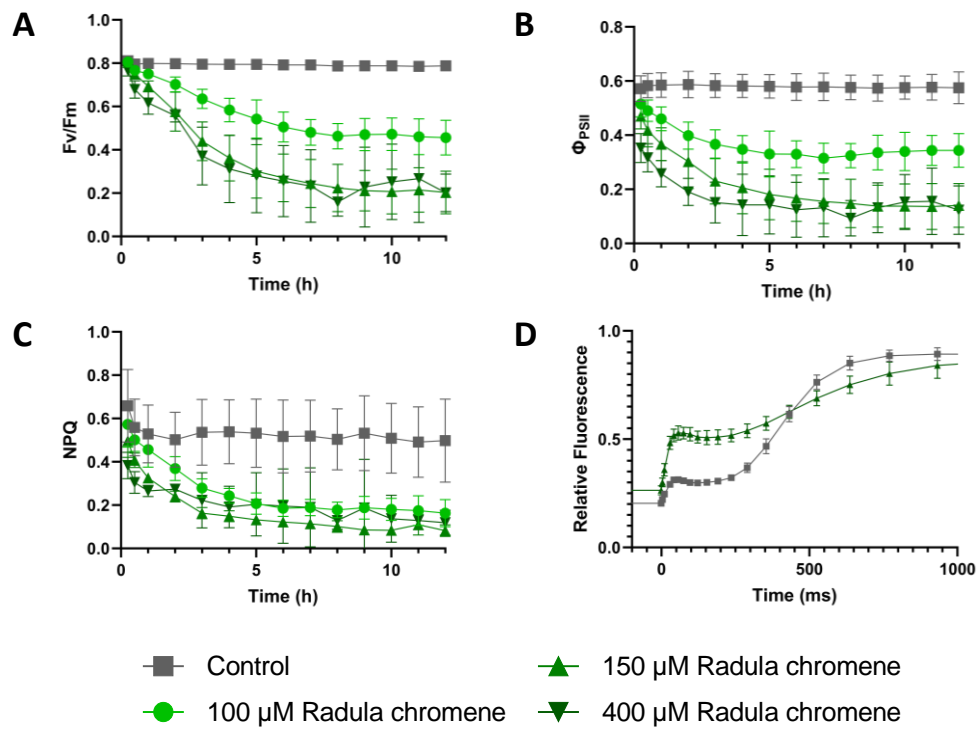


Figure S4: Evolution of PSII parameters after treatment with Radula chromene

3. Chlorophyll fluorescence measurements were performed on Arabidopsis seedlings treated with 1% DMSO (control) or different concentrations of Radula chromene 3. **A.** PSII maximal efficiency (F_v/F_m), **B.** PSII quantum yield activity (Φ_{PSII}), **C.** Non-photochemical quenching (NPQ), **D.** Measured relative fluorescence. Represented data are the means \pm SD of 6 independent biological replicates.

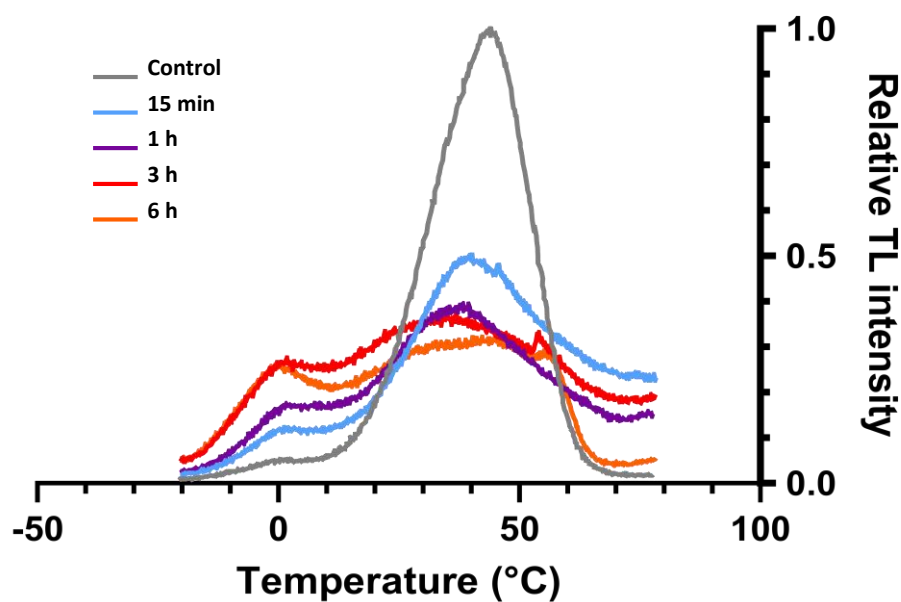


Figure S5: Thermoluminescence kinetics after radulanin A treatment. Control refers to 1% DMSO treatment. Concentration used for radulanin A treatment was 400 μ M. Thermoluminescence measurements were performed on Arabidopsis seedlings.

IV Supplementary Material

Experimental procedure for Trypan Blue Staining

After 3 days of treatment, cell death was evaluated by seedling staining with Trypan Blue (Sigma-Aldrich). Seedlings were incubated with 200 μL of staining solution (2.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Trypan Blue in distilled water) for 30 min at room temperature. Stained samples were washed with distilled water and analyzed with a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Gryphax Kapella camera. For each condition, 5 seedlings from two treatment replicates were observed.

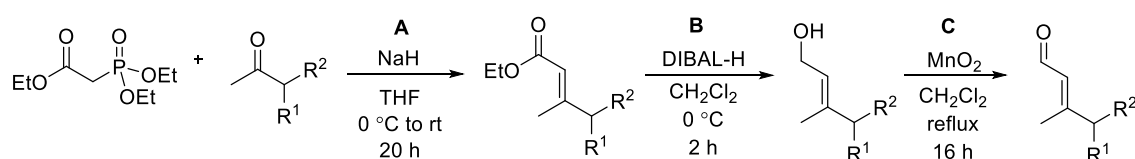
Experimental procedures for the synthesis of compounds

General remarks

Toluene, methanol and dichloromethane were distilled over CaH_2 prior to use. THF was purified on a MB-SPS 800 solvent purification system (MBraun). Thin layer analytical chromatography (TLC) was performed on silica gel plates on aluminum (silica gel 60, F254, Merck) and visualized by exposure to ultraviolet light and / or exposure to a basic solution of potassium permanganate or a *p*-anisaldehyde staining solution followed by heating. Flash column chromatography was performed on silica 60 (40-63 μm). Nuclear magnetic resonance spectra (^1H NMR and ^{13}C NMR) were recorded at 25°C with a Bruker DPX spectrometer (400 MHz, ^1H to 400 MHz, ^{13}C NMR to 100 MHz) using CDCl_3 as the referenced solvent with respect to the residual CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77.1$ ppm). Chemical shifts (δ) are given in ppm and coupling constants (J) in Hertz. Data for ^1H NMR spectra are reported as follows: δ ppm (br s = wide singlet, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, dd = doublet of doublets, td = triplet of doublets, ddd = doublet of doublets, m = multiplet, coupling constants, integration). The infrared spectra were recorded on a PerkinElmer FTIR spectrometer using the ATR technique. Absorption maxima (ν_{max}) are reported in wavenumbers (cm^{-1}). High-resolution mass spectrometry (HRMS) experiments were performed on a Tims-TOF mass spectrometer (Bruker, France).

Compounds **1-5** were prepared on the occasion of previous studies.¹ Other compounds were prepared as follow:

General procedures for the synthesis of substituted aldehyde



Procedure A

To a flame-dried round-bottomed flask equipped with a magnetic bar under an argon atmosphere, NaH (dispersion in mineral oil at 60%, 1.4 equiv) and anhydrous THF (final concentration: 0.26 M) were added. The suspension obtained was cooled to 0 °C, and triethyl phosphonoacetate (1.5 equiv) was added dropwise during 30 minutes, followed by the substituted ketone (1 equiv). The mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred overnight, then the reaction was stopped with a saturated aqueous solution of NH_4Cl . The aqueous phase was extracted three times with Et_2O and the combined organic phases are dried on MgSO_4 , evaporated under vacuum and purified by column chromatography, eluting with CH_2Cl_2 .

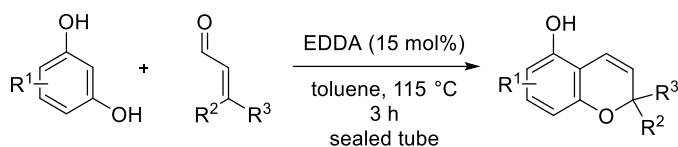
Procedure B

To a flame-dried round-bottomed flask equipped with a magnetic bar under an argon atmosphere, the ester previously obtained (1 equiv) was added followed by dry CH_2Cl_2 (final concentration: 1.12 M). The solution was cooled to 0 °C, then DIBALH (1M in CH_2Cl_2 , 2.1 equiv) was added through a syringe and the mixture was stirred for 2 h. The reaction was stopped by adding MeOH (2.5 equiv) at 0 °C and allowed to rise to room temperature. A saturated NaCl solution was then added, followed by Et_2O , and the mixture is filtered over celite. The phases are separated, and the organic phases dried on MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified by flash column chromatography eluted with a mixture $\text{Et}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$.

Procedure C

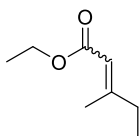
To a flame-dried round-bottomed flask equipped with a magnetic rod under under argon atmosphere, MnO_2 (5 equiv) and anhydrous CH_2Cl_2 (0.49 M) were added, followed by the allyl alcohol previously obtained (1 equiv). A condenser was connected and the mixture was heated to reflux overnight. The mixture was then allowed to cool to room temperature and filtered over a pad of celite. The solvent was removed under vacuum and the crude mixture purified by flash column chromatography, eluting with a CH_2Cl_2 :pentane mixture.

General procedure D for the synthesis of chromenes



In a flame-dried tube equipped with a magnetic bar under an argon atmosphere was introduced the substituted resorcinol (1 equiv) followed by anhydrous toluene (0.1 M) and the α,β -unsaturated (1.5 equiv). Ethylenediammonium diacetate (EDDA, 5 mol%) was then added. The tube was sealed and heated to 115 °C for 1 h. This procedure (addition of EDDA and heating) was repeated 3 times (total addition of 15 mol% EDDA). Then after returning to room temperature, a small amount of silica was added and the solvent removed under vacuum. The crude mixture was purified by flash silica column chromatography (dry loading), with hexane/ EtOAc elution to give the corresponding substituted chromene.

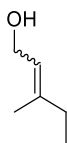
3-Methylpent-2-enoate ethyl ester



Prepared according to procedure A using butanone (1.25 mL, 13.9 mmol) to give the ester as a viscous yellow liquid (E/Z = 78:22, 1.94 g, 13.6 mmol, yield 98%). Spectral data are consistent with the literature.²

Major E-Isomer: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.67 – 5.65 (m, 1H), 4.15 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.21 – 2.12 (m, 5H, H-4), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.07 (t, J = 7.5 Hz, 3H).

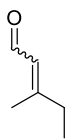
3-Methylpent-2-en-1-ol



Prepared according to procedure B using the previous ester (3,88 g, 27.3 mmol). A purification by flash chromatography on silica (5% Et₂O in CH₂Cl₂) gave the allyl alcohol as a colorless liquid (*E/Z* = 78:22, 1.39 g, 13.9 mmol, yield 51%). Spectral data were consistent with the literature.³

Major *E*-Isomer: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.44 – 5.35 (m, 1H), 4.20 – 4.10 (m, 2H), 2.14 – 2.00 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 3H), 1.05 – 0.98 (m, 3H).

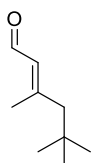
3-Methylpent-2-enal



Prepared according to procedure C using the previous allyl alcohol (930 mg, 9.29 mmol). Purification by flash chromatography on silica (1:1 CH₂Cl₂:pentane) gave the aldehyde as a colorless liquid (*E/Z* = 78:22, 400 mg, 13.9 mmol, yield 44%). Spectral data were consistent with the literature.⁴

Major *E*-Isomer: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.97 (d, *J* = 8.2, 1H, H-1), 5.86 – 5.81 (m, 1H, H-2), 2.60 (q, *J* = 7.5, 2H, H-3), 1.98 (d, *J* = 1.3, 3H, H-4), 1.17 (t, *J* = 7.6, 3H, H-5).

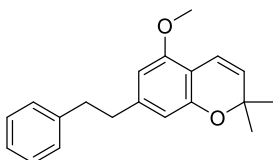
(*E*)-3,5,5-Trimethylhex-2-enal



Prepared according to procedures A-C from 4,4-dimethylpentan-2-one (2 g, 17.5 mmol), giving aldehyde as a yellow liquid (300 mg, 2.14 mmol, 12% over 3 steps). The spectral data are consistent with the literature.⁵

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.00 (d, *J* = 8.1, 1H), 5.85 – 5.80 (m, 1H), 2.24 – 2.21 (m, 3H), 2.15 – 2.11 (m, 2H), 0.97 (s, 9H).

5-Methoxy-2,2-dimethyl-7-phenethyl-2*H*-chromene (6)

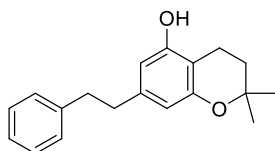


To a 20 mL flame-dried tube equipped with a magnetic rod was added chromene **11** (106 mg, 0.378 mmol), commercial anhydrous acetone (3.57 mL), K₂CO₃ (105 mg, 0.756 mmol) and MeI (33.0 μL, 0.529 mmol). The tube was sealed and heated to 60 °C for 16 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature, then MeI (24.0 μL, 0.378 mmol) and K₂CO₃ (53.0 mg, 0.378 mmol) were added again and the mixture was heated to 60 °C for 3 h and then cooled to room temperature. The solvent

was removed under vacuum and water (10 mL) was added. The product was extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The organic phase was washed in brine (1 x 5 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to give **6** as a brown oil (107 mg, 0.363 mmol, 96%). Spectral data were consistent with the literature.⁸

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.33 – 7.24 (m, 2H), 7.22 – 7.13 (m, 3H), 6.63 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 6.35 – 6.31 (s, 1H), 6.20 – 6.16 (s, 1H), 5.52 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.97 – 2.73 (m, 4H), 1.42 (s, 6H).

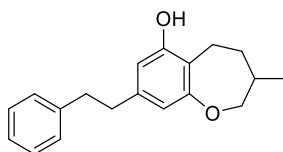
5-Hydroxy-2,2-dimethyl-7-phenethylchromane (**7**)



Radula chromene **3** (100 mg, 0.35 mmol) was dissolved in ethyl acetate (3.5 mL). Ammonium formate (111 mg, 1.77 mmol, 5 equiv) and Pd/C (10 mg, 10% w/w) were added. The reaction was stirred vigorously during 24 hours until completion. The reaction was filtered over celite, washing with CH₂Cl₂, and evaporated to furnish chromane **7** in 97% yield (98 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.32 – 7.24 (m, 2H), 7.22 – 7.14 (m, 3H), 6.33 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.61 (s, 1H), 2.92 – 2.70 (m, 4H), 2.63 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.81 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.33 (s, 6H).

(±)-3-Methyl-8-phenethyl-2,3,4,5-tétrahydrobenzo[b]oxepin-6-ol (**8**)



To a 10 mL flask equipped with a magnetic rod was added radulanin A (**4**, 69 mg, 0.246 mmol) and 10% w/w of Pd/C (2.6 mg, 0.0246 mmol). The balloon was then purged under vacuum and filled again with hydrogen, disconnected and equipped with a rubber septum and a hydrogen-filled balloon. Anhydrous methanol was then added (2.5 mL, 0.1 M) and the reaction mixture was left to stir overnight at room temperature. The mixture was then filtered on celite, the filtrate was evaporated under vacuum and purified by column chromatography to give **8** in the form of a yellow oil (20 mg, 0.708 mmol, 29%).

R_f = 0.29 (hexane/EtOAc 9:1)

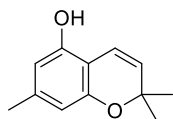
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 – 7.25 (m, 2H), 7.23 – 7.16 (m, 3H), 6.50 – 6.47 (m, 1H), 6.35 – 6.32 (m, 1H), 4.81 (br s, 1H), 4.19 (ddd, *J* = 12.0, 3.8, 1.2 Hz, 1H), 3.40 (dd, *J* = 12.0, 9.3 Hz, 1H), 3.04 (ddd, *J* = 14.8, 7.6, 1.5 Hz, 1H), 2.93 – 2.83 (m, 2H), 2.83 – 2.74 (m, 2H), 2.57 (ddd, *J* = 14.8, 11.5, 1.5 Hz, 1H), 2.21 – 2.06 (m, 1H), 2.01 – 1.92 (m, 1H), 1.34 – 1.15 (m, 1H), 0.92 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 161.8, 153.3, 141.8, 140.9, 128.4 (2), 125.9, 119.3, 113.5, 110.6, 78.6, 37.5, 37.4, 36.5, 33.5, 22.2, 17.4.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3365, 2973, 1620, 1583, 1496, 1454, 1427, 1304, 1227, 1182, 1046.

HRMS (ESI+): Calc. for C₁₉H₂₃O₂⁺ [MH⁺]: 283.1693; found: 283.1692.

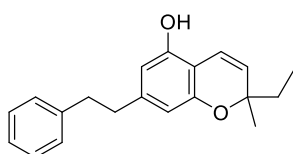
2,2,7-Trimethyl-2H-chromen-5-ol (9)



Synthesized according to general procedure D using orcinol (5.00 g, 40.3 mmol) to give **9** as a light yellow solid (4.29 g, 22.6 mmol, 56%). Spectral data were consistent with the literature.⁶

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.57 (d, J = 10.0, 1H), 6.26 – 6.24 (m, 1H), 6.14 – 6.11 (m, 1H), 5.53 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.60 (br s, 1H), 2.22 – 2.20 (m, 3H), 1.41 (s, 6H).

(±)-2-Ethyl-2-methyl-7-phenethyl-2H-chromen-5-ol (10)



Synthesized according to general procedure D from dihydropinosylvin **2** (50 mg, 0.233 mmol), giving chromene **10** as a yellow viscous liquid (27 mg, 0.0017 mmol, 39%).

R_f = 0.28 (hexane/EtOAc 95:5).

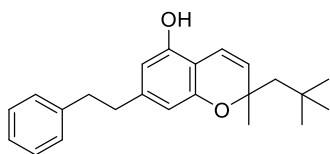
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.30 – 7.24 (m, 2H), 7.22 – 7.14 (m, 3H), 6.26 (d, J = 10.1, 1H), 6.30 – 6.27 (m, 1H), 6.11 – 6.08 (m, 1H), 5.49 (d, J = 10.1, 1H), 4.85 – 4.68 (br s, 1H), 2.90 – 2.81 (m, 2H), 2.80 – 2.71 (m, 2H), 1.79 – 1.62 (m, 2H), 1.36 (s, 3H), 0.95 (t, J = 7.5, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 154.2, 151.1, 143.5, 141.7, 128.4, 128.3, 127.4, 125.9, 116.9, 109.1, 107.7, 107.3, 78.6, 37.9, 37.4, 33.7, 25.8, 8.2.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3404, 2972, 2929, 2869, 1623, 1576, 1496, 1434, 1136, 1062, 829.

HRMS (ESI+): Calc. for C₂₀H₂₃O₂⁺ [MH⁺]: 295.1693; Found: 295.1686.

(±)-2-Methyl-2-neopentyl-7-phenethyl-2H-chromen-5-ol (11)



Synthesized according to general procedure D from dihydropinosylvin **2** (285 mg, 1.33 mmol), giving chromene **11** as a brown viscous liquid (84 mg, 0.25 mmol, 19%).

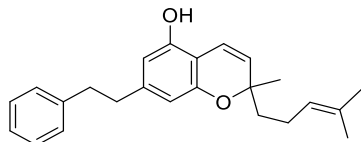
R_f = 0.29 (hexane/EtOAc 9:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 – 7.24 (m, 2H), 7.22 – 7.15 (m, 2H), 6.52 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.24 – 6.21 (m, 1H), 6.11 – 6.09 (m, 1H), 5.57 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.59 (br s, 1H), 2.91 – 2.83 (m, 2H), 2.78 – 2.71 (m, 2H), 1.77 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 1.62 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 1.39 – 1.37 (m, 3H), 1.02 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 153.7, 151.0, 143.3, 141.8, 128.9, 128.4, 128.3, 125.9, 115.0, 109.1, 107.5, 106.7, 79.3, 53.1, 37.9, 37.4, 31.5, 31.4, 29.2.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3399, 3026, 2945, 1622, 1574, 1431, 1364, 1245, 1148, 1073, 1052.

(±)-2-Methyl-2-(4-methylpent-3-en-1-yl)-7-phenethyl-2H-chromen-5-ol (12)



Synthesized according to the general procedure D from dihydropinosylvin **2** (300 mg, 1.40 mmol) and citral (358 μL , 2.10 mmol), to give **12** as a brown oil (312 mg, 0.896 mmol, 64%) after chromatography on silica, elution with light petroleum/EtOAc 96:4. Spectral data are consistent with the literature.⁷

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.32 – 7.26 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 3H), 6.62 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.31 – 6.28 (m, 1H), 6.12 – 6.10 (m, 1H), 5.51 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.14 – 5.05 (m, 1H), 4.50 (br s, 1H), 2.93 – 2.70 (m, 4H), 2.19 – 2.06 (m, 2H), 1.78 – 1.68 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.38 (s, 3H).

References

- 1 Lockett-Walters B, Thuillier S, Baudouin E, and Nay B, Total Synthesis of Phytotoxic Radulanin A Facilitated by the Photochemical Ring Expansion of a 2,2-Dimethylchromene in Flow, *Org Lett* **24**:4029–4033, American Chemical Society (2022).
- 2 Fang L, Xue H, and Yang J, Synthesis of the C1-C12 fragment of iriomoteolide 1a by sequential catalytic asymmetric vinylogous aldol reactions, *Org Lett* **10**:4645–4648 (2008).
- 3 Cisar J, Kuduk S, Zhang Z, Wang A, and Simonnet Y, JANSSEN BIOTECH, INC., Patent WO2020/161663 A1 (2020).
- 4 Behr A, Reyer S, and Tenhumberg N, Selective hydroformylation-hydrogenation tandem reaction of isoprene to 3-methylpentanal, *Dalton Trans* **40**:11742–11747, The Royal Society of Chemistry (2011).
- 5 Katritzky AR, Shcherbakova IV, Tack RD, and Steel PJ, Reactions of unactivated olefins with Vilsmeier reagents, *Can J Chem* **70**:2040–2045, NRC Research Press (1992).
- 6 Lee YR, Choi JH, and Yoon SH, Efficient and general method for the synthesis of benzopyrans by ethylenediamine diacetate-catalyzed reactions of resorcinols with α,β -unsaturated aldehydes. One step synthesis of biologically active (±)-confluentin and (±)-daurichromenic acid, *Tetrahedron Lett* **46**:7539–7543 (2005).
- 7 Crombie LW, Crombie WML, and Firth DF, Synthesis of bibenzyl cannabinoids, hybrids of two biogenetic series found in *Cannabis sativa*, *J Chem Soc, Perkin Trans 1*:1263–1270, The Royal Society of Chemistry (1988).
- 8 Asakawa Y, Kondo K, Takikawa NK, Tori M, Hashimoto T, and Ogawa S, Prenyl bibenzyls from the liverwort *Radula kojana*, *Phytochemistry* **30**:219–234 (1991).

Chapitre III : Etude de l'impact du Radula chromène sur le métabolome d'Arabidopsis

I Introduction

Comme décrit dans le chapitre II, nous avons pu identifier un premier mode d'action de la radulanine A, expliquant, au moins en partie, son activité phytotoxique. Celui-ci repose sur la capacité de la radulanine A, mais également de certains de ses analogues structuraux, à inhiber l'activité photosynthétique, en interférant avec le site Q_B du photosystème II (PSII) et en bloquant ainsi la fonctionnalité de la chaîne de transfert des électrons chloroplastiques. Il nous est cependant apparu important de compléter cette étude ciblée sur la photosynthèse par une analyse plus globale et sans a priori. Cette nouvelle approche avait pour objectif principal de mettre en lumière les modifications métaboliques induites par l'application de radulanine A ou de ses analogues bioactifs et d'identifier les voies métaboliques affectées par ces composés. Au-delà de l'étude des conséquences directes ou indirectes de l'inhibition de la photosynthèse, l'analyse mise en œuvre avait également pour ambition d'identifier de possibles cibles additionnelles de la radulanine A et de ses analogues dont l'inhibition ou l'activation pouvait participer à la phytotoxicité de cette classe de molécules. En effet, les molécules d'origine naturelle possèdent fréquemment plusieurs sites d'action, dont l'effet additionné conduit aux propriétés phytotoxiques observés (Gressel, 2020). Cette multiplicité de sites d'action a en particulier été rapportée pour la sorgoléone, une molécule présente dans les exsudats racinaire de *Sorghum sp.*, qui, comme la radulanine A, est un inhibiteur du PSII d'origine naturelle, mais inhibe également la *p*-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD), impliquée dans la synthèse des quinones et des α -tocophérols, et la pompe à proton de la membrane plasmique (Einhellig et al., 1993; Gonzalez et al., 1997; Hejl and Koster, 2004b; Meazza et al., 2002).

Parmi les différentes approches possibles, nous avons fait le choix d'une analyse de type métabolomique. Les modifications du métabolome apportent en effet l'image la plus directe des effets induits par le traitement appliqué sur le métabolisme cellulaire et leurs conséquences sur le phénotype observé (Wishart, 2019). Pour cette raison, c'est une approche qui a été employée dans de nombreuses études visant à identifier les modes d'action de molécules bioactives, et en particulier de composés à activité herbicide. Des études récentes ont ainsi identifié avec succès les voies métaboliques affectées par l'acide rosmarinique (Araniti et al., 2018), le thymol (Araniti et al., 2020), le farnésène et le citral (López-González et al., 2023). De plus, il est possible sur la base de ces analyses, d'établir

des signatures métaboliques, c'est-à-dire un ensemble de métabolites dont l'abondance varie en réponse à l'application de l'herbicide, dépendant de la nature et du mode d'action de la molécule phytotoxique. Ces signatures sont utilisables comme marqueurs de l'effet herbicide lors d'études ultérieures d'activité structure/fonction ou lors du développement de formulations commerciales (Aliferis and Jabaji, 2011; Dayan and Duke, 2020; Grossmann et al., 2012; Trenkamp et al., 2009).

Lors de la mise en œuvre de cette analyse, nous avons choisi d'étudier l'impact du Radula chromène, plutôt que celui de la radulanine A, sur le métabolome des plantules d'Arabidopsis. Comme présenté dans le chapitre I, la synthèse du Radula chromène est plus simple et plus courte que celle de la radulanine A, et en particulier ne fait pas appel à l'étape d'extension du cycle qui est limitante pour la montée en échelle de la production de radulanine A. De ce fait, nous pouvions disposer de quantités plus importantes et non limitantes de Radula chromène, dans l'optique de la mise au point des traitements et de l'obtention des échantillons à analyser. De plus, les données présentées dans le chapitre II indiquaient que Radula chromène et radulanine A possédaient une efficacité herbicide et des modes d'action comparables, en tant qu'inhibiteurs du PSII. En revanche, la méthodologie de culture et de traitement des plantules en microplaques employée dans cette étude, pertinente pour cribler la bioactivité des différents analogues synthétisés, était incompatible avec la quantité importante de matériel biologique requise pour les analyses métabolomiques. Dans la suite de ce chapitre, je présenterai brièvement l'établissement et la validation de la méthodologie de culture et traitement des plantules par le Radula chromène, avant de détailler les résultats issus de l'analyse métabolomique.

II Etablissement et validation des conditions de culture et de traitement des plantules

Comme mentionné précédemment, l'obtention des échantillons traités par le Radula chromène destinés à l'analyse métabolomique a nécessité une adaptation des conditions de culture et de traitement des plantules pour générer des quantités de biomasse supérieures, de l'ordre de plusieurs centaines de mg. Sur la base des cultures réalisées en microplaques, par semis direct en milieu liquide, des essais de changement d'échelle ont été réalisés, qui n'ont pas permis une croissance des plantules suffisante. En effet, après germination, le développement des plantules ne dépassait pas le stade cotylédons. J'ai donc initié des cultures sur milieu nutritif gélosé, qui ont permis d'obtenir un développement plus rapide et important des plantules et une biomasse suffisante pour les expériences envisagées.

Sur la base de ce mode de culture, l'application du Radula chromène la plus simple était la pulvérisation. Malheureusement, les différentes tentatives (doses variables, addition de surfactant) pour reproduire l'effet phytotoxique du Radula chromène par ce mode d'application se sont avérés infructueux. J'ai donc adapté la méthode de culture des plantules pour permettre leur transfert ultérieur en milieu liquide lors de l'application du traitement. Pour ce faire, les graines sont mises à germer sur des grilles métalliques stériles qui peuvent être manipulées facilement lors du traitement, au contact du milieu nutritif. Comme observé lors de traitements de plantules en microplaques, l'immersion des plantules dans une solution de Radula chromène (400 μ M) conduit à une chlorose, partielle après 48 h et totale après 72 h. La cinétique d'apparition des effets phytotoxiques du Radula chromène dans ces conditions était équivalente à celle observée précédemment en microplaques (Zhang et al., 2019). Un effet similaire est également observé pour la radulanine A, utilisée à la même concentration et avec une cinétique comparable (Figure 39).

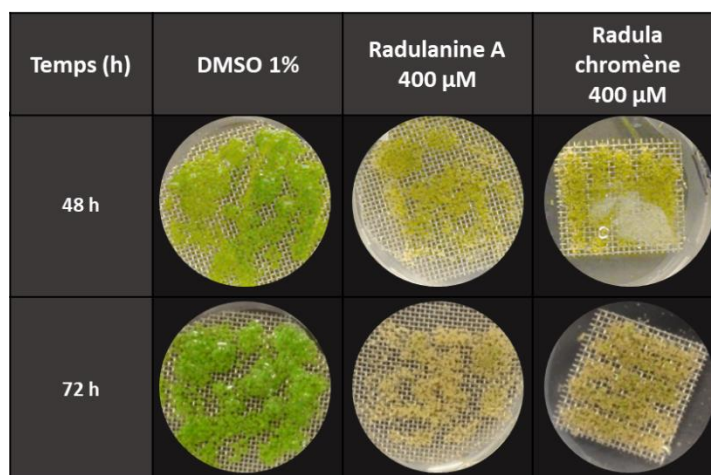


Figure 38 : Validation de l'effet phytotoxique du Radula chromène et de la radulanine A.

Le phénotype des plantules est observé après 48h et 72 de traitement par le Radula chromène (400 μ M) et la radulanine A (400 μ M), par référence à un traitement contrôle (1% DMSO).

Sur la base de ces observations, nous avons donc retenu ce mode opératoire pour générer l'ensemble des échantillons biologiques destinés à l'étude métabolomique. Les différentes conditions analysées sont présentées sur la Figure 40. Deux conditions de traitement ont été retenues : un traitement par 400 μ M de Radula chromène, qui correspond à la dose utilisée en routine dans le cadre de la thèse, et un traitement par 100 μ M de Radula chromène, qui correspond à la plus faible dose bioactive, aussi bien en termes de mortalité des plantules que d'inhibition de la photosynthèse (voir chapitre II). Pour chacun de ces

traitements, trois temps de cinétique ont été analysés. Des échantillons ont ainsi été prélevés après 12 h et 24 h, temps auxquels l'effet phytotoxique n'est pas observé, et 48 h, temps auxquels la chlorose est apparue. A titre de contrôle, les plantules ont été traitées par une solution de DMSO (1%) qui correspond au solvant de préparation des solutions-mère de Radula chromène. Pour l'ensemble de ces conditions, trois séries de traitements (réplicats), indépendantes (culture et traitement), ont été réalisées.

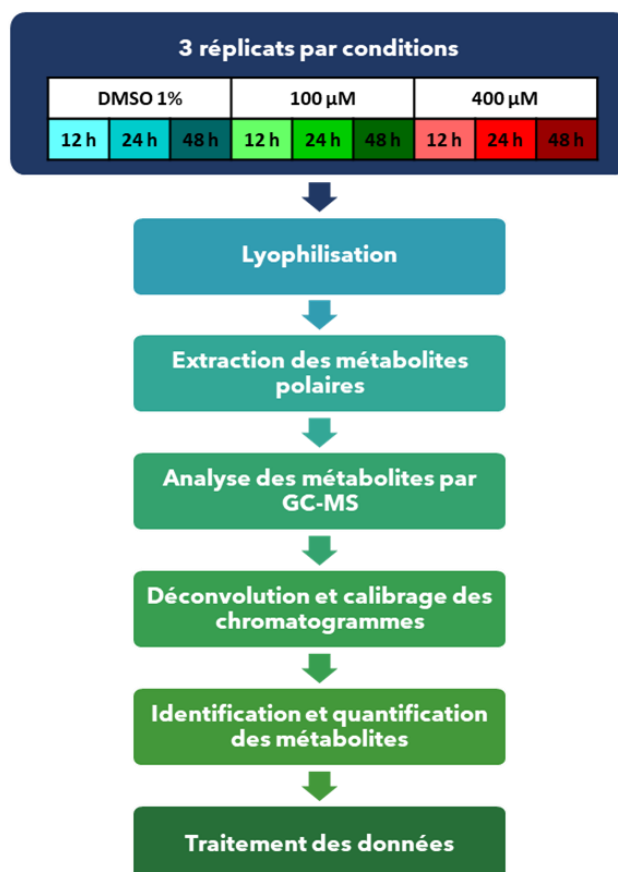


Figure 39 : Présentation synthétique de l'analyse métabolomique réalisée.

L'analyse métabolomique a été réalisée en collaboration avec la plateforme Métabolisme-Métabolome (PMM) de l'Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay (IPS2), selon la procédure résumée dans la Figure 40. En l'absence de données orientant vers une classe de molécules particulière et sur la base des effets observés sur l'activité photosynthétique, le choix a été fait d'une approche permettant l'extraction et la quantification d'une variété de molécules, essentiellement associées au métabolisme primaire (Fiehn, 2016, 2006). Cette approche inclue l'extraction des métabolites dans un système de solvant

isopropanol/acétonitrile/eau (3:3:2) qui permet à la fois la solubilisation de métabolites polaires et de métabolites moyennement apolaires, suivie de leur séparation par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à une détection/quantification par spectrométrie de masse (EI).

III Analyse globale des métabolites identifiés dans les plantules d'*Arabidopsis*.

Suite à l'analyse GC-MS mise en œuvre, les métabolites détectés ont été identifiés sur la base de leur temps de rétention et de leur spectre de masse. La base de données utilisée regroupe plus de 800 métabolites retrouvés chez *Arabidopsis thaliana*. Comme le montre le Tableau 5, 98 métabolites ont ainsi pu être identifiés et quantifiés à partir des échantillons contrôles et traités par le Radula chromène. Ces métabolites sont présents dans l'ensemble des échantillons et constituent donc le métabolome des plantules d'*Arabidopsis* dont les modifications ont pu être analysées dans la suite de l'étude. En revanche aucun métabolite spécifique n'a été détecté, que ce soit dans les échantillons témoins ou dans les échantillons traités par le Radula chromène. Un premier regroupement des composés a été effectué pour obtenir une vue d'ensemble des classes chimiques/biochimiques représentées (Tableau 5). Comme attendu, compte tenu du type d'analyse GS-MS et de la base de données qui ont été utilisés, les composés détectés correspondent essentiellement à des métabolites primaires (Tableau 5). On retrouve ainsi 21 sucres et dérivés conjugués, 25 acides aminés et dérivés, 10 acides gras libres et un ensemble de 42 composés parmi lesquels, entre autres, des acides organiques et dérivés et des purines. Les processus métaboliques dans lesquels les composés identifiés interviennent ont été recherchés sont présentés dans le Tableau 6. Parmi les voies métaboliques représentées, certaines participent au métabolisme carboné comme la photosynthèse (3-phosphoglycérate, saccharose) ou la photorespiration (glycérate, glycolate). De nombreuses voies participent également au métabolisme azoté (métabolisme des acides aminés, des purines). On retrouve également des métabolites associés au métabolisme énergétique au travers de la glycolyse (glucose, glucose-6-P, fructose-6-P) et du cycle de Krebs (malate, succinate, citrate, fumarate). Enfin, de nombreux métabolites sont associés au métabolisme lipidique (acides gras, phytosphingosine). Bien que le nombre de métabolites identifiés (98) soit restreint, il couvre donc une partie significative du métabolisme primaire.

Tableau 5 : Liste des 98 métabolites détectés par l'analyse métabolomique

Classe chimique	Métabolites	Classe chimique	Métabolites
Alcools et polyols	myo-inositol	Dérivés carboxylés	Acétylhydroxamate
	Shikimate		Dicarboxylates et dérivés
Alpha-hydroxyacide et dérivés	Glycolate	2-Isopropylmalate	
	L-Lactate	3-Hydroxyméthylglutarate	
Alpha-cétoacides et dérivés		Fumarate	
	Pyruvate	Maléate	
Amines		Succinate	
	Ethanolamine	Acides gras et dérivés	
	Phytosphingosine	Acide arachidonique	
	Putrescine	Acide laurique	
Acide aminés, peptides, et analogues	Triéthanolamine	Acide eicosa-11,14-diénoïque	
		Acide élaidique	
		Acide linoléique	
	25-amino-pentanoate	Acide myristique	
	4-Hydroxyproline	Acide oléique	
	Citrulline	Acide palmitique	
	GABA	Acide palmitoléique	
	Glycine	Stéarate	
	L-Alanine	Gamma-butyrolactones	
	L-Asparagine	Erythrono-1,4-lactone	
L-Aspartate	L-Déhydroascorbate		
L-Glutamate	Glycérophosphates		
L-Glutamine	Glycérol 3-phosphate		
L-Histidine	Hydropyridines		
L-Homoserine	2-Hydroxypyridine		
L-Isoleucine	Hydroxycinnamates et dérivés		
L-Leucine	Sinapate		
L-Lysine	Imidazoles		
L-Méthionine	Allantoïne		
L-Phénylalanine	Indoles		
L-Sérine	3-Indoleacétonitrile		
L-Thréonine	Hydroxyacides à chaîne moyenne et dérivés		
L-Tryptophane	Galactonate		
L-Tyrosine	Phosphates non-métalliques		
L-Valine	Phosphate		
N-Acétylornithine	Nucléosides		
N-méthylalanine	Adénosine		
O-Acétylserine	Uridine		
Ornithine	Phénéthylamines		
Benzoates et dérivés		Tyramine	
4-Hydroxybenzoate	Esters de phosphate	O-Phosphoethanolamine	
Benzoate	Purines et dérivés de purine		
Beta-hydroxyacides et dérivés		Adénine	
D-Malate		Urate	
Sucres et dérivés		Xanthine	
Alpha-Lactose	Pyridinecarboxylates et dérivés		
Arbutin		Nicotinate	
Beta-Cortol		Picolinate	
D-Galactosamine	Stigmastanes et dérivés		
D-Galacturonate		Beta-Sitostérol	
D-Glucose		Stigmastérol	
D-Glycérate 3-phosphate	Tricarboxylates et dérivés		
D-Maltose		Citrate	
D-Mannose	Triterpénoides		
D-Ribose		Squalène	
D-Xylose	Urées		
Fructose 6-phosphate		Urée	
Fructose-1-phosphate			
Galactarate			
Glucose 6-phosphate			
Glycérate			
Glycérol			
L-Arabinose			
Lévoglucosane			
Sucrose			
Thréonate			

Tableau 6 : Principaux processus métaboliques intégrant les métabolites identifiés.

La recherche de voies métaboliques a été effectuée par référence à la base KEGG pour *A. thaliana* (ath). Le nombre de métabolites total de la voie ainsi que le nombre identifié dans l'étude sont indiqués. Seuls les processus intégrant au moins trois métabolites sont indiqués.

Numéro ATH	Nom de voie métabolique	Nombre
ath02010	Transporteurs ABC	31
ath01230	Biosynthèse des acides aminés	27
ath01200	Métabolisme du carbone	16
ath01210	Métabolisme des acides 2-oxocarboxyliques	15
ath00630	Métabolisme du glyoxylate et des dicarboxylates	11
ath00250	Métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate	10
ath00260	Métabolisme de la glycine, de la sérine et de la thréonine	9
ath00052	Métabolisme du galactose	9
ath00460	Métabolisme des acides cyanoaminés	8
ath00270	Métabolisme de la cystéine et de la méthionine	8
ath00230	Métabolisme des purines	8
ath00220	Biosynthèse de l'arginine	8
ath00760	Métabolisme du nicotinate et de la nicotinamide	7
ath00330	Métabolisme de l'arginine et de la proline	7
ath00966	Biosynthèse des glucosinolates	7
ath00053	Métabolisme de l'acide ascorbique et de l'aldarate	7
ath00999	Biosynthèse de divers métabolites secondaires végétaux	7
ath00061	Biosynthèse des acides gras	6
ath00650	Métabolisme du butanoate	6
ath00290	Biosynthèse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine	6
ath00710	Fixation du carbone chez les organismes photosynthétiques	6
ath01040	Biosynthèse des acides gras insaturés	6
ath00350	Métabolisme de la tyrosine	6
ath00620	Métabolisme du pyruvate	6
ath00960	Biosynthèse des alcaloïdes de tropane, de pipéridine et de pyridine	5
ath00480	Métabolisme du glutathion	5
ath00020	Cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs)	5
ath00564	Métabolisme des glycérophospholipides	5
ath00010	Glycolyse / Gluconéogenèse	5
ath01232	Métabolisme des nucléotides	5
ath00030	Voie des pentoses phosphates	5
ath00040	Interconversions des pentoses et des glucuronates	5
ath00400	Biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane	5
ath00360	Métabolisme de la phénylalanine	5
ath01250	Biosynthèse des nucléosides	4
ath00920	Métabolisme du soufre	4
ath00561	Métabolisme des glycérolipides	4
ath00500	Métabolisme de l'amidon et du saccharose	4
ath00770	Biosynthèse de la pantothénate et de la coenzyme A	3
ath00340	Métabolisme de l'histidine	3
ath00600	Métabolisme des sphingolipides	3
ath00051	Métabolisme du fructose et du mannose	3
ath00380	Métabolisme du tryptophane	3
ath00310	Dégradation de la lysine	3
ath00410	Métabolisme de la beta-alanine	3
ath00190	Phosphorylation oxydative	3
ath00240	Métabolisme des pyrimidines	3
ath00940	Biosynthèse des phénylpropanoïdes	3
ath00860	Métabolisme des porphyrines	3
ath00730	Métabolisme de la thiamine	3
ath00280	Dégradation de la valine, de la leucine et de l'isoleucine	3
ath00300	Biosynthèse de la lysine	3
ath00100	Biosynthèse des stéroïdes	3

IV Modifications du métabolome induites par le Radula chromène

Un premier objectif de notre étude étant de définir l'effet d'un traitement par le Radula chromène sur le métabolome d'Arabidopsis, une comparaison de l'abondance des différents métabolites identifiés dans les différentes conditions de traitement a été mise en œuvre. Pour ce faire, les données acquises par GC-MS ont été transformées *via* MeV, permettant ainsi l'étude de l'abondance d'un métabolite à la fois entre les conditions, et par rapport aux autres métabolites d'un échantillon spécifique (normalisation standard, voir Matériel et Méthodes – VIII.4).

L'analyse en composantes principales (PCA) de l'ensemble des données ainsi normalisées a été utilisée pour évaluer l'impact de l'application du Radula chromène, en fonction de la dose employée et de la durée du traitement sur le métabolome des plantules (Figure 40). Comme le montre la Figure 41, les différents réplicats d'un même traitement sont peu discriminés par l'analyse, indiquant que les métabolomes des différents lots de plantules diffèrent peu et que leur réponse présente une bonne reproductibilité. La Composante Principale PC1, qui représente 42,81 % de la variance, ségrège fortement la condition C₄₀₀ (plantules traitées par 400 µM de Radula chromène) des autres conditions (Figure 41A). La Composante Principale PC2 qui représente 12,34 % de la variance discrimine la condition contrôle C_{DMSO} du traitement par le Radula chromène à faible dose (C₁₀₀). Cette analyse met donc en évidence un effet du Radula chromène sur le métabolome des plantules traitées. Cet effet est très marqué pour la plus forte dose de Radula chromène employée, qui provoque la mort rapide des plantules, et apparaît moins important à la dose bioactive la plus faible. De plus, la Composante Principale PC3, qui représente 9,59 % de la variance, permet en partie de discriminer les traitements en fonction de leur durée. (Figure 41B). L'analyse discrimine essentiellement les traitements de plus courte durée (avant apparition des premiers symptômes de chlorose) des traitements prolongés et la différence est observée dans le cas d'applications de faibles doses de Radula chromène (Figure 41B). Il est à noter que, dans les conditions de contrôle C_{DMSO}, une variation du métabolome liée à la durée de traitement est également observée, malgré une absence totale de symptômes observable et une poursuite de la croissance des plantules (Figure 41).

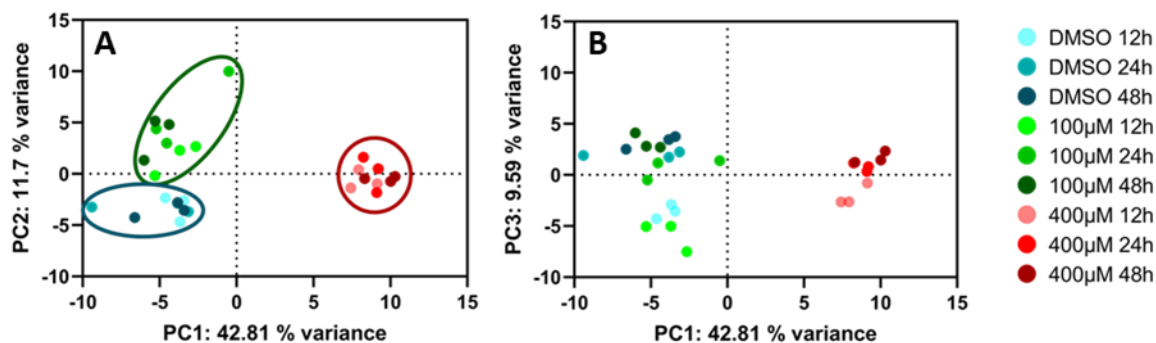


Figure 40 : Analyse en Composantes Principales (PCA) de l'abondance des métabolites en réponse au traitement par le Radula chromène.

Pour chaque traitement, les points identiques correspondent aux différents réplicats.

L'effet des différents traitements a également été analysé à l'échelle de chaque métabolite identifié, en comparant son abondance dans la condition contrôle C_{DMSO} et dans chacune des deux conditions de traitement (C_{100} et C_{400}), pour les trois durées de traitement. L'ensemble des variations d'abondance des 98 métabolites est présenté dans le tableau 7.

Tableau 7 : Effet du Radula chromène sur l'abondance des métabolites identifiés.

Les variations (log2) par rapport à la condition contrôle pour chaque condition de traitement sont indiquées, et les valeurs significatives (t test, P<0,05) sont surlignées en jaune (accumulation) et bleu (déplétion).

	100 µM			400 µM		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
2-Hydroxypyridine	0,08	0,14	0,07	-0,97	-0,03	-0,16
2-Isopropylmalate	4,66	1,14	1,03	5,45	4,15	2,14
2S-amino-pentanoate	0,58	0,76	0,56	-0,94	-1,70	-2,46
3-Hydroxyméthylglutarate	-0,44	-0,11	-0,21	-3,78	-3,69	-4,21
3-Indoleacétonitrile	-0,03	-0,11	0,36	-2,10	-2,97	-3,07
4-Hydroxybenzoate	0,13	0,51	0,48	0,59	0,72	0,60
4-Hydroxyproline	0,24	0,39	-0,10	-2,98	-2,89	-4,51
Acétohydroxamate	0,29	0,36	0,37	0,14	0,08	-0,39
Acide arachidique	0,87	1,40	1,08	0,71	1,09	0,80
Acide eicosa-11,14-diénoïque	1,62	2,19	1,96	0,91	1,67	1,46
Acide élaïdique	0,55	1,26	1,00	0,89	1,46	1,27
Acide laurique	0,16	0,33	0,12	-0,14	0,02	-0,18
Acide linoléique	1,27	1,69	1,64	0,60	1,05	1,06
Acide myristique	0,05	0,26	0,19	0,10	0,17	0,22
Acide oléique	1,03	1,33	1,37	0,72	1,21	1,26
Acide palmitique	0,27	1,20	0,27	0,92	1,30	1,22
Acide palmitoléique	0,90	0,84	1,03	0,74	0,82	1,42
Adénine	0,07	0,64	0,39	0,71	1,02	1,24
Adénosine	-0,20	0,09	0,51	-0,45	-1,04	-1,14
Allantoïne	-0,05	-0,68	-0,11	-3,42	-7,00	-6,15
Alpha-Lactose	0,39	0,80	-0,18	-1,59	-1,50	-2,52
Arbutine	1,70	5,64	9,03	-0,84	-2,60	0,19
Benzoate	0,75	0,38	0,48	-0,28	-0,59	-0,41
Beta-Cortol	0,02	-0,55	0,03	-2,68	-3,71	-4,11
Beta-Sitostérol	-0,51	-0,13	-0,68	-0,19	-0,21	-0,57
Citrate	-0,04	-1,02	0,16	-2,82	-5,10	-5,09
Citrulline	-0,35	-0,81	-1,83	-2,41	-3,17	-4,55
D-Galactosamine	0,24	-0,50	0,64	-2,98	-3,85	-3,26
D-Galacturonate	-0,89	1,30	0,78	-0,88	-0,06	0,28
D-Glucose	-0,21	-0,07	-0,10	-2,19	-3,34	-3,61
D-Glycerate 3-phosphate	-0,68	-0,52	-0,05	-4,18	-4,95	-4,28
D-Malate	-0,76	-1,54	-0,63	-2,43	-4,36	-5,88
D-Maltose	0,11	1,47	1,41	0,38	1,99	1,15
D-Mannose	-0,48	-5,90	-1,08	-4,47	-5,19	-5,18
D-Ribose	0,45	0,62	0,20	2,45	1,74	1,99
D-Xylose	-0,19	0,06	0,16	-2,09	-0,36	-2,45
Erythrono-1,4-lactone	-0,08	-0,49	0,12	-3,27	-3,44	-3,34
Ethanolamine	-0,26	-0,47	-0,17	-1,98	-2,75	-3,13
Fructose 6-phosphate	-0,51	0,20	0,49	-5,35	-6,54	-7,53
Fructose-1-phosphate	-0,24	0,39	0,43	-2,57	-2,97	-3,25
Fumarate	-0,43	-0,65	0,51	-2,19	-3,68	-3,56
GABA	0,04	0,13	0,58	-0,57	-1,30	-1,43
Galactarate	0,45	0,69	1,19	-1,44	-1,40	-0,79
Galactonate	0,28	0,10	0,68	-0,59	-1,68	-2,13
Glucose 6-phosphate	-0,36	-0,09	0,66	-4,47	-5,85	-4,87
Glycérate	-0,43	-0,15	0,60	-3,11	-3,35	-3,62
Glycérol	0,96	0,59	0,49	-0,38	-0,79	-0,98
Glycérol 3-phosphate	0,32	-0,27	0,45	-1,81	-2,45	-2,27
Glycine	-0,41	-0,32	-0,89	-1,94	-3,33	-4,16
Glycolate	0,17	0,10	0,53	-0,53	-0,93	-0,81
L-Alanine	0,61	1,59	0,58	-0,17	-0,51	-0,68
L-Arabinose	-0,52	-0,13	0,28	1,29	0,95	0,82
L-Asparagine	0,29	0,23	-0,29	-2,75	-3,95	-4,92
L-Aspartate	-0,93	-1,82	-0,55	-4,90	-5,26	-5,64

L-Déhydroascorbate	0,25	-1,05	-0,34	-2,77	-5,24	-5,43
Lévogluosane	0,55	0,06	0,03	-1,18	-1,96	-2,31
L-Glutamate	-0,54	-0,95	-1,28	-3,49	-6,36	-5,17
L-Glutamine	0,34	0,43	-0,10	-2,77	-3,76	-4,78
L-Histidine	-0,04	-0,85	-1,22	-2,80	-4,42	-5,04
L-Homoserine	-0,24	0,35	-0,32	-1,04	-1,00	-1,49
L-Isoleucine	-0,12	-0,35	-0,03	-0,21	-1,07	-1,71
L-Lactate	0,11	-0,05	0,65	-0,36	-0,59	0,75
L-Leucine	-0,02	-0,25	-0,13	1,22	0,53	0,30
L-Lysine	-0,13	-0,66	-0,63	-0,41	-2,21	-2,76
L-Méthionine	0,24	0,93	0,26	1,01	0,13	-2,08
L-Phénylalanine	0,23	-0,07	0,24	-1,04	-1,65	-2,45
L-Sérine	0,51	1,31	0,96	-4,10	-4,75	-6,17
L-Thréonine	0,30	0,27	0,75	-2,24	-3,23	-3,98
L-Tryptophane	0,08	-0,29	0,25	-0,61	-3,04	-3,15
L-Tyrosine	0,26	0,44	0,92	1,30	1,02	1,26
L-Valine	0,05	0,15	0,32	-0,21	-0,99	-1,10
Maléate	0,05	-0,95	0,17	-2,13	-2,92	-1,83
myo-Inositol	0,23	-0,03	-0,02	-0,58	-1,35	-1,44
N-Acétylornithine	0,57	1,57	-1,00	-5,17	-1,77	-4,29
Nicotinate	0,06	-0,20	0,13	-0,84	-1,53	-1,44
N-méthylalanine	-0,26	-0,33	-0,18	0,42	0,15	0,28
O-Acétylserine	1,04	0,67	0,54	-2,36	-0,24	-0,81
O-Phosphoethanolamine	0,62	-0,63	-1,20	-3,36	-4,44	-6,56
Ornithine	-0,76	-0,72	-2,01	-2,86	-2,93	-4,32
Phosphate	-0,22	-0,21	0,13	-2,07	-2,52	-2,96
Phytosphingosine	1,01	-0,41	0,53	0,08	-1,40	-2,26
Picolinate	0,21	0,19	0,03	-0,33	-0,05	-0,32
Putrescine	0,37	-0,33	-0,92	0,08	-0,87	-1,22
Pyruvate	0,71	1,28	0,99	-0,50	-2,30	-2,78
Shikimate	-0,30	0,16	1,09	-4,03	-4,11	-3,79
Sinapate	-0,17	-0,62	-0,21	-2,67	-4,26	-4,28
Squalène	1,48	-1,23	1,83	0,17	-2,80	0,09
Stéarate	0,05	1,59	-0,38	0,82	1,03	0,63
Stigmastérol	-0,32	0,45	-0,57	0,03	0,10	-0,80
Succinate	1,02	2,48	1,66	-2,61	-2,65	-1,56
Sucrose	0,64	1,02	0,75	0,61	0,71	-0,38
Thréonate	0,49	0,21	0,90	-1,75	-2,99	-2,74
Triéthanolamine	0,35	-1,47	0,24	-0,24	-1,33	0,16
Tyramine	-0,03	-0,33	-0,26	-1,65	-2,67	-2,79
Urate	-1,43	-2,34	-1,36	-4,06	-6,28	-5,62
Urée	0,02	-0,12	-0,36	-0,45	-1,59	-2,29
Uridine	0,53	1,18	0,39	0,83	-0,04	-0,73
Xanthine	-0,67	-1,78	-0,29	-2,23	-3,26	-1,25

Dans la suite de l'analyse, seuls les métabolites présentant une variation significative seront considérés. On notera cependant que l'abondance du saccharose et de deux acides gras à courte chaîne, l'acide myristique et l'acide laurique, n'est pas affecté par le Radula chromène. La figure 42 résume cette analyse et montre le nombre de métabolites dont l'abondance est significativement augmentée ou diminuée dans les conditions C₁₀₀ et C₄₀₀.

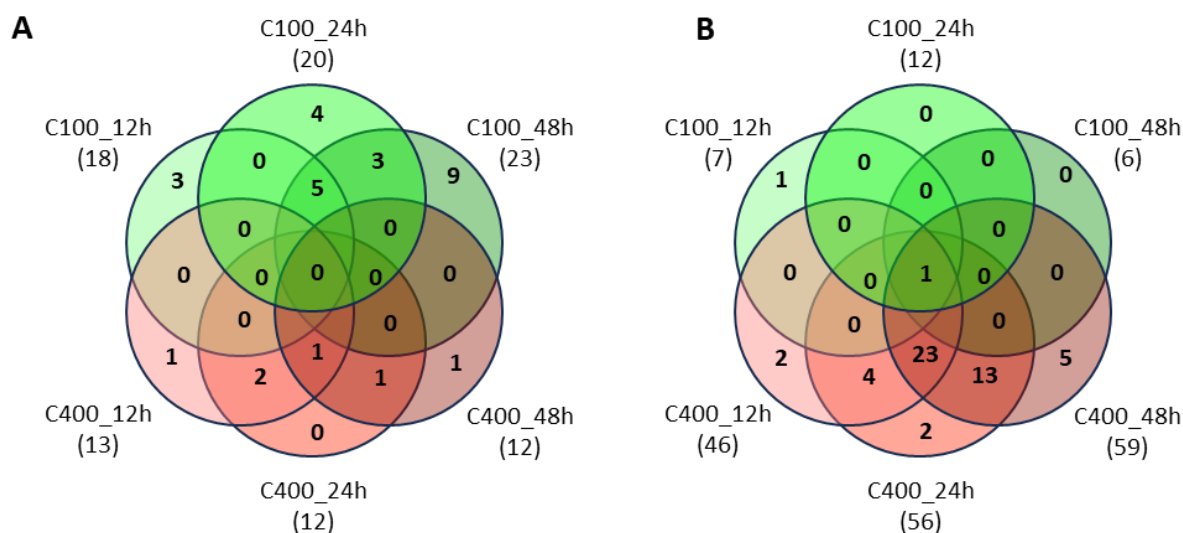


Figure 41 : Vue d'ensemble de l'effet du Radula chromène sur l'abondance des métabolites identifiés.

Le nombre de métabolites significativement accumulés (A) ou déplétés (B) en réponse aux différents traitements est indiqué entre parenthèses. Le nombre de métabolites variant de façon commune dans différentes conditions est indiqué sur les diagrammes de Venn.

Les données font apparaître de fortes différences entre les traitements à faible (C_{100}) et forte concentration (C_{400}). Pour les différentes durées C_{100} , l'abondance de la majorité (67,3-74,5 %) des métabolites n'est pas affectée, et ce quelle que soit la durée de traitement. Dans le cas des 25-32 % de composés dont l'abondance est modifiée en réponse au traitement, celle-ci est majoritairement augmentée. Les différences les plus importantes sont observées après 24 h de traitement, où 20,5 % et 12,2 % des métabolites sont accumulés et déplétés suite à l'application de Radula chromène, respectivement. En revanche, lors de l'application de fortes doses de Radula chromène (C_{400}), l'abondance d'une proportion importante (61,2-72,4 %) de métabolites est significativement modifiée. On observe une déplétion massive de la plupart de ces composés, en particulier pour les durées de traitement les plus longues (60 % de l'ensemble des métabolites identifiés après 48h). Ces données suggèrent donc un effondrement massif du métabolisme lorsque les plantules sont traitées par de fortes doses de Radula chromène, tandis que des modifications plus ciblées interviendraient à plus faible dose. La durée du traitement ne modifie que de façon marginale le métabolome des plantules traitées par le Radula chromène, en termes de nombre de métabolites affectés.

Tableau 8 : Liste des métabolites dont l'abondance est modifiée de manière significative en réponse au Radula chromène.

(accumulés /Déplétés)	100 µM			400 µM			
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h	
	(18/7)	(20/12)	(23/6)	(13/46)	(12/56)	(12/59)	
Métabolites accumulés	acétyl-L-sérine	4-hydroxybenzoate	2-isopropylmalate	2-isopropylmalate	4-hydroxybenzoate	2-isopropylmalate	
	acide arachidique	acétyl-L-sérine	3-indoleacétonitrile	4-hydroxybenzoate	adénine	4-hydroxybenzoate	
	arbutine	adénine	acétyl-L-sérine	adénine	arabinose	adénine	
	benzoate	acide arachidique	arbutine	arabinose	acide eicosa-11,14-diénoïque	acide arachidique	
	acide eicosa-11,14-diénoïque	arbutine	benzoate	acide arachidique	L-tyrosine	acide eicosa-11,14-diénoïque	
	glycérol	benzoate	fumarate	acide eicosa-11,14-diénoïque	acide linoléique	L-tyrosine	
	glycérol 1-phosphate	acide eicosa-11,14-diénoïque	galactonate	L-leucine	maltose	N-méthylalanine	
	L-thréonine	galacturonate	galacturonate	acide linoléique	acide oléique	acide oléique	
	acide linoléique	L-alanine	GABA	acide palmitique	acide palmitique	acide palmitique	
	O-phosphocolamine	L-sérine	glycérate	acide palmitoléique	ribose	acide palmitoléique	
	acide oléique	lactose	glycérol	ribose	stéarate	ribose	
	acide palmitique	acide linoléique	glycolate	stéarate	acide trans-13-octadécénoïque	acide trans-13-octadécénoïque	
	acide palmitoléique	mucate	L-sérine	acide trans-13-octadécénoïque			
	phytosphingosine	N-acétyl-ornithine	L-thréonine				
	pyruvate	acide oléique	lactate				
	squalène	acide palmitique	maltose				
	succinate	acide palmitoléique	mucate				
	acide trans-13-octadécénoïque	picolinate	acide palmitoléique				
		pyruvate	pyruvate				
		succinate	shikimate				
			squalène				
			succinate				
			thréonine				
	Métabolites déplétés	3-phosphoglycérate	3-phosphoglycérate	beta-sitostérol	1,6-anhydro-glucose	3-hydroxy-3-méthylglutarate	1,6-anhydro-glucose
		aspartate	aspartate	citruiline	3-hydroxy-3-méthylglutarate	3-indoleacétonitrile	3-hydroxy-3-méthylglutarate
		beta-sitostérol	citrate	déhydroascorbate	3-phosphoglycérate	3-phosphoglycérate	3-indoleacétonitrile
		malate	D-malate	L-ornithine	3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamate	3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamate	3-phosphoglycérate
acide fumarique		D-mannose	O-phosphocolamine	4-hydroxypyridine	allantoïne	3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamate	
N-méthylalanine		déhydroascorbate	urate	acétyl-L-sérine	arbutine	adénosine	
urate		fumarate		aspartate	aspartate	allantoïne	
		L-glutamate		citrate	benzoate	aspartate	
		O-phosphocolamine		citruiline	citrate	citrate	
		acide phosphorique		D-glucose	citruiline	citruiline	
		urate		D-glucose-6-phosphate	D-glucose	D-glucose	
		xanthine		D-malate	D-glucose-6-phosphate	D-glucose-6-phosphate	
				déhydroascorbate	D-malate	D-malate	
				erythro-1,4-lactone	D-mannose	déhydroascorbate	
				éthanolamine	déhydroascorbate	éthanolamine	
				fructose	DL-isoleucine	fructose 6-phosphate	
				fructose 6-phosphate	erythro-1,4-lactone	fumarate	
				galactinol	éthanolamine	galactinol	
				galactosamine	fructose	galactonate	
				glycérate	fructose 6-phosphate	galactosamine	
				glycérol	fumarate	GABA	
				glycérol 1-phosphate	galactinol	glycérate	
				glycine	galactonate	glycérol	
				glycolate	galactosamine	glycérol 1-phosphate	
				L-asparagine	GABA	glycine	
				L-glutamate	glycérate	glycolate	
				L-glutamine	glycérol	L-glutamate	
				L-homoserine	glycérol 1-phosphate	L-glutamine	
				L-ornithine	glycine	L-histidine	
				L-sérine	glycolate	L-homoserine	
				L-thréonine	L-asparagine	L-isoleucine	
				maléate	L-glutamate	L-lysine	
				mucate	L-glutamine	L-méthionine	
				myo-inositol	L-lysine	L-ornithine	
				N-acétyl-ornithine	L-ornithine	L-sérine	
				nicotinate	L-sérine	L-thréonine	
				O-phosphocolamine	L-thréonine	L-tryptophane	
				phénylalanine	L-tryptophane	L-valine	
				acide phosphorique	L-valine	lactose	
				shikimate	lactose	maléate	
				thréonate	mucate	myo-inositol	
				trans-4-hydroxy-L-proline 1	myo-inositol	N-acétyl-ornithine	
				tyramine	nicotinate	nicotinate	
				urate	O-phosphocolamine	norvaline	
				xanthine	phénylalanine	O-phosphocolamine	
				xylose	acide phosphorique	phénylalanine	
					phytosphingosine	acide phosphorique	
				pyruvate	phytosphingosine		
				shikimate	picolinate		
				succinate	pyruvate		
				thréonate	shikimate		
				trans-4-hydroxy-L-proline 1	succinate		
				tyramine	thréonate		
				urée	trans-4-hydroxy-L-proline		
				urate	tyramine		
				xanthine	urée		
					xanthine		
					xylose		

En revanche, le nombre de métabolites communs à l'ensemble des conditions reste très faible (Tableau 8). En effet, seul l'acide urique est déplétée dans toutes les conditions et temps de traitement. De façon intéressante, on peut également remarquer que 26 composés s'accumulent uniquement lors d'un traitement à faible dose de Radula chromène (Tableau 8). Parmi ceux-ci, 5 sont communs aux trois temps de traitement (acétyl-L-serine, acide benzoïque, acide succinique, acide pyruvique et arbutine). Comme souligné, les traitements à forte dose induisent les plus fortes variations d'abondance (déplétion). Ainsi, 23 composés sont affectés de la même façon à tous les temps de traitement C₄₀₀ (Tableau 8).

Pour aller plus loin dans l'identification de profils de variation similaires pouvant être reliés à une régulation coordonnée, un regroupement hiérarchique des 98 métabolites a été effectué, sur la base d'une analyse ANOVA à deux facteurs (dose et durée du traitement par le Radula chromène). En premier lieu, cette analyse fait apparaître 82 métabolites dont l'abondance varie différenciellement en fonction de la nature du traitement. Lorsqu'un regroupement hiérarchique est effectué sur ces composés, représenté sous forme de carte de chaleur (Figure 43), 3 clusters principaux sont mis en évidence. Le cluster K1 regroupe 7 métabolites (adénine, 4-hydroxybenzoate, ribose, arabinose, méthylalanine, tyrosine, leucine) dont le profil montre une accumulation forte en réponse aux traitements C₄₀₀ par rapport aux traitements C_{DMSO} et C₁₀₀. Le cluster K2 est constitué des 7 acides gras C16 à C20 identifiés dans le métabolome (acides palmitique (C16:0), palmitoléique (C16:1), oléique (C18:1), elaidique (C18:1), linoléique (C18:2), arachidique (C20:0), et eicosadiénoïque (C20:2)). Tous présentent une abondance supérieure en réponse au traitement Radula chromène, quelle que soit la dose appliquée. Enfin, le cluster K3 regroupe la majorité des métabolites (66), qui sont caractérisés par une forte déplétion lors de traitements par le Radula chromène à forte dose (C₄₀₀). Ce cluster regroupe des composés associés à des voies métaboliques variées, comme mentionné précédemment (Tableau 8). On retrouve en particulier des métabolites associés à la photosynthèse (3-P-glycérate), à la glycolyse (glucose-6-P, fructose-6-P, pyruvate) et les quatre intermédiaires du cycle de Krebs (succinate, fumarate, malate, citrate). En marge de ces trois clusters, un composé, l'arbutine, présente un profil unique, avec une accumulation spécifique en réponse à des traitements par le Radula chromène à faible dose.

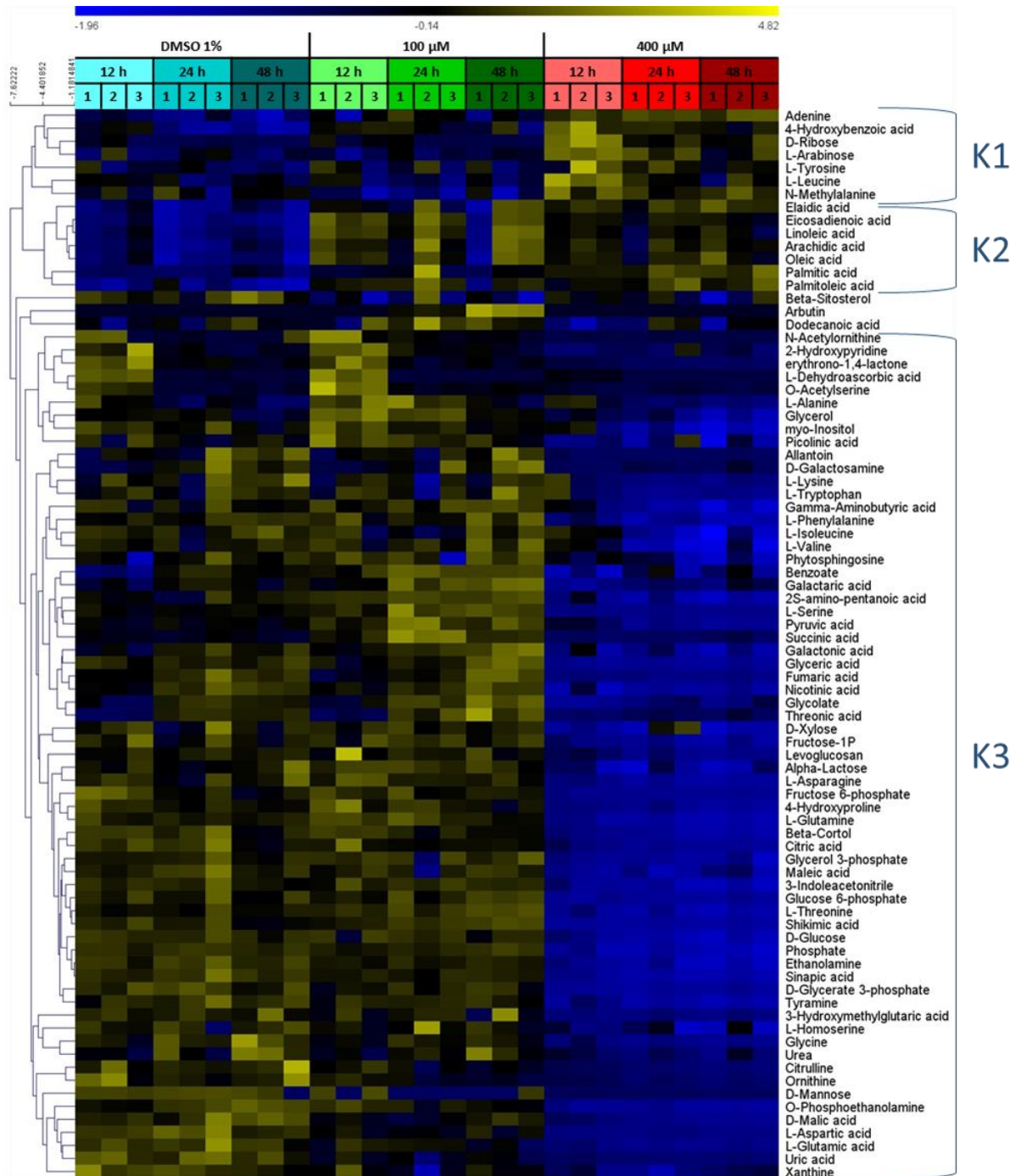


Figure 42: Regroupement hiérarchique des métabolites en fonction de la nature du traitement.

Les métabolites dont l'abondance varie significativement (ANOVA, $p < 0.05$) en fonction de la nature du traitement (DMSO, 100 µM ou 400 µM Radula chromène) sont représentés. Les métabolites sont hiérarchisés selon leur profil de variation et regroupés en clusters (Liaison moyenne, corrélation de Pearson). Chaque colonne représente un réplicat.

Comme suggéré par l'analyse globale du métabolome, la durée du traitement affecte peu les profils d'abondance. En effet, l'analyse ANOVA utilisant la combinaison durée x type de traitement identifie seulement 25 métabolites (Figure 44). A l'exception du cluster KA pour lequel les trois composés (ribose, leucine et méthionine) présentent une accumulation transitoire à 12 h de traitement C₄₀₀, les autres clusters distinguent des métabolites sur la base de leur profil d'accumulation suite au traitement C₁₀₀. Parallèlement, ces mêmes métabolites sont rapidement déplétés suite aux traitements C₄₀₀. On observe ainsi une accumulation transitoire à 12 h (KB et KD ; e.g. déhydroascorbate), 24 h (KC ; e.g. pyruvate) ou 48 h (KE ; e.g. fumarate) des différents métabolites.

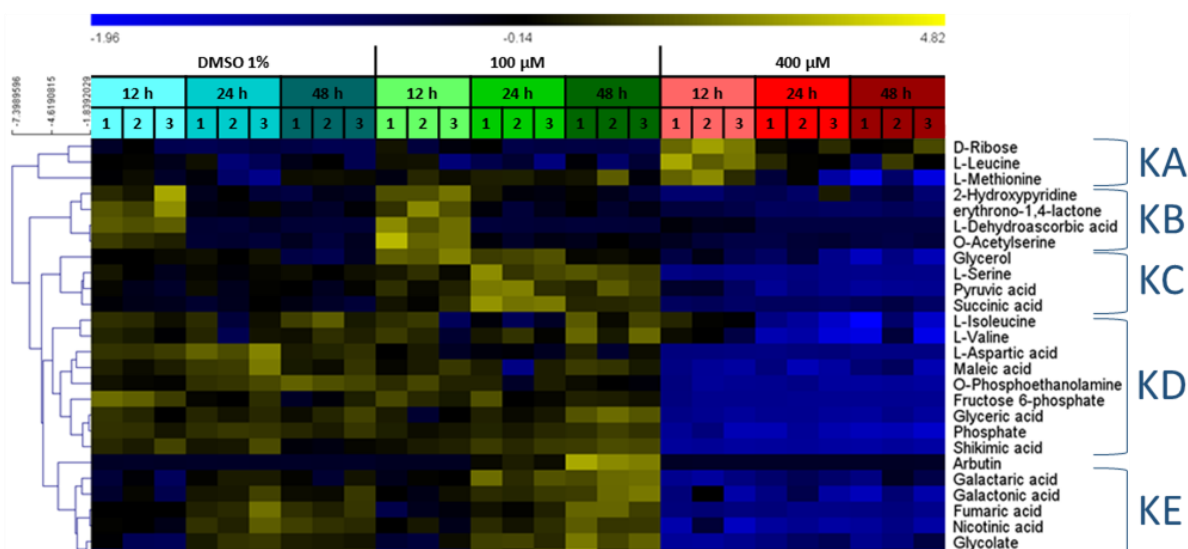


Figure 43 : Regroupement hiérarchique des métabolites en fonction de la durée et de la nature du traitement.

Les métabolites dont l'abondance varie significativement (ANOVA, $p < 0.05$) en fonction de nature du traitement (DMSO, 100 µM ou 400 µM Radula chromène) sont représentés. Les métabolites sont hiérarchisés selon leur profil de variation et regroupés en clusters (Liaison moyenne, corrélation de Pearson). Chaque colonne représente un réplicat.

Les profils de variation observés ont été intégrés à une analyse ontologique, afin de rechercher les processus métaboliques affectés par le Radula chromène et les effets différentiels possibles de traitements à faible et forte doses. La durée de traitement ayant un effet mineur sur les réponses observées, nous avons choisi de représenter les variations pour le temps de traitement le plus court (12h). Comme le montre la Figure 45, parmi les différents processus pour lesquels des métabolites ont été détectés et quantifiés, le Radula chromène affecte de façon globale les métabolismes carboné (photosynthèse, carbohydrates, lipides) et azoté (acides aminés, purines) de la plante, et probablement le métabolisme énergétique, au travers de son effet sur le cycle de Krebs. Cette analyse met également en lumière un effet

très contrasté des traitements à faible et forte doses. En effet, outre le fait que le traitement à faible dose de Radula chromène modifie de façon discrète l'abondance des métabolites, quelques variations apparaissent opposées en fonction de la dose de Radula chromène utilisée (Tableau 8). C'est le cas du glycérol et du glycérol-3-P, ainsi que de la thréonine. On peut cependant noter des points de convergence intéressants. En premier lieu, au niveau du processus photosynthétique, la quantité de 3-phosphoglycérate diminue rapidement, quelle que soit la dose appliquée, cette diminution étant plus accentuée pour le traitement C₄₀₀. Ce même profil est également observé pour l'acide urique (métabolisme des purines) ou l'acide malique (cycle de Krebs) et l'acide aspartique (métabolisme des acides aminés). Enfin, un effet similaire des deux doses de traitement est observé sur le métabolisme des acides gras. En effet, l'abondance de la majeure partie des acides gras à chaîne moyenne (C16 à C20) identifiés est augmentée suite au traitement. Dans le même temps, d'autres lipides sont affectés uniquement en réponse aux faibles doses de Radula chromène (stigmastérol, sitostérol, phytosphingosine). L'ensemble de ces données fait donc apparaître des effets différenciés des traitements à faible et forte dose de Radula chromène. Il suggère également que des voies métaboliques particulières comme le métabolisme des acides gras, le cycle de Krebs ou le métabolisme des purines pourraient constituer des cibles directes ou indirectes de l'action du Radula chromène.

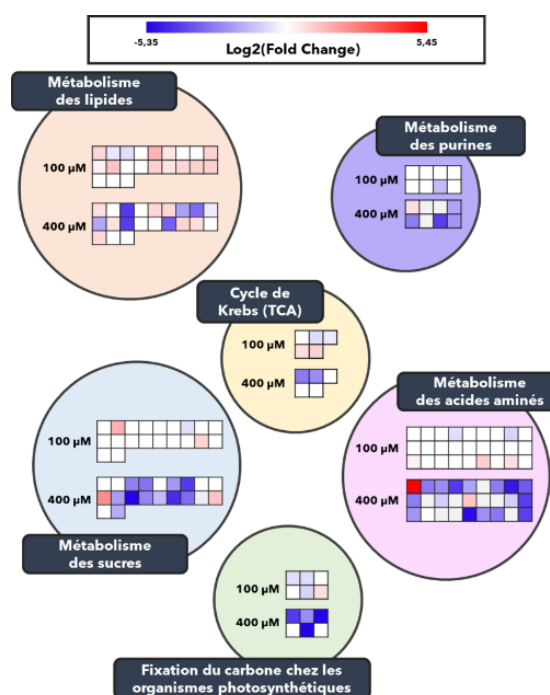


Figure 44 : Principaux processus métaboliques affectés par le Radula chromène.

Différents métabolismes sont présentés, au sein desquels chaque carré correspond à un métabolite détecté et représenté dans tel métabolisme. L'échelle de couleur indique la variation (log₂) d'abondance après 12 h de traitement par 100 ou 400 µM de Radula chromène par rapport au témoin DMSO.

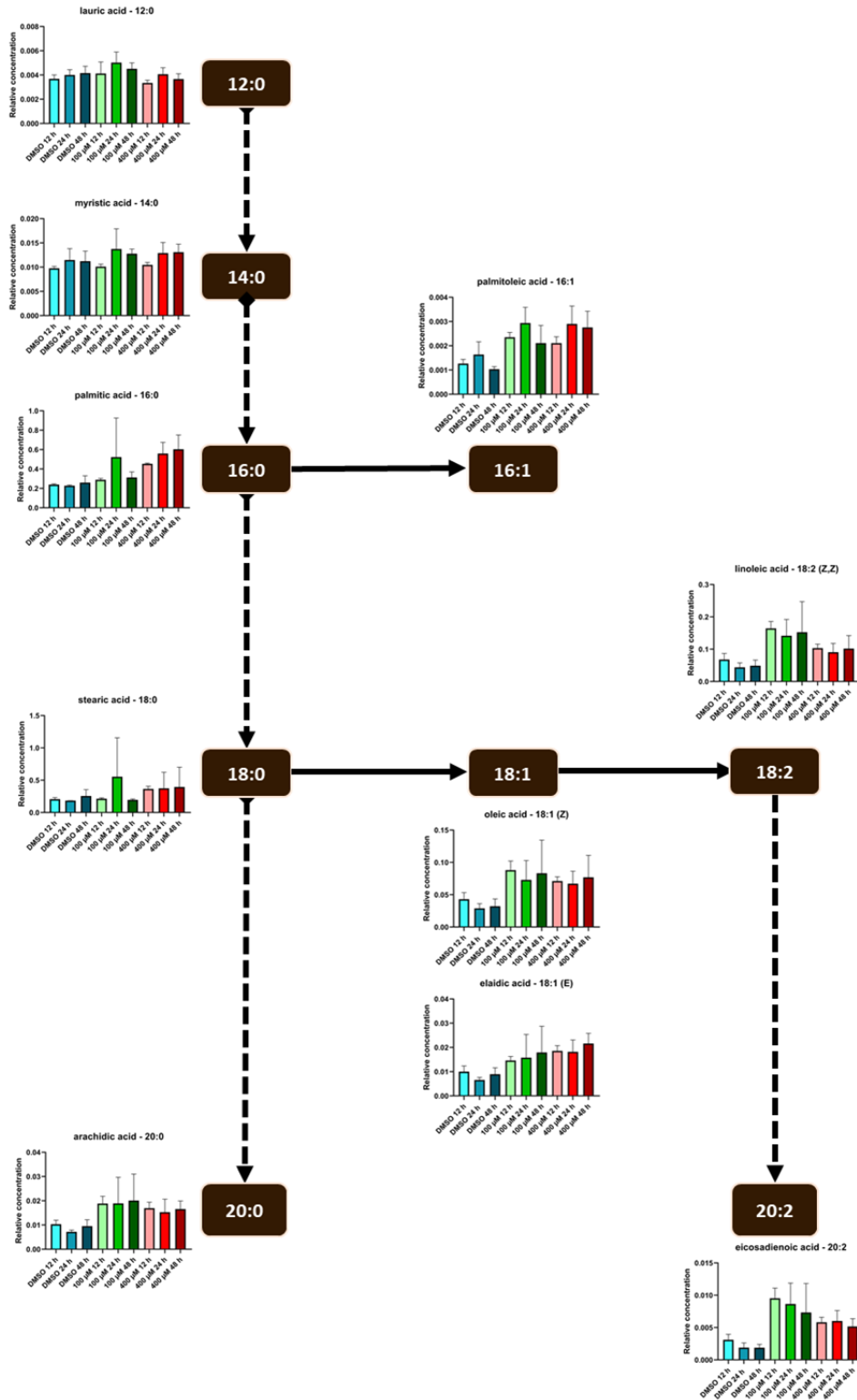


Figure 45: Effet du Radula chromène sur l'abondance des acides gras.

Les différents acides gras identifiés dans cette étude et leur filiation sont représentés. Pour chaque composé, l'abondance relative dans les différentes conditions de traitement est représentée. Les valeurs représentent la moyenne +/- SD des trois réplicats.

IV.1 Effet du Radula chromène sur l'intégrité membranaire

L'analyse métabolomique a mis en évidence une augmentation significative de l'abondance des acides gras (C16 à C20) en réponse à l'application de Radula chromène. Comme le montre la Figure 46, ces modifications apparaissent coordonnées et pourraient être la conséquence d'un mécanisme affectant de façon commune l'ensemble de ces composés. Les acides gras entrent dans la composition de macromolécules comme les triglycérides de réserve ou les lipides constitutifs des membranes biologiques (phosphoglycérolipides, glycolipides). Compte tenu de l'activité phytotoxique du Radula chromène, l'accumulation de ces composés lipidiques pourrait être le signe de perturbations dans le métabolisme des lipides complexes membranaires, affectant les propriétés membranaires. En effet, de nombreux exemples indiquent que les effets induits par les herbicides incluent une perte d'intégrité des membranes, membrane plasmique en particulier, et conduisent à la mort cellulaire. Nos données préliminaires suggéraient que la mort cellulaire induite par le Radula chromène était associée à la perte de fonctionnalité des membranes (voir chapitre II). Nous avons donc recherché si le traitement par le Radula chromène était associé à ce phénomène. La fuite d'électrolytes consécutive à l'application de Radula chromène a donc été mesurée par conductimétrie. Les mesures ont été effectuées dans les conditions initiales de mise en évidence de l'activité phytotoxique de la molécule. Comme le montre la Figure 47, le traitement par 100µM Radula chromène augmente significativement la fuite d'électrolytes mesurée (51,8 % des électrolytes totaux) par comparaison au traitement DMSO (38 ± 6 %). En revanche, l'augmentation de la dose de Radula chromène ne conduit pas à une amplification des fuites d'électrolytes mesurés. De façon intéressante, la fuite d'électrolytes mesurée est comparable que les mesure aient été effectuées à l'obscurité ou à la lumière (Figure 47). Ce résultat suggère que l'induction de la fuite d'électrolyte n'est pas une conséquence directe du mécanisme d'inhibition de la photosynthèse par le Radula chromène décrit au chapitre II. Ceci est corroboré par l'observation que le DCMU qui inhibe également la photosynthèse, par un mécanisme similaire à celui du Radula chromène (voir chapitre II) n'induit pas de fuite d'électrolyte. L'ensemble de ces données établit donc une corrélation entre la perturbation du métabolisme des acides gras et l'altération de l'intégrité membranaire en réponse au traitement par le Radula chromène.

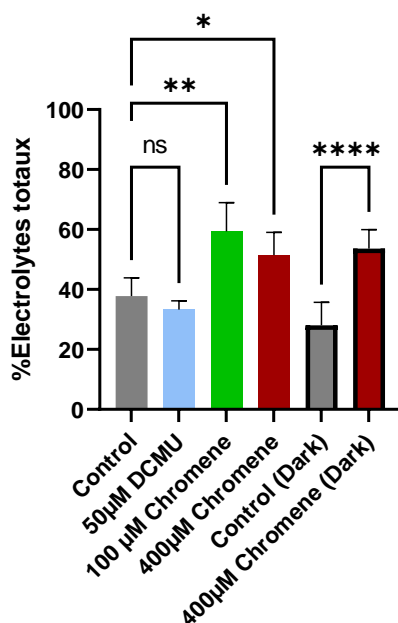


Figure 46 : Effet du Radula chromène sur l'intégrité membranaire

La fuite d'électrolytes a été mesurée, après 8 h de traitement à l'obscurité ou à la lumière, par le Radula chromène (100 µM et 400 µM) ou le DCMU (50 µM). Les données représentent les moyennes ± SD de 3 réplicats biologiques indépendants. Les astérisques indiquent des différences significatives entre le contrôle et les traitements (One-way ANOVA et test post-hoc de Dunn ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 10^{-4}$).

IV.2 Effet du Radula chromène sur l'activité de la xanthine oxydase, impliquée dans le métabolisme des purines.

Comme souligné précédemment, l'acide urique (urate) est le seul composé dont l'abondance est diminuée quelle que soit la nature et la durée de traitement appliquée. Comme le montre la Figure 48, les variations de la teneur en urate sont corrélées à des modifications de la teneur de plusieurs autres métabolites intervenant dans le métabolisme (catabolisme) des purines (adénosine, adénine, xanthine, allantoïne, urée). En particulier, on observe une accumulation d'adénine et une déplétion de l'ensemble des métabolites intervenant en aval dans cette voie métabolique. La biosynthèse de la xanthine à partir de l'hypoxanthine, puis de l'urate à partir de la xanthine, implique une étape d'oxygénation catalysée par la xanthine déshydrogénase. De façon intéressante, l'eupatoriochromène présent dans l'huile essentielle de tournesol et qui partage une structure de type 2,2-diméthylchromène (Figure 49) avec le Radula chromène, joue un rôle significatif dans l'inhibition de la xanthine oxydase (XO), une enzyme structurellement proche de la xanthine déshydrogénase (Liu et al., 2021).

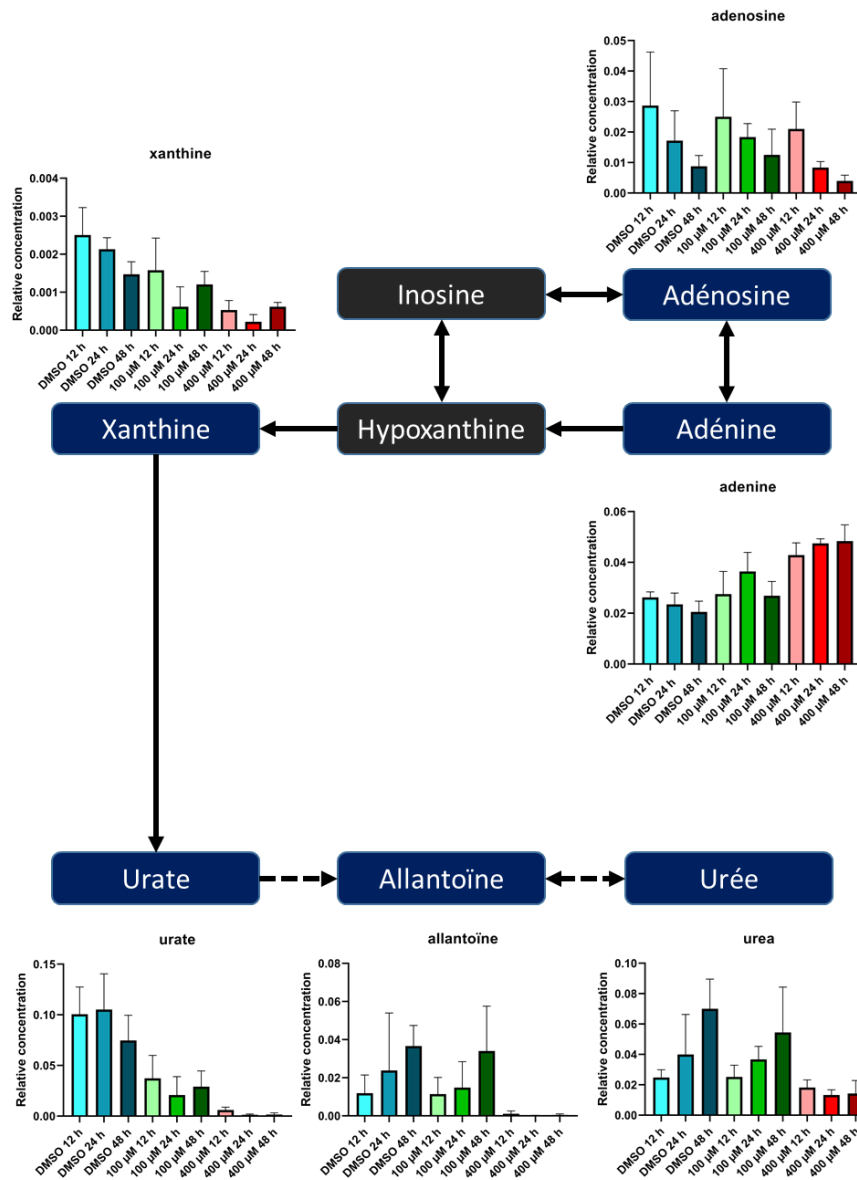


Figure 47: Effet du Radula chromène sur l'abondance des métabolites de la voie de catabolisme des purines.

Pour chaque composé, l'abondance relative dans les différentes conditions de traitement est représentée. Les valeurs représentent la moyenne +/- SD des trois réplicats. Les intermédiaires métaboliques indiqués en noir n'ont pas été détectés dans notre analyse.

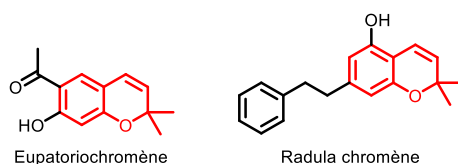


Figure 48 : Structure de l'eupatoriochromène et le Radula chromène.

Le 2,2-diméthylchromène, conservé chez les deux molécules est indiqué en rouge.

L'effet direct du Radula chromène sur l'activité XO a donc été mesurée *in vitro* à partir de XO commerciale. Dans les conditions expérimentales retenues et en l'absence d'inhibiteurs, l'activité XO mesurée est $0,046 \pm 0,008 \mu\text{mol d'urate} \cdot \text{min}^{-1}$ (Figure 50). Cette activité est efficacement réduite (-67%) par la présence de $37,5 \mu\text{M}$ d'allopurinol, un inhibiteur connu de l'activité XO. L'activité XO est également fortement réduite (-95%) en présence de $300 \mu\text{M}$ Radula chromène. En revanche, aucune inhibition n'est observée quand le Radula chromène est utilisé à $150 \mu\text{M}$. Ces résultats indiquent donc que le Radula chromène est un inhibiteur efficace de l'activité XO. L'inhibition directe de l'étape d'oxygénation de la xanthine catalysée par la xanthine déshydrogénase pourrait donc être responsable des modifications observées au niveau des métabolites impliqués dans la voie de catabolisme des purines.

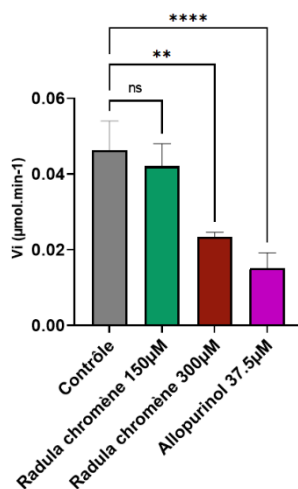


Figure 49 : Effet du Radula chromène sur l'activité Xanthine Oxydase mesurée *in vitro*.

L'activité de la XO est déterminée par mesure de la formation d'urate, en présence de 1% DMSO (contrôle), $37,5 \mu\text{M}$ d'allopurinol, $150 \mu\text{M}$ ou $300 \mu\text{M}$ de Radula chromène. Les données présentées sont les moyennes \pm écart type de 3 mesures indépendantes. Les astérisques indiquent les différences statistiques entre le contrôle et les traitements (One-way ANOVA et test post-hoc de Dunn ; ** $p < 0,01$; **** $p < 10^{-4}$).

V Discussion

L'analyse réalisée avait pour objectif principal d'identifier les modifications du métabolome de plantules induites par le Radula chromène et de rechercher les voies métaboliques pouvant être affectées par ce composé.

La méthodologie employée, qui s'appuie sur les travaux de Fiehn et al (2006) nous a ainsi permis d'identifier et de quantifier 98 métabolites, qui constituent le métabolome dont les variations ont été analysées. Bien que le nombre de métabolites étudiés soit réduit comparé à l'ensemble du métabolome cellulaire, il est cohérent avec les données obtenues dans d'autres études menées sur *A. thaliana* et utilisant cette méthode. En effet, dans le contexte d'études du mode d'action de molécules d'origine naturelle (huile essentielle d'*Origanum vulgare*, thymol), les variations d'abondance de 59 et 89 métabolites ont ainsi pu être étudiées, respectivement (Araniti et al., 2020, 2018). De plus, comme montré par Trenkamp et al. (2009), cette diversité de métabolites est suffisante pour identifier et discriminer les différents modes d'action de différents herbicides. En terme qualitatif, le système de solvants d'extraction utilisé (isopropanol:acétonitrile:eau 3 :3 :2 ; Fiehn et al., 2006), bien adapté à une analyse ultérieure par GC-MS, permet l'extraction d'une large gamme de métabolites primaires, et nous avons ainsi pu quantifier de nombreux sucres, acides organiques ou acides aminés. Il sera intéressant de compléter notre analyse en appliquant des protocoles d'extraction et/ou d'analyse (LC-MS/MS, RMN) plus spécifiques de classes de molécules exclues de notre étude, mais pouvant être d'intérêt dans le cadre de la recherche de modes d'action de la radulanine A et du Radula chromène (molécules fortement apolaires, e.g. lipides complexes ; molécules pro- et antioxydantes ; hormones).

Comme l'a mis en évidence l'analyse décrite au chapitre II, le Radula chromène est un inhibiteur de la phase photochimique de la photosynthèse et bloque le transfert d'électrons en se fixant sur le site Q_B du photosystème II. Parmi les métabolites rapidement affectés par l'application de Radula chromène, on retrouve le glycérate-3-P, produit direct de la carboxylation du ribulose-1,5-bis-P par la RubisCO. L'abondance du glycérate-3-P est rapidement diminuée, et l'amplitude de la déplétion observée d'autant plus marquée que la dose de Radula chromène appliquée est importante, en cohérence avec la diminution de l'inhibition de l'activité de la chaîne de transfert d'électrons chloroplastique. Compte tenu du rôle central de la photosynthèse dans le métabolisme primaire des végétaux, l'effondrement de la synthèse de glycérate-3-P pourrait être, au moins en partie, à l'origine de la diminution drastique de l'abondance de nombreux métabolites observée suite au traitement par le Radula chromène à forte dose. On remarque en particulier une forte corrélation avec la déplétion des produits de la glycolyse (glucose-6-P, fructose-6P, pyruvate) et de plusieurs intermédiaires du

cycle de Krebs (citrate, succinate, fumarate, malate). Le métabolisme des acides aminés est également fortement impacté, une majorité subissant une forte déplétion à la suite du traitement par de fortes doses de Radula chromène. C'est le cas en particulier de la glutamine et du glutamate, premiers produits de l'assimilation du nitrate et dont la synthèse utilise le 2-oxoglutarate, issu du cycle de Krebs. En revanche, on peut noter que si le niveau de valine diminue en réponse au traitement, celui de leucine, ainsi que de son précurseur, le 2-isopropylmalate, augmentent transitoirement après traitement. De façon intéressante, leucine et valine sont issues d'une même voie ayant pour origine le pyruvate, et divergeant au niveau du 3-méthyl-2-oxobutanoate (Binder, 2010). De ce fait, les différences observées pourraient être dues à l'utilisation préférentielle du 3-méthyl-2-oxobutanoate pour la synthèse de la leucine au détriment de la valine. En particulier, l'activité de l'isopropylmalate synthase, première enzyme spécifique de la voie de synthèse de la leucine, a été montrée comme importante pour la régulation des teneurs en leucine et valine (Galili et al., 2016). La signification possible de ces différences en relation avec le mode d'action du Radula chromène est pour l'heure inconnue. Outre la photosynthèse, d'autres voies métaboliques localisées dans le chloroplaste sont également impactées par le traitement. En particulier, la synthèse de shikimate est fortement altérée, en corrélation avec la synthèse de plusieurs acides aminés ayant le shikimate pour précurseur (phénylalanine, tryptophane) (Galili et al., 2016). Cet effet pourrait être lié à la diminution de la photosynthèse, le niveau de glucose, précurseur de la synthèse du shikimate, étant fortement altéré suite au traitement Radula chromène à forte dose. Il pourrait également passer par une inhibition directe de cette voie par le Radula chromène. En effet, plusieurs herbicides d'origine naturelle comme le gallate d'épigallocatechine des inhibiteurs de la shikimate déshydrogénase (Peek et al., 2014). Enfin, le Radula chromène pourrait impacter de façon plus globale la fonctionnalité des chloroplastes. En effet, la perturbation du transfert d'électrons chloroplastique conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui altèrent la structure et les fonctions du chloroplaste (Foyer and Handke, 2022). De nombreuses études rapportent la production massive de ROS en réponse à l'application d'herbicides de synthèse ou de molécules naturelles phytotoxiques. L'accumulation des ROS peut conduire à la peroxydation des lipides, comme observé suite au traitement par le nérolidol, un sesquiterpénoïde d'origine végétale (Landi et al., 2020). Dans le cas de l'acide rosmarinique, la production de ROS est directement associée à l'induction de la mort cellulaire (Araniti et al., 2018). Nos résultats préliminaires suggèrent que le traitement de plantules par la radulanine A pourrait également provoquer une augmentation du niveau de peroxyde d'hydrogène. Si l'accumulation de ROS est confirmée, son rôle dans la phytotoxicité du Radula chromène devra être étudié plus directement. L'application de Radula chromène conduit donc à une réduction importante du métabolisme

primaire. En revanche, peu de différences ont été observées aux différents temps de traitement analysés. Ceci pourrait s'expliquer par la rapide inhibition du fonctionnement du photosystème II, maximale après 6 h (voir chapitre II). Après 12 h de traitement, les modifications du métabolome enregistrées seraient donc essentiellement des conséquences, directes ou indirectes, de l'inhibition de la photosynthèse. Il sera donc important de compléter l'analyse en intégrant des temps de traitement plus courts (1-3 h).

Le traitement des plantes avec la plus faible dose de Radula chromène bioactive apporte en revanche de nouveaux éléments quant aux modes d'action possibles de ce composé. En effet, à cette dose, le Radula chromène induit des modifications plus discrètes, qui peuvent être distinguées d'un effet généralisé sur le métabolisme primaire des plantules. Au niveau des produits de la glycolyse et des intermédiaires du cycle de Krebs, seuls le fumarate et le malate sont affectés négativement par le traitement tandis que pyruvate et succinate s'accumulent. La plagiochrome E, un bibenzyle isolé de *Marchantia polymorpha*, inhibe les activités déshydrogénases du cycle de Krebs chez *Candida albicans* (Wu et al., 2009). De plus, la succinate déshydrogénase est une cible directe du glyphosate *in vitro* (Ugarte, 2014). L'activité de la succinate déshydrogénase, qui synthétise le fumarate à partir du succinate, pourrait donc être une cible directe ou indirecte du Radula chromène.

Une réponse au Radula chromène particulièrement remarquable est l'accumulation de plusieurs acides gras (AG) libres après traitement, à faible ou forte dose. De façon intéressante, seuls les AG à chaîne aliphatique supérieure à 16 carbones sont affectés par le traitement, tandis que l'acide laurique (C12:0) et myristique (C14:0) ne sont pas affectés. De nombreux herbicides ont pour cible le métabolisme lipidique (Beffa et al., 2019). Cependant, à l'inverse du Radula chromène, ces composés conduisent le plus souvent à une réduction des teneurs en AG, via l'inhibition de différentes enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse (acétyl-CoA carboxylase, thioestérases, élongases) (Yang et al., 2010). L'accumulation d'AG pourrait constituer un mécanisme induisant la mort cellulaire, comme observé pour l'acide pélargonique, un AG à courte chaîne (C9), mais également dans des mutants accumulant des AG constitutifs des lipides membranaires (Fukuda et al., 2004; Kunz et al., 2009). En outre, l'application d'AG (C6 à C12) entraîne une diminution de la teneur des lipides complexes composant les membranes plasmiques et chloroplastiques, ainsi que leur peroxydation (Lederer et al., 2004). Nous avons observé une modification des propriétés membranaires, *i.e.* fuite d'électrolytes indicatrice d'une perte d'intégrité, après traitement par le Radula chromène. De façon intéressante, ce mécanisme était indépendant de l'exposition à la lumière. A contrario, le DCMU, ainsi que plusieurs autres herbicides inhibiteurs du photosystème II, n'induisent pas de fuites d'électrolyte, que ce soit à l'obscurité ou à la lumière

(Dayan and Watson, 2011). Nos données suggèrent donc que l'altération de l'intégrité membranaire induite par le Radula chromène est une réponse indépendante de l'inhibition de l'activité photosynthétique et pourrait représenter un autre mode d'action du Radula chromène. L'origine de l'augmentation de la teneur en AG en réponse au Radula chromène est pour l'heure inconnue. D'une part, elle pourrait provenir de l'inhibition de la synthèse de lipides complexes (triglycérides, phosphoglycérolipides, glycolipides). Bien qu'aucun bibenzyle ne soit connu comme inhibiteur de la synthèse des lipides complexes, plusieurs herbicides de la famille des pyridazinones et des thiocarbamates ont été montrés comme inhibiteurs de *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransférases (Rajasekharan and Sastry, 1990, 1987). D'autre part, l'accumulation d'AG pourrait avoir pour origine une dégradation exacerbée des lipides complexes (phospholipides en particulier), via la stimulation d'activités lipases. Pour l'heure, aucun herbicide ou molécule d'origine naturelle n'a été identifié comme agissant directement sur ces enzymes ou augmentant de façon indirecte ces activités. A ce stade, une analyse lipidomique détaillée des différentes classes de lipides complexes et de leur composition apparaît donc nécessaire pour comprendre les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la teneur en AG induite par le Radula chromène.

La voie de catabolisme des purines apparaît également comme une cible possible du Radula chromène. En effet, le traitement par le Radula chromène conduit à une accumulation d'adénine, accompagnée d'une déplétion de xanthine et d'urate, deux produits issus du catabolisme des purines. L'accumulation d'adénine conduit à une forte réduction de la croissance des plantes et a été identifié comme le facteur causal de la toxicité de phytotoxine (coformycine) et d'herbicides de synthèse de structure apparentée (déaminoformycine) (Sabina et al., 2007). La dérégulation de cette voie pourrait donc participer à l'effet phytotoxique du Radula chromène. Cependant, la coformycine et ses analogues ciblent l'AMP désaminase et n'affectent pas le pool de xanthine ou d'uréides (Sabina et al., 2007). La conversion de l'adénine en acide urique fait intervenir la xanthine déshydrogénase (XDH) qui catalyse l'oxygénation de la xanthine en hypoxanthine, puis en acide urique (Wang et al., 2016). Cette enzyme peut être, chez les animaux, rapidement convertie dans sa forme oxydée (xanthine oxydase, XO) (Enroth et al., 2000). Les XO sont connues pour être les cibles de très nombreux composés d'origine naturelle (Mehmood et al., 2019). Par exemple, l'eupatoriochromène, qui présente une structure analogue à celle du Radula chromène, a été montré comme un inhibiteur probable de la XO et pourrait se fixer sur cette enzyme comme le suggère la simulation de docking (Liu et al., 2021). Sur la base de ces données, nous avons montré que le Radula chromène est également un inhibiteur de l'activité XO *in vitro*. Si l'existence de XO *bona fide* chez les plantes reste matière à débat, la forte conservation

structurale entre XDH et XO chez les animaux et XDH chez les animaux et les végétaux, ainsi que la polyvalence des inhibiteurs de XDH et XO (Mehmood et al., 2019), suggèrent que le Radula chromène pourrait inhiber les XDHs végétales. Outre leurs fonctions dans le catabolisme des purines, les XDH/XO sont des sources majeures de ROS (Zarepour et al., 2010). Plusieurs inhibiteurs de XDH/XO, e.g. gallate ou resvératrol, sont de fait connus pour leurs propriétés anti-oxydantes (Mehmood et al., 2019). De façon intéressante, la radulanine K possède également des propriétés anti-oxydantes (Schwartner et al., 1995). Une étude approfondie de l'état rédox cellulaire lors de traitements à faible et forte dose de Radula chromène permettra d'élucider le rôle pro- ou anti-oxydant potentiel de cette molécule *in vivo*.

Notre étude a enfin permis d'identifier plusieurs métabolites marqueurs de la réponse au Radula chromène, comme l'acide urique dont l'abondance est diminuée dans tous les échantillons analysés. Parmi les marqueurs identifiés, le profil de l'arbutine, un dérivé O- β -D-glucoside de l'hydroquinone (Hefner et al., 2002), est particulièrement intéressant. En effet, ce composé n'est pas détecté en l'absence de traitement et s'accumule progressivement après application du Radula chromène. Des procédures de dosage simples, après séparation par HPLC en phase inverse, ont été décrites et pourront être mises en œuvre (Luo et al., 2015). Le dosage de différents marqueurs permettra en particulier de rechercher si et dans quelle mesure l'effet du Radula chromène et de la radulanine A sur le métabolome sont identiques. En utilisant des analogues biologiquement actifs ou inactifs, nous pourrions également valider les marqueurs métaboliques dont les variations sont les plus corrélées à l'effet herbicide. Enfin, dans l'optique du développement d'analogues d'intérêt, ces marqueurs pourront servir de proxys pour établir et comparer l'efficacité herbicide de ces nouvelles molécules.

Conclusion et perspectives

Les contraintes associées au développement de nouveaux herbicides (résistances, impact écologique, durcissement de la réglementation) ont suscité un regain d'intérêt pour la valorisation de molécules d'origine naturelle à activité phytotoxique. En effet, la diversité structurale de ces molécules suggère des cibles et modes d'action divers et possiblement originaux. En outre, leur origine biosourcée, si elle ne prédétermine en rien de leur innocuité, pourrait leur assurer une meilleure métabolisation dans l'environnement et une moindre rémanence. L'évaluation du potentiel de valorisation de ces molécules passe donc par l'élucidation de leur mode d'action.

L'étude menée au cours de cette thèse s'inscrit dans ce contexte. En effet, lorsque mon projet de thèse a été initié, une synthèse totale de la radulanine A, molécule naturellement produite par plusieurs espèces d'hépatiques du genre *Radula*, avait été récemment développée et la phytotoxicité de cette molécule avait été démontrée au laboratoire, sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana* (Nay et al., 2020; Zhang et al., 2019). En revanche, aucune information quant à son mode d'action n'était disponible. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de confirmer le potentiel phytotoxique de la Radulanine A, mais également de plusieurs de ses analogues et précurseurs, et apportent des éléments importants quant aux mécanismes impliqués dans son mode d'action.

Une partie importante de ce projet a été le développement d'une méthode alternative de synthèse totale de la radulanine A dans laquelle le rendement de produit final était amélioré. Ce travail, développé avec B. Lockett-Walters, a abouti à l'établissement d'une voie de synthèse totale plus courte en 5 étapes (Figure 50) et inclut une étape finale d'extension de cycle par photochimie en flux (Lockett-Walters et al., 2022).

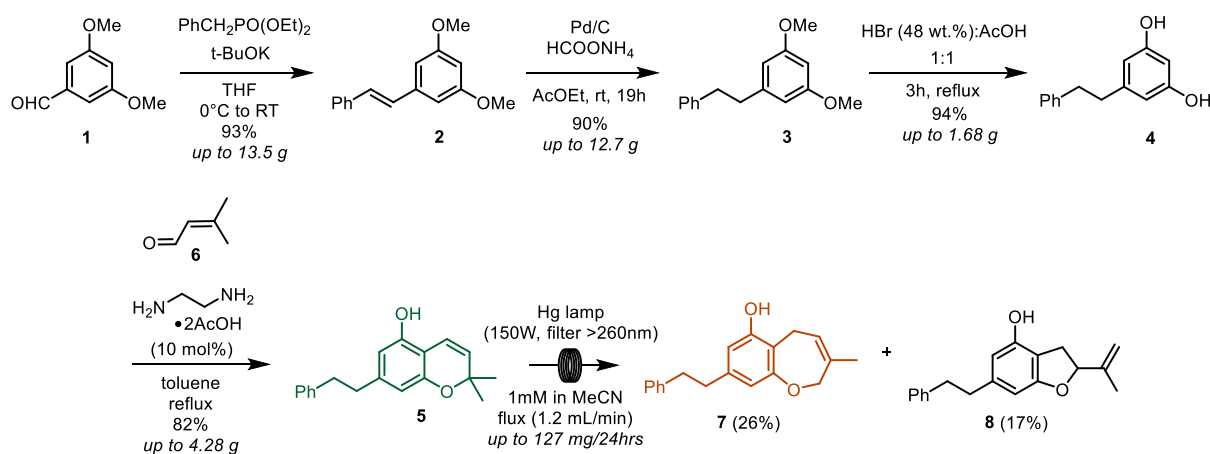


Figure 50 : Récapitulatif des travaux de synthèse totale du Radula chromène et de la radulanine A

Outre le fait que cette méthode fasse intervenir moins d'étapes et présente de bons rendements, les différents intermédiaires de synthèse obtenus sont d'intérêt, puisqu'il s'agit de molécules naturellement présentes chez les hépatiques du genre *Radula* (Asakawa et al., 2020). Leur bioactivité et mode d'action ont donc pu être comparés à ceux de la radulanine A et apporter des éléments importants pour comprendre les bases structurales de sa phytotoxicité. L'originalité de la méthode de synthèse de la radulanine A que nous avons développée consiste en l'utilisation de la photochimie en flux pour réaliser l'étape finale d'extension de cycle. Cette technique est de plus utilisée tant en recherche fondamentale que pour des développements industriels (Rehm, 2020; Sambiagio and Noël, 2020). De façon intéressante, les réactions en flux permettent d'adapter relativement facilement le protocole dans l'optique d'un changement d'échelle de la production. En effet, si une optimisation des conditions de réaction peut s'avérer nécessaire, l'augmentation de la longueur du réacteur et du débit peut être suffisante pour monter en échelle la synthèse (Rehm, 2020). La synthèse d'un dérivé d'aglaïne *via* cycloaddition [3+2] a par exemple été conduite par photochimie en flux, et montée en échelle jusqu'à une production de 1,16 g.h⁻¹ (Yueh et al., 2017). Dans notre stratégie de synthèse de la radulanine A, la réaction d'extension de cycle représente cependant l'étape limitante en termes de rendement. Une optimisation des conditions de réaction pourra être conduite, notamment après mesure du flux de photons au sein du réacteur, pour améliorer le rendement de synthèse avant une montée en échelle. Cette optimisation pourrait passer par l'utilisation de LEDs afin de sélectionner plus finement les longueurs d'onde utilisées.

La stratégie de synthèse totale mise en œuvre a également permis la génération d'un répertoire d'analogues structuraux dont la phytotoxicité a pu être comparée à celle de la

radulanine A. De façon intéressante, le Radula chromène, le précurseur utilisé pour synthétiser la radulanine A par extension de cycle, possède un potentiel phytotoxique équivalent à celui de la radulanine A (Thuillier et al., 2023). La tylimanthine B, produit secondaire de l'extension de cycle, inhibe aussi de façon similaire la photosynthèse. Dans l'ensemble, 8 des 10 bibenzyles phénoliques inclus dans notre étude présentent une activité phytotoxique, en corrélation avec leur capacité d'inhibition de la photosynthèse. De façon intéressante, les hétérocycles présents dans la structure de la tylimanthine B, du Radula chromène et de la radulanine A augmentent la phytotoxicité de ces molécules par rapport à la dihydropinosylvine de structure bibenzyle-phénolique plus classique. L'ensemble de l'étude suggère donc un lien direct entre la structure bibenzyle phénolique, la capacité d'inhibition de la photosynthèse observée et la phytotoxicité des molécules étudiées. Plusieurs études confirment cette hypothèse. Par exemple, l'acide lunularique, un bibenzyle phénolique également présent chez les hépatiques du genre *Radula*, a été montré comme phytotoxique (Nakayama et al., 1996; Pryce, 1971). Deux autres bibenzyles phénoliques naturels produits par l'orchidée *Epidendrum rigidum*, la batasine III et le gigantol, sont également phytotoxiques (Hernández-Romero et al., 2005). De plus, des données suggèrent que l'acide lunularique pourrait inhiber la photosynthèse (Gorham and Coughlan, 1980). L'effet potentiel de la batasine III ou du gigantol sur ce processus est pour l'heure inconnu. En revanche, la pinosylvine et le 4-hydroxybibenzyle ont également une capacité inhibitrice forte vis-à-vis de la photosynthèse (Gorham and Coughlan, 1980). L'ensemble de ces données offre donc les bases pour une étude plus approfondie et systématique de la relation entre structure des bibenzyles phénoliques et phytotoxicité, en utilisant d'autres analogues, naturels ou artificiels, de la radulanine A. Des résultats préliminaires semblent valider cette approche, certaines radulanines testées présentant une activité exacerbée ou diminuée. Notre étude questionne également la convergence des modes d'action de ces différentes molécules. L'étude parallèle des mécanismes d'inhibition de la photosynthèse par la radulanine A et son précurseur, le Radula chromène, suggère qu'ils pourraient partager un même mode d'action, *i.e.* l'inhibition du photosystème II par fixation sur le site Q_B. Des études complémentaires devront être conduites pour rechercher si ce site est également ciblé par les autres bibenzyles phénoliques identifiés, et en particulier ceux dépourvus d'hétérocycle. Enfin, comme mentionné précédemment, les différents inhibiteurs de site Q_B connus présentent des caractéristiques de fixation qui les distinguent (Battaglino et al., 2021). Les résidus impliqués dans la fixation de la radulanine A au sein du site Q_B n'ont pas été déterminés et leur identification par des approches de docking est la prochaine étape à mettre en œuvre, et pourra être étendue aux autres inhibiteurs identifiés dans notre étude.

Bien que l'inhibition de l'activité photosynthétique par la radulanine A et le Radula chromène soit probablement le mode d'action majeur susceptible d'expliquer la phytotoxicité de ces molécules, il nous est apparu important de rechercher d'autres cibles de ces molécules. En effet, de nombreux herbicides et molécules naturelles phytotoxiques ont des modes d'action multiples. C'est par exemple le cas de la sorgoléone dont l'effet inhibiteur de l'HPPD agit en synergie avec l'inhibition du PSII, en induisant une baisse des teneurs en plastoquinone (Dayan et al., 2010; Meazza et al., 2002). L'étude métabolomique réalisée montre l'impact important d'un traitement par le Radula chromène sur le métabolome des plantules. Elle suggère également une origine multiple des changements de teneur des métabolites détectés. Si l'effondrement, rapide et global, de l'activité métabolique en réponse aux plus fortes doses de Radula chromène semble en grande partie être la conséquence de l'inhibition de l'activité photosynthétique, certains effets observés à plus faible concentration pourraient être induits indépendamment de l'effet sur la photosynthèse. En particulier, l'accumulation d'acides gras libres observée suggère une dérégulation de la synthèse/dégradation de ces composants, induite par le Radula chromène. L'origine de cette accumulation d'acides gras est pour l'heure inconnue, et apparaît surprenante au vu des effets des inhibiteurs de la biosynthèse des lipides, induisant un profil de variation des acides gras bien différents (Campe et al., 2018). L'accumulation observée pourrait refléter une dégradation des lipides membranaires, en accord avec la perte d'intégrité membranaire observée en réponse au traitement. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour approfondir cette hypothèse. En particulier, une analyse lipidomique des différentes classes de lipides, réalisée sur des temps précoces et plus tardifs de traitement, permettra de définir l'origine des acides gras libres accumulés. A la différence de l'étude réalisée sur la photosynthèse, seul l'effet du Radula chromène sur le métabolome a été analysé. L'identification de métabolites marqueurs comme l'arbutine permettra de rechercher si la conservation du mode d'action de ces deux molécules peut être étendue au-delà de leur effet sur la photosynthèse. En effet, comme le montre l'exemple du 1,4-cinéole et du 1,8-cinéole, le mode d'action de deux analogues cycliques d'origine naturelle, bien que globalement semblable, peut présenter des différences (Romagni et al., 2000).

Au-delà du mode d'action mis en évidence dans le cadre de cette thèse, d'autres mécanismes peuvent être envisagés. En effet, la radulanine A, ainsi que les radulanines H et L, ont été décrits comme des inhibiteurs de la calmoduline (CaM) (Asakawa et al., 1991). C'est également le cas d'autres bibenzyles phénoliques extraits d'*Epidendrum rigidum* et différentes espèces de *Radula* (Asakawa et al., 2020; Hernández-Romero et al., 2005, 2004). Bien que ces expériences aient été réalisées sur une CaM animale, la forte conservation de cette protéine chez les plantes suggère que ce mode d'action pourrait être fonctionnel également

chez les végétaux (Ranty et al., 2006; Toutenhoofd and Strehler, 2000). Les CaMs, et plus globalement la signalisation calcique, sont impliquées dans l'induction de la mort cellulaire, qu'elle soit induite par des pathogènes ou par des effecteurs (Ren et al., 2021). De façon intéressante, l'erianine, un bibenzyle produit par *Dendrobium chrysotoxum* a récemment été montrée comme induisant la mort de cellules cancéreuses *via* son interaction avec la voie CaM/Ca²⁺ (P. Chen et al., 2020).

L'identification d'un mode d'action de la radulanine A est une étape essentielle dans l'optique de la valorisation de ce composé. Ce projet fait néanmoins apparaître une première limitation potentielle de son utilisation en tant que principe actif d'un nouvel herbicide. En effet, parmi les inhibiteurs naturels connus du PSII, la radulanine A, mais également le Radula chromène, apparaissent comme des inhibiteurs modérément efficaces. Un objectif important de la suite de ce travail sera donc de rechercher ou de concevoir des analogues structuraux présentant une activité accrue. En ce sens, certaines caractéristiques structurales importantes pour la bioactivité de la radulanine A ont d'ores et déjà été identifiées et serviront de base à la poursuite de ce travail. Par ailleurs, une approche de *scaffold hopping*, consistant à modifier le noyau structural d'un composé afin d'en moduler sa bioactivité ou sa toxicité, est une stratégie à considérer dans l'objectif d'obtenir un analogue structural à la phytotoxicité plus importante (Sun et al., 2012). Cette approche a été récemment mise en œuvre pour l'acide ténuazonique et a permis d'améliorer considérablement l'efficacité herbicide des nouveaux analogues obtenus (Wang et al., 2022). Dans ce contexte, la modification de la structure du Radula chromène, dont la synthèse est plus simple et conduit à des rendements de production plus importants sera privilégiée, et sera complétée par l'étude biologique du composé phytotoxique développé. Une seconde question importante est celle du spectre d'action de ces molécules, en vue de leur application sur champ. Des travaux préliminaires réalisés dans le cadre d'un partenariat avec un partenaire industriel suggèrent que le Radula chromène affecterait la croissance à la fois de Mono- et de Dicotylédones modèles. Ces résultats apparaissent cohérents avec le mode d'action principal de cette molécule, qui affecte un mécanisme et une cible fortement conservés chez les plantes. En revanche, le stade de croissance et le mode d'application de la molécule semblent importants pour son efficacité. Ces données confirment des expériences réalisées au laboratoire au cours desquelles la radulanine A était sans effet sur la germination des graines ou lorsqu'appliquée sur des plantes adultes. Une étude plus systématique du spectre d'action en utilisant des adventices représentatives de différentes familles botaniques est envisagée et permettra d'obtenir une vue plus globale du potentiel d'utilisation de ces molécules. Enfin, il sera crucial de déterminer si l'(éco)toxicité potentielle de la radulanine A et du Radula chromène répondent aux normes

en vigueur et permettent d'envisager leur utilisation en champ. Cet aspect n'a pas été abordé au cours du projet de thèse et peu de données sont disponibles, à l'exception d'une étude réalisée sur cellules pulmonaires MRC-5 et dans laquelle la radulanine A présentait une IC₅₀ de 150 µM (Otoguro et al., 2012). Une étude (éco)toxicologique va être initiée à court terme, dont les données seront déterminantes pour la valorisation éventuelle de ces molécules comme herbicide.

Outre leur coût, la prédominance d'utilisation au niveau mondial de certains herbicides comme le glyphosate est associée au développement parallèle de variétés génétiquement modifiées résistantes à ces composés (Green, 2018, 2012). Si le développement de variétés résistantes à la radulanine A n'est pas une perspective à court ou moyen terme, certaines données suggèrent qu'il pourrait être envisagé. En effet, nous avons observé qu'une O-méthylation permet d'annuler la phytotoxicité du Radula chromène, même lorsque le site Q_B est facilement accessible e.g. dans des fragments de membranes thylakoïdales enrichis en PSII. De façon intéressante, une O-méthylation a récemment été montrée comme un mécanisme efficace pour réduire la phytotoxicité d'une autre molécule naturelle, la patuline (Wang et al., 2019). Une O-méthylation du Radula chromène, mais aussi de la radulanine A, est une réaction qui intervient très probablement *in planta*, le chromène O-méthylé et la radulanine A O-méthylée, i.e. radulanine B, ayant été identifiés chez différentes espèces de *Radula* (Asakawa et al., 2020). Bien que des O-méthylestérases aient été récemment caractérisées dans plusieurs espèces d'hépatiques (Liu et al., 2019), celles impliquées dans l'O-méthylation de la radulanine A et le Radula chromène *in vivo* n'ont pas été identifiées à ce jour. L'obtention de la séquence complète de plusieurs génomes d'hépatiques pourrait être utile dans la recherche de ces enzymes (Bowman et al., 2017; Zhang et al., 2020) . L'identification de ces enzymes et leur expression dans des plantes d'intérêt agronomique pourrait ainsi s'avérer une stratégie efficace pour entraîner une O-méthylation de la radulanine A et du Radula chromène et leur détoxification *in planta*, conférant ainsi une résistance à ces composés.

Au-delà de la valorisation de l'effet phytotoxique de la radulanine A et du Radula chromène, la fonction biologique de ces molécules, et leur éventuel rôle écologique, chez *Radula* sont à l'heure actuelle inconnus. En particulier, en relation avec leur activité phytotoxique, la question de leur implication dans des processus allélopathiques reste ouverte. Dans cette éventualité, ces composés, devraient être sécrétés dans l'environnement et lixiviés, ou libérés de thalles sénescents, pour atteindre les espèces cibles. La sécrétion de composés produits et accumulés dans les oléocorps n'a pas été rapportée à ce jour, ce qui suggère que le rôle allélopathique de ces molécules serait limité. De plus, certains composés des oléocorps

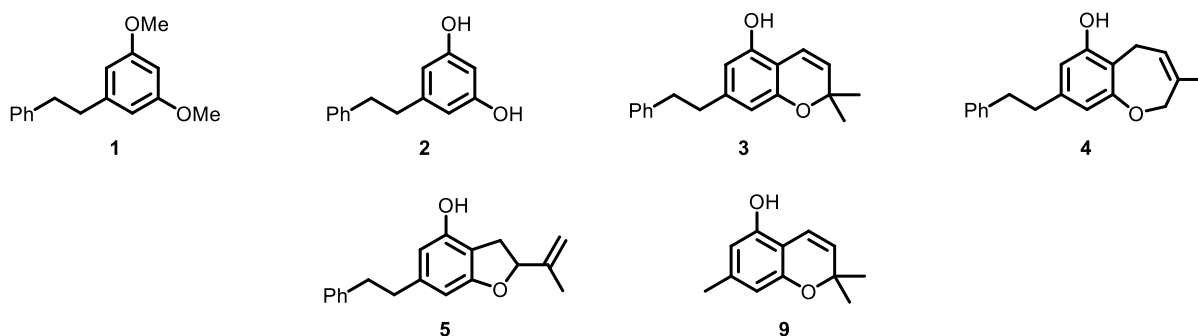
sont autotoxiques et nécessitent donc d'être accumulés dans des structures isolées (Kanazawa et al., 2020). C'est peut-être le cas également du Radula chromène dont nous avons observé la toxicité vis-à-vis de *Marchantia polymorpha* (Annexe 3). A l'image d'autres bibenzyles, la radulanine A et le Radula chromène pourraient également participer à la défense des hépatiques vis-à-vis d'agresseurs ou de pathogènes (Chong et al., 2009). En effet, les oléocorps ont été démontrés comme indispensables à la défense contre les herbivores, et la radulanine A, ainsi que d'autres métabolites spécialisés produits dans ces structures, pourrait participer à cet effet (Kanazawa et al., 2020; Romani et al., 2020). De même, il a été montré que la manipulation génétique de la production de composés bibenzyliques modifie l'activité anti-fongique chez *Plagiochasma appendiculatum* (Wu et al., 2018). Le développement des recherches utilisant les hépatiques comme modèle permettra certainement d'éclairer prochainement les fonctions associées aux composés produits par les oléocorps, en particulier dans le cadre de la réponse aux facteurs de l'environnement.

Matériel et Méthodes

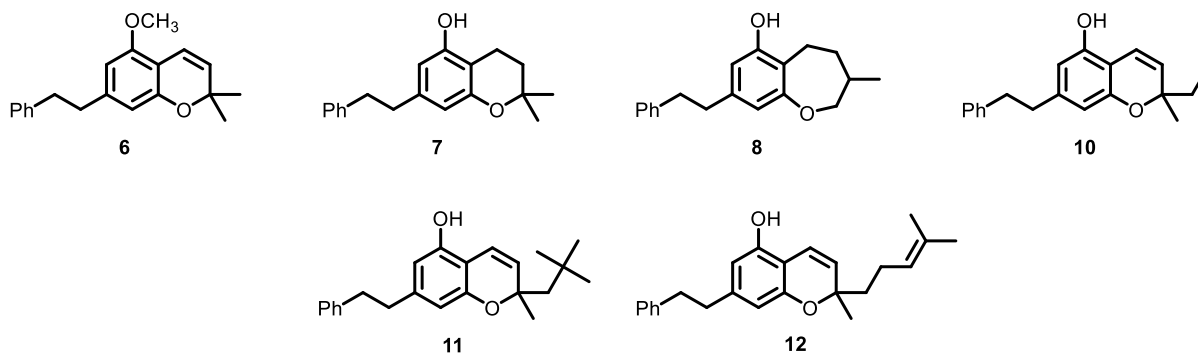
I Synthèse totale de la radulanine A et synthèse d'analogues structuraux

Les protocoles dédiés à la synthèse totale de la radulanine A et ses analogues peuvent être retrouvés en Supporting Information des deux articles publiés comme suit (numérotation du Chapitre II utilisée) :

- Synthèse des composés **1** à **5** et du composé **9**: Chapitre I – Supplementary Material p. 74



- Synthèse des composés **6** à **8** et des composés **10** à **12** : Chapitre II – Supplementary Material p. 136



II Matériel végétal

L'ensemble des expériences a été réalisé sur *Arabidopsis thaliana* écotype Columbia 0 (Col-0). Les graines utilisées proviennent de plantes cultivées en chambre de culture (21°C ; photopériode 16h lumière/8h obscurité ; intensité lumineuse 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sur terreau. Les siliques sont récoltées à maturité et séchées à température ambiante, puis les graines sont collectées et stockées à -20°C.

III Stérilisation des graines

Environ 200 μL de graines d'*Arabidopsis thaliana* sont stérilisées dans 1 mL de solution éthanol:Javel (4:1). La solution de stérilisation est obtenue par dissolution d'une pastille de Javel dans 40 mL d'eau distillé. Après incubation des graines sous agitation constante pendant 15 min, la solution est renouvelée et l'incubation poursuivie pour 15 min d'agitation supplémentaire. Les graines sont ensuite rincées 5 fois à l'éthanol pur et laissées sécher sous hotte stérile pendant la nuit, avant d'être stockées à 4°C.

IV Culture et traitement de plantules

Pour l'évaluation de la phytotoxicité et la mesure des paramètres photosynthétiques, les cultures ont été effectuées en microplaque 96-puits blanches (Zhang et al., 2019). Les graines stérilisées (10-15 par puits) sont semées en présence de 150 μL d'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite stratifiées 3 jours, à 4 °C et à l'obscurité, pour lever la dormance primaire. Les microplaques sont placées en enceinte de culture, à 21 °C, sous lumière continue (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Après 9 à 13 jours de culture et développement des feuilles cotylédonaires, le milieu est retiré et remplacé par 200 μL d'eau distillée stérile supplémentée des substances à tester.

Les différentes molécules utilisées sont dissoutes dans le DMSO (solution mère à 40 mM) et diluées extemporanément afin que la concentration de DMSO dans le milieu de traitement n'excède pas 1% du volume final. Pour chaque série d'expériences, un traitement par supplémentation du milieu avec 1% DMSO est utilisé comme témoin.

Pour la génération de matériel destiné à l'analyse métabolomique et à la mesure de fuite d'électrolytes, les plantules ont été cultivées sur des grilles métalliques (5 par boîte) stériles, disposées à la surface de boîtes de Pétri (\varnothing 14 cm) contenant un milieu Murashige et Skoog (dilué 2 fois) gélosé. Trente mg de graines d'*Arabidopsis thaliana* stérile en suspension dans 600 μL d'agar 0,1 % sont déposées sur chaque grille. Les semis sont stratifiés à 4 °C et à l'obscurité pendant 3 jours pour éliminer la dormance primaire des graines. Les boîtes sont ensuite dans une chambre de culture (22 °C ; photopériode 16h lumière/8h obscurité ; intensité lumineuse 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Après 3 jours de culture, les plantules sont traitées par immersion en présence des différents composés testés. Les grilles sont transférées dans des boîtes de Pétri (\varnothing 5,5 cm) contenant 12 mL d'eau distillée supplémentée du composé testé (DMSO 1% ou Radula chromène à 100 ou 400 μM). Les plantules sont alors placées dans une enceinte de culture, à 21 °C, sous lumière continue (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Pour toutes les conditions, la concentration finale de DMSO représente $\leq 1\%$ du volume total du milieu. Après 12, 24 ou 48h de traitement, les plantules de chaque grille sont collectées, rapidement séchées, congelées

à l'azote liquide et stockées à -80°C. Pour chaque condition, trois réplicats ont été générés, correspondant à trois cycles de culture et de traitement indépendants.

V Mesure de la fluorescence des chlorophylles.

La fluorescence des chlorophylles des plantules est directement mesurée dans la microplaque 96-puits à l'aide d'un système d'imagerie de fluorescence (Speedzen, JBeamBio, France). Après traitement, les plantules sont placées dans le détecteur et adaptées à l'obscurité pendant 10 min avant chaque mesure. L'intensité de la lumière infrarouge (Left Far Red (I.R.)) est réglée à $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pour le paramètre « Actinic I ». Cette lumière infrarouge est utilisée pour la mise au point de l'objectif du système d'imagerie. Pour la mesure de la fluorescence des chlorophylles, des impulsions de lumière sont produites par des LEDs bleues. Une lumière actinique à $120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et des impulsions saturantes à $2600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sont générées par des LEDs vertes. La séquence d'activation de ces différents éclairagements et des mesures suit la séquence :

1msH1msD5sD5msE250msFH300μSD3msD18msD150msD4(500msD)4sD8sD3(15sD)1.2msG3ms/H100μSD0.6msG/6msZ8ms{10ms,20,2s,Z}10(500msZ)5msE250msFH300μSD3msD10msZ10(15sZ15sZ15sZ15sH100μSD5msE250msFH300μSD3msD10msZ)1msH

Chaque temps correspond à l'attente entre deux commandes. **G-H** active ou désactive la lumière actinique à $120 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivement. **E-F** active ou désactive la lumière actinique forte ($2600 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). **D** active une impulsion de lumière bleue permettant la détection de la fluorescence. **Z** représente la séquence entre / (« /H100μSD0.6msG/ »). Les nombres en gras indiquent le nombre de répétitions de la séquence incluse dans les parenthèses. La séquence entre accolades correspond à une horloge exponentielle, qui permet de réguler les intervalles de temps entre différentes séquences **Z**. Elle permet de créer une séquence répétitive de commandes avec des intervalles de temps de plus en plus espacés.

Le rendement quantique maximal du PSII est calculé comme $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, où F_o et F_m sont les émissions de fluorescence mesurées avant et à la fin d'une impulsion saturante de 200 ms, respectivement. L'efficacité du transport d'électrons Φ_{PSII} a été calculée comme $(F_m' - F)/F_m'$, F étant la fluorescence à l'état d'équilibre à la lumière et F_m' l'émission de fluorescence mesurée à la fin d'une impulsion saturante de 200 ms, pour des plantules adaptées à la lumière. L'extinction non-photochimique (NPQ) a été calculée comme $(F_m - F_m')/F_m'$ (Maxwell and Johnson, 2000). Chaque valeur correspond à la moyenne de six réplicats \pm écart-type.

VI Mesure de l'état rédox du photosystème I (P700).

L'état rédox de P700 est déterminé sur des plantules récoltées après 15 min de traitement par changements d'absorption transitoires, à l'aide d'un spectrophotomètre de type Joliot (JTS-10, Biologic, Grenoble, France). Pour chaque réplicat, les plantules issues de 4 puits (*cf* Matériel et méthodes – IV) ont été utilisées et réparties sur une lamelle de verre circulaire (\varnothing 0,5 cm). L'excédent de milieu éventuel est retiré de la lamelle à l'aide d'une pipette. L'échantillon est recouvert d'une deuxième lamelle de verre circulaire, puis inséré dans le spectrophotomètre, sur la trajectoire de la lumière, pour effectuer la mesure. L'appareil emploie une lumière actinique générée par une couronne de LEDs rouge ($\lambda = 619 \text{ nm}$; $26 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et une lumière de détection blanche filtrée. Dans le programme associé à l'appareil, il est nécessaire de sélectionner certains paramètres :

- Sélectionner $26 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'intensité de la couronne de LEDs (notée « Red Ring » sur le logiciel).
- Pour la lumière de détection (notée « Detection (D) » sur le logiciel), sélectionner la source 4 et une illumination de 5,4.
- La séquence d'activation de ces lumières et des mesures a été développée comme suit :

1ms**G15**(100msH200 μ sD50 μ s**G**)1ms**H**E3msF350 μ sD50 μ s**E4**(3msF350 μ sD50 μ s**E**)3msF350 μ sD**3**(1msD**3**(2msD**3**(3msD**5**msD10msD12msD20msD**15**(100msD)1ms**G10**(100msH200 μ sD50 μ s**G**)

Chaque temps correspond à l'attente entre deux commandes. **G-H** active ou désactive la lumière actinique à $26 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivement. **E-F** active ou désactive la lumière actinique forte ($5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). **D** active une impulsion de lumière blanche permettant la détection d'un signal à $705 \pm 6 \text{ nm}$. Les nombres en gras indiquent le nombre de répétitions de la séquence incluse dans les parenthèses.

Après insertion de l'échantillon sur la trajectoire de la lumière actinique, le JTS-10 est recouvert d'un drap noir et l'échantillon est laissé exposé à la lumière actinique pendant 1 minute, avant le lancement de la séquence. Les données sont normalisées par rapport à la première valeur mesurée. Ensuite, le pourcentage en P700 non-oxydé est calculé comme $I_{\text{max}}/(I_{\text{max}}-I_{\text{min}})$, où I_{max} et I_{min} correspondent à l'intensité maximale et minimale mesurée, respectivement. Chaque expérience correspond à la moyenne de trois réplicats \pm écart-type.

VII Mesure de la thermoluminescence

Les courbes de thermoluminescence ont été mesurées avec un appareil construit en laboratoire, décrit dans De Causmaecker et al. (De Causmaecker, 2017). Les échantillons biologiques utilisés ont été refroidis à -20 °C et excités avec un flash laser saturant à rotation unique (Continuum Minilite II, fréquence doublée à 532 nm, 5 ns FWHM). Les échantillons sont ensuite incubés dans l'appareil à l'obscurité à -20 °C pendant 30 s, avant d'être chauffés de -20 °C à 80 °C à 1 °C.s⁻¹. Lorsqu'elles ont été utilisées, les plantules d'*Arabidopsis* ont été incubées après traitement dans l'obscurité (*cf* Matériels et méthodes - IV) à température ambiante pendant le temps souhaité avant les mesures. Des fragments de membrane d'épinard enrichis en PSII, préparés selon Berthold et al. ont été dilués à une concentration finale de chlorophylle de 10 µg.mL⁻¹ dans un tampon de resuspension glacé (50 mM MES-NaOH pH 6,5, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 1,2 M bêtaïne, 20 % w/v glycérol) (Berthold et al., 1981). Les fragments de membrane d'épinards enrichis en PSII ont été pré-éclairés pendant 10 s, puis conservés dans l'obscurité sur de la glace pendant au moins une heure avant la mesure. Les échantillons ont été adaptés à l'obscurité puis traités soit juste avant la mesure, soit pendant une durée de traitement spécifié.

VIII Analyse des métabolites primaires par GC-MS

VIII.1 Extraction des métabolites primaires

L'extraction est réalisée sur les échantillons traités sur grilles (*cf* Matériel et méthodes - IV), après lyophilisation, selon le protocole développé par la plate-forme de métabolomique de l'Institut des Science des Plantes-Paris Saclay (IPS2). 4 à 5 mg de lyophilisat sont remis en suspension dans 1 mL de solvant eau:acétonitrile:isopropanol (2:3:3) refroidi à -20 °C et contenant 4 µg/mL de ribitol. Le ribitol est utilisé comme standard interne pour la quantification des différents métabolites. En parallèle des échantillons sans matériel biologique sont générés, qui constitueront les témoins « blancs » de l'analyse. Les métabolites sont extraits par agitation (10 min, 1500 rpm, 4°C), à l'aide de billes de métal dans un Thermomixer (Eppendorf). Les échantillons sont centrifugés (13500 rpm, 10 min, 4°C) et 100 µL de surnageant sont prélevés et séchés au Speed-Vac pendant 4 h, à 35 °C. Les extraits secs sont stockés à -80°C avant dérivation.

VIII.2 Dérivation des échantillons et analyse GC-MS

La méthode de dérivation et d'analyse utilisée suit les méthodes décrites par Fiehn et al. dans le guide d'utilisation pour « Agilent G1676AA Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library » (Fiehn, 2006; Fiehn et al., 2008). Avant dérivation, les échantillons stockés à -80°C

sont ramenés à température ambiante pendant 15 min, puis séchés au Speed-Vac pendant 1h30 à 35 °C. Les échantillons sont remis en solution dans 10 µL de methoxyamine (20mg/mL dans la pyridine) et agités pendant 1h30 à 30 °C dans un thermomixer (Eppendorf). A l'issue de l'incubation, 90 µL de N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (MSTFA) (1-270590-200, REGIS TECHNOLOGIES) sont ajoutés et les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 30 min. Après refroidissement, 80 µL d'échantillon sont transférés en fiole d'injection (Agilent).

Les métabolites sont séparés par chromatographie en phase gazeuse et analysés par spectrométrie de masse sur un chromatographe Agilent 7890B couplé à un spectromètre de masse à *impact électronique* (modèle Agilent 5977A). La colonne utilisée est un modèle Rxi-5SilMS de Restek (30 m avec 10 m de colonne de garde intégrée – référence : 13623-127). Une injection en split (ratio 1:30) a été systématiquement menée afin de quantifier les composés saturant en splitless. Quatre heures après dérivation, 1 µL de chaque échantillon est injecté en splitless. Le gradient de température du four au cours de l'analyse débute à 60 °C pendant 1 min puis augmente de 10 °C/min jusqu'à 325 °C pendant 10 min. Le flux d'hélium est constant (1,1 mL/min) et les températures des composants sont les suivantes : injecteur, 250 °C ; ligne de transfert : 290 °C ; source : 230 °C ; quadripôle : 150 °C. Le quadripôle est activé avec un temps de délai du solvant de 5,9 min, scannant les composés de 50 à 600 u. Un mélange d'acides gras (C8, C9, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30) est injecté entre les analyses des échantillons pour calibrer de manière externe le temps de rétention.

VIII.3 Traitement des données et quantification

Les données brutes acquises sous format Agilent sont traitées avec le logiciel AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>). L'identification des métabolites est effectuée par référence à la base de données « Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library » (version Juin 2008). Cette base de données est adossée à la méthode d'analyse utilisée et regroupe les spectres de masse (EI) et les temps de rétention d'environ 700 métabolites. Associée aux macros de la méthode, elle a été utilisée pour l'identification des composés associés aux pics du chromatogramme et leur quantification grâce au logiciel MassHunter Quantitative Analysis (Agilent, <https://www.agilent.com/en/products/software-informatics/masshunter-suite/masshunter-quantitative-analysis>). L'intégration des pics a également été vérifiée manuellement pour chaque composé. Les limites de détection et de quantification de l'aire d'un pic sont de 2 000 et 6 000, respectivement. De plus, un composé est considéré comme contaminant et exclu si son aire dans l'échantillon « blanc » est supérieure à la moitié de celle détectée dans l'échantillon où elle est la plus élevée. Ces données ont servi à créer les

tableaux présentés en Annexe 4. La teneur de chaque métabolite y est présentée, normalisée par rapport à la teneur en ribitol et à la masse de l'échantillon biologique lyophilisé. Les teneurs obtenues sont exprimées en unités arbitraires (détermination semi-quantitative).

VIII.4 Analyses de données

Les métabolites détectés ont été rentrés sur KEGG Mapper afin de déterminer les voies métaboliques incluant les métabolites de notre analyse (voir Tableau 6) (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/search.html> ; « search mode » : ath, pour *A. thaliana*).

Les métabolites ont été classés selon leur structure chimique dans le Tableau 5 à partir d'une classification effectuée via le logiciel ClassyFire (<http://classyfire.wishartlab.com>). Les codes SMILES correspondants aux métabolites détectés ont été utilisés.

Afin de comparer l'abondance d'un métabolite au sein pour une condition de traitement (durée et concentration) avec celle d'une condition contrôle pour une même durée de traitement, la variation d'abondance d'un métabolite a été exprimée selon la formule :

$$x_{\text{variation}} = \log_2\left(\frac{\bar{X}_{\text{tableau}}^{\text{traitement}}}{\bar{X}_{\text{tableau}}^{\text{contrôle}}}\right)$$

Avec $x_{\text{variation}}$ la variation en \log_2 entre $\bar{X}_{\text{tableau}}^{\text{traitement}}$ la moyenne des échantillons traités à une concentration et un temps spécifiques, et $\bar{X}_{\text{tableau}}^{\text{contrôle}}$ la moyenne des échantillons contrôle correspondants.

Afin de comparer la variation des métabolites entre les différentes conditions, les concentrations dans le tableau Excel généré par les macros (cf Matériel et méthodes – VIII.3) sont centrés sur la moyenne des différentes conditions pour un métabolite en utilisant MeV 4.9.0 (<https://webmev.tm4.org/about>).

VIII.5 Analyses statistiques

Afin d'évaluer la pertinence de l'analyse, nous avons observé l'impact du traitement en fonction de sa durée et de la concentration en Radula chromène grâce à une analyse en composante principale (PCA). Cette analyse a été effectuée via le logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego USA) par une méthode standardisée basée sur une analyse parallèle pour la sélection des composantes principales (nombre de simulations : 1000, niveau : 95%).

Un traitement statistique ANOVA à deux facteurs ($p < 0,05$; basé sur permutation ; nombre de permutation : 1000 ; corrélation de Pearson) a été employé pour projeter sur des cartes de chaleur les métabolites variant significativement en fonction du temps et de la concentration du traitement. Les métabolites sont regroupés par cluster en fonction de leur profil de variation (liaison moyenne). Pour ces cartes de chaleur, les données ont été transformées selon une normalisation standard :

$$x_{transformé} = \frac{x_{tableau} - \bar{X}}{\sigma}$$

Avec $x_{transformé}$ l'expression de l'abondance pour les heatmaps, $x_{tableau}$ l'abondance d'un métabolite normalisé par le ribitol et la masse de l'échantillon biologiques tel que présenté Annexe 4, \bar{X} la moyenne et σ l'écart-type des abondances mesurées dans toutes les conditions pour un métabolite.

Un test de t-Student ($p < 0,05$; basé sur permutation ; nombre de permutation : 100) a été effectué pour définir les métabolites variant de manière significative en fonction de la concentration de Radula chromène par rapport aux conditions de contrôle (1% DMSO) pour une durée de traitement spécifique.

IX Mesures de fuite d'électrolytes

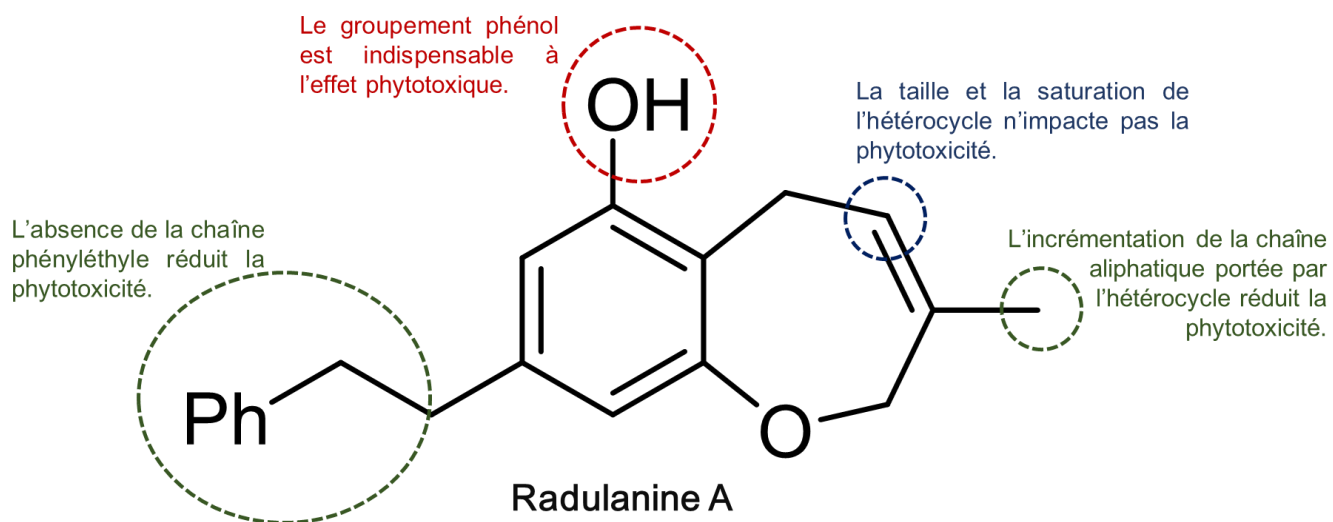
Les plantules sont obtenues comme décrit plus haut (*cf* Matériel et méthodes - IV). Après 3 jours de culture, l'ensemble des plantules d'une grille sont rincées et est placées dans un tube Falcon de 15 mL contenant 5 mL d'eau Ultrapure. La conductivité du milieu est mesurée grâce à un conductimètre Jenway 4010 (Dunmow, UK). Pour chaque mesure, la sonde est plongée dans la solution jusqu'à stabilisation de la mesure. A l'issue de l'expérience, le milieu contenant les plantules est chauffé à 90°C au bain-marie pendant 30 min pour extraire l'ensemble des électrolytes. Après refroidissement, la conductivité est mesurée et l'ensemble des valeurs est exprimé en pourcentage de cette valeur (conductivité maximale). Chaque valeur présentée correspond à la moyenne de six réplicats \pm écart-type. Les différences significatives entre le contrôle et les conditions de traitements ont été déterminées avec le logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego USA) en utilisant une ANOVA à un facteur suivie du test post-hoc de Dunn.

X Mesure de l'activité xanthine oxydase

L'activité xanthine oxydase (XO) est déterminée selon la méthode décrite par Marcocci et al. (1994), par mesure de la formation d'acide urique. Brièvement, la réaction est mesurée à température ambiante, dans un volume final de 1 mL de milieu réactionnel (50 mM KH_2PO_4 pH 7,5, 120 μM xanthine, 0,04 unités XO microbienne (Sigma-Aldrich, X2252)). La solution mère de xanthine (1 mM) est obtenue par dissolution de la xanthine dans un minimum de volume de 1N NaOH, complété par de l'eau Ultrapure. La réaction est initiée par l'ajout de xanthine. L'absorbance de l'acide urique ($\epsilon_{290\text{nm}}=12400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) formé est mesurée durant 1 min par spectrophotométrie à 290 nm. Lorsqu'ils sont utilisés, les inhibiteurs (37,5 μM allopurinol, 150-300 μM Radula chromène) sont mis en présence de la XO pendant 1 min avant ajout du substrat. Les résultats correspondent à la moyenne de trois réplicats \pm écart-type. Les différences significatives entre le contrôle et les conditions de traitements ont été déterminées avec le logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego USA) en utilisant une ANOVA à un facteur suivie du test post-hoc de Dunn.

Annexes

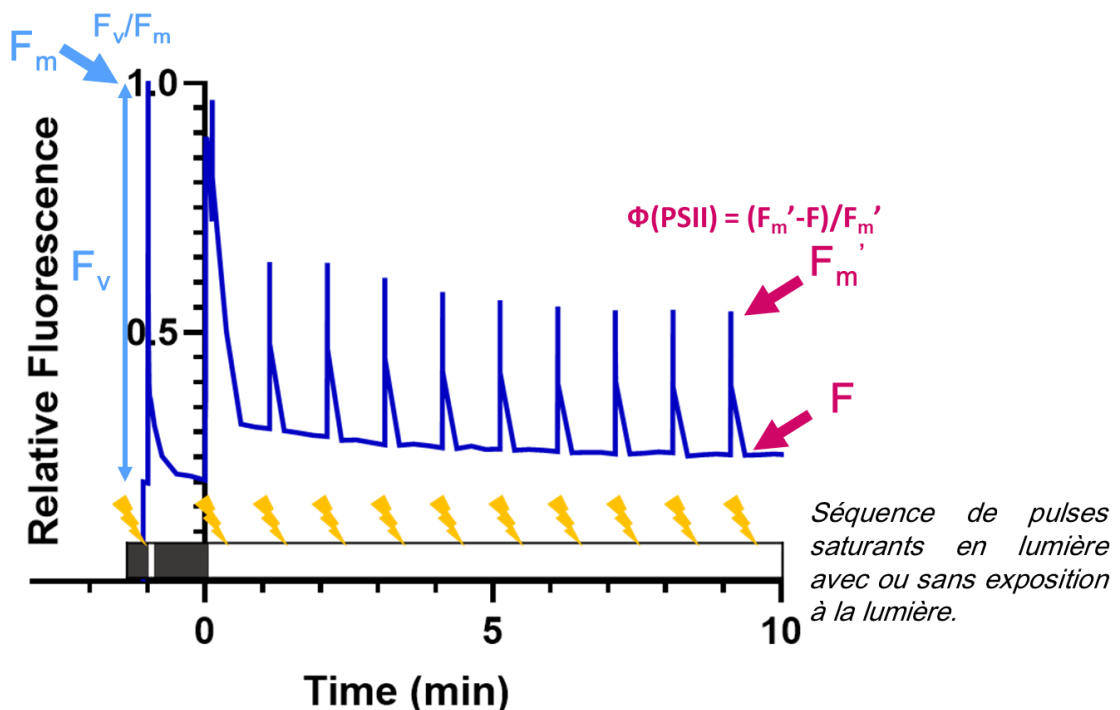
Annexe 1. Relation entre la structure de la radulanine A et sa phytotoxicité



Annexe 2. Information sur les techniques utilisées pour l'étude de l'impact des molécules phytotoxiques sur la photosynthèse du chapitre II

- Etude de la chaîne de transfert d'électron photosynthétique par mesure de la fluorescence des chlorophylles

Les photosystèmes sont des structures contenant des dimères de chlorophylles *a* photoactivables (voir Introduction Générale – III.1). L'énergie lumineuse absorbée par ces photosystèmes est convertie sous 3 formes. Premièrement, une partie de cette énergie est convertie en photochimie, correspondant aux électrons générés et transférés au travers de la chaîne de transfert d'électron photosynthétique. Une faible partie de l'énergie lumineuse est également dissipée sous forme de chaleur par changement de conformation des antennes collectrices de lumières (LHCs). La grande majorité de l'énergie lumineuse absorbée est quant à elle converti en fluorescence par les chlorophylles. En mesurant cette fluorescence des chlorophylles selon une séquence de pulses saturant en lumière sur des plantules exposés ou non à la lumière telle que décrite dans la section Matériel et Méthodes, il est possible d'obtenir des informations sur les autres formes de conversion de l'énergie lumineuse, *i.e.* sur la photochimie.

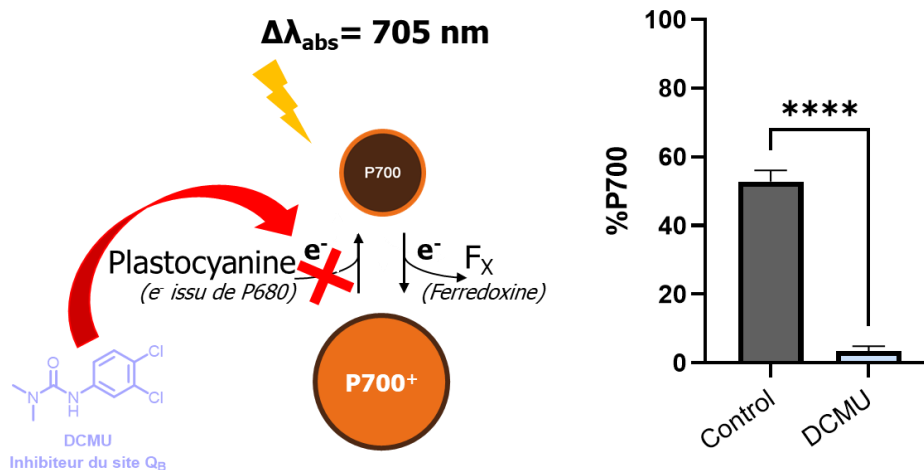


Ainsi, via cette mesure, deux paramètres ont été calculés et utilisés pour étudier la photochimie des plantules traitées : F_v/F_m correspondant au rendement quantique du P680 (au ratio de l'énergie lumineuse absorbée étant convertie en électron par P680 par rapport au total

de l'énergie lumineuse absorbée), et $\Phi(\text{PSII})$ correspondant à l'efficacité générale de la chaîne de transfert d'électron de la photosynthèse.

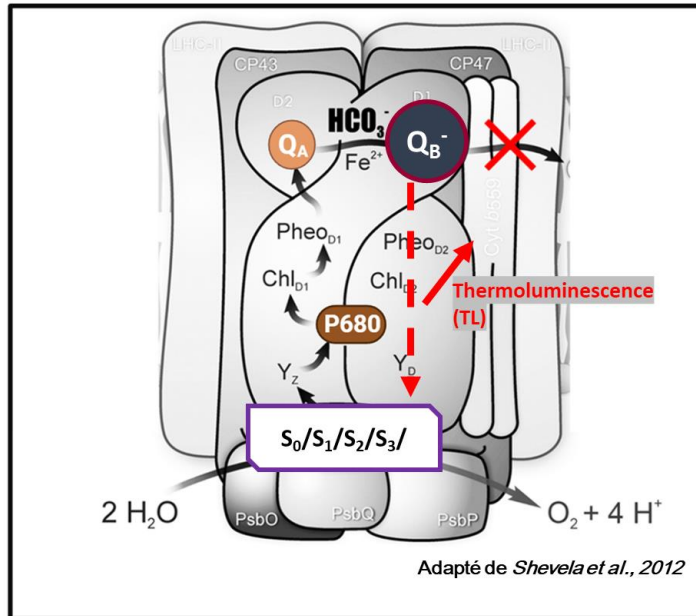
- **Etude de l'état red/ox du P700 du photosystème I par mesure d'absorption**

Le dimère de chlorophylle *a* photoactivable présent au sein du photosystème I est nommé P700. Selon l'état d'oxydation de ce dernier, son absorption pour une longueur d'onde de 705 nm varie. Ainsi, par mesure de l'absorption à cette longueur d'onde sur des échantillons traités ou non, il est possible de déterminer l'impact du traitement sur l'état red/ox du pool de P700, *i.e.* sur l'apport en électron jusqu'au photosystème I par les structures en amont de la chaîne de transfert d'électron. Dans le cas d'une utilisation d'un inhibiteur du site Q_B tel que le DCMU, l'apport en électron est bloqué en amont du P700. Ainsi, le pourcentage de P700 réduit (%P700) diminue.



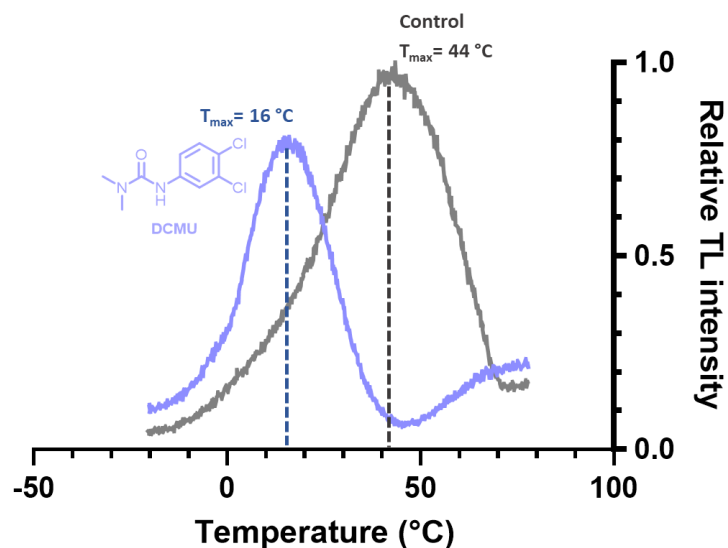
- **Etude de l'impact des molécules phytotoxiques sur le site Q_B du photosystème II par thermoluminescence**

Afin de déterminer si le photosystème II (PSII) est inhibé au niveau du site Q_B par les molécules à l'étude, une analyse de la thermoluminescence (TL) a été mise en place. Cette TL est mesurée après un pulse lumineux sur un échantillon exposé à un gradient de température (-20 °C à 80 °C, voir Matériel et Méthodes). Au sein d'un PSII isolé, la TL correspond à l'émission d'énergie lumineuse suite à la recombinaison d'un électron entre deux sous-structures du PSII, par exemple entre la plastoquinone réduite Q_B^- et le complexe Mn_4CaO_5 oxydé ($S_0/S_1/S_2/S_3$).

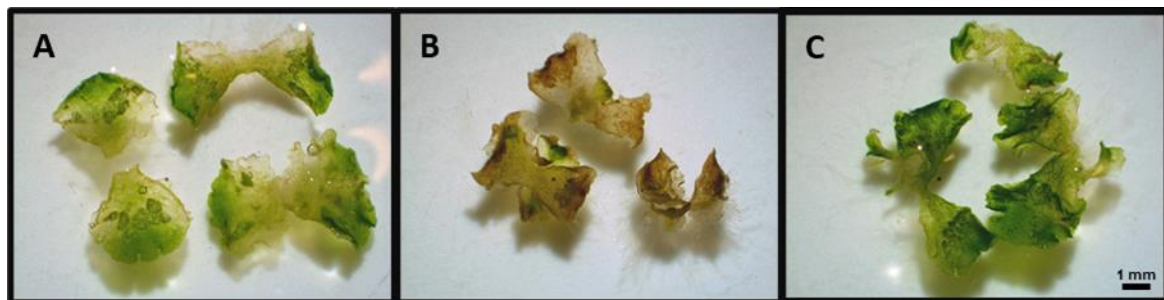


Fragments de membrane thylakoïdale enrichis en PSII (PSIIs isolés)

Cette mesure de la TL permet d'obtenir le paramètre T_{max} correspondant à la température pour laquelle on obtient une TL maximale. La valeur de T_{max} varie en fonction de la localisation de l'électron au sein du PSII lorsque celui-ci recombine avec le complexe Mn_4CaO_5 oxydé. Dans le cadre de l'utilisation d'un inhibiteur du site Q_B tel que le DCMU, l'électron reste bloqué au niveau de la plastoquinone du site Q_A . En conséquence, on observe une diminution de la valeur de T_{max} .



Annexe 3. Phytotoxicité du Radula chromène sur *Marchantia polymorpha*



Les gemmae de *Marchantia polymorpha* ont été collectés sur un individu adulte puis déposés dans une boîte de Pétri remplie de 75 mL de milieu solide Murashige et Skoog dilué deux fois (0,8 % d'agar). Les gemmae ont été placés en culture à 21 °C sous lumière constante ($40 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 8 jours. Les jeunes hépatiques ont ensuite été placés chacune dans un puit de microplaque 96-puits afin d'être traitées par 1 % de DMSO (A) ou 400 μM de Radula chromene (B) ou plongées sans traitement dans de l'eau distillée (C) selon la méthode décrite dans Matériels et Méthodes - IV. Les photos ont été prises après 4 jours de traitement. Chaque jeune hépatique a été traitée indépendamment.

Common Name (MetaboAnalyst) Suite	analyte	mode	RT (min)	L1 12h - DMSO1% N04	L2 12h - DMSO1% N05	L3 12h - DMSO1% N06	L1 12h - 100 µM N10	L2 12h - 100 µM N11	L3 12h - 100 µM N12	L1 12h - 400 µM N07	L2 12h - 400 µM N08	L3 12h - 400 µM N09
L-Dehydroascorbic acid	dehydroascorbic acid 1	splitless	16.863	0.07889	0.07105	0.08092	0.11172	0.07662	0.09162	0.01387	0.01387	0.01032
Levoglucosan	1,6-anhydro-glucose	splitless	15.326	0.00556	0.00562	0.00872	0.00460	0.01922	0.00532	0.00294	0.00349	0.00235
L-Glutamic acid	L-glutamic acid 2	splitless	14.398	0.53301	0.70785	0.51376	0.21119	0.56305	0.43081	0.05948	0.07983	0.01710
L-Glutamine	L-glutamine 3	split30	8.403	2.38135	1.43266	1.43266	2.43277	1.97326	1.97326	0.34585	0.33315	0.11251
L-Histidine	L-histidine 3	splitless	17.558	0.00029	0.03752	0.00179	0.00087	0.00321	0.03445	0.00480	0.00011	0.00079
L-Homoserine	L-homoserine 2	splitless	12.359	0.00406	0.00305	0.00286	0.00289	0.00328	0.00225	0.00207	0.00133	0.00144
Linoleic acid	linoleic acid	splitless	20.399	0.05227	0.06884	0.08884	0.14713	0.09519	0.11749	0.11749	0.04188	0.03890
L-Isoleucine	DL-isoleucine 2	splitless	10.225	0.05490	0.05318	0.04522	0.05410	0.05770	0.02909	0.05177	0.04188	0.03890
L-Lactic acid	L-(+)-lactic acid (sl)	splitless	7.251	0.13643	0.11362	0.09602	0.12649	0.13475	0.11315	0.10964	0.10009	0.05971
L-Leucine	L-leucine 2	splitless	9.945	0.03057	0.03252	0.02715	0.03568	0.03298	0.03593	0.03593	0.05936	0.05936
L-Lysine	L-lysine 2	splitless	17.643	0.01213	0.03325	0.01651	0.00878	0.02138	0.02633	0.03061	0.00878	0.00714
L-Methionine	L-methionine 2	splitless	13.188	0.00823	0.00974	0.00775	0.00774	0.01198	0.00981	0.01728	0.02074	0.01237
L-Phenylalanine	Phenylalanine 1	splitless	13.545	0.02130	0.01978	0.02715	0.02658	0.03671	0.01692	0.01005	0.01407	0.00911
L-Serine	L-serine 1	splitless	9.706	0.62852	0.46240	0.33847	0.64832	0.84571	0.54281	0.02519	0.04518	0.01292
L-Threonine	L-threonine 1	splitless	10.224	0.08094	0.06181	0.07183	0.08194	0.09883	0.08265	0.01315	0.02442	0.00796
L-Tryptophan	L-tryptophan 2	splitless	20.466	0.02810	0.04628	0.06392	0.02223	0.06539	0.05820	0.06406	0.01533	0.01121
L-Tyrosine	L-tyrosine 1	splitless	17.345	0.04183	0.00871	0.01889	0.04559	0.02853	0.00899	0.01931	0.09601	0.05585
L-Valine	L-valine 2	splitless	9.151	0.12973	0.12207	0.10212	0.14558	0.13055	0.09075	0.11473	0.10494	0.08657
Maleic acid	maleic acid	splitless	10.323	0.00498	0.00423	0.00489	0.00384	0.00476	0.00602	0.00134	0.00103	0.00086
myo-Inositol	myo-inositol	splitless	19.354	0.13624	0.10648	0.12044	0.16923	0.11410	0.14141	0.08716	0.10435	0.05069
Myristic acid	myristic acid	splitless	16.887	0.00993	0.00927	0.01006	0.00970	0.00995	0.01068	0.01061	0.00992	0.01091
N-Acetylornithine	N-acetyl-ornithine 2	splitless	18.409	0.02722	0.02820	0.00106	0.03820	0.03802	0.00763	0.00014	0.00099	0.00043
Nicotinic acid	nicotinic acid	splitless	10.27	0.00815	0.00795	0.00705	0.00784	0.00928	0.00700	0.00356	0.00630	0.00306
N-Methylalanine	N-methylalanine	splitless	8.43	1.11700	1.07098	1.07098	1.06725	1.06539	1.81656	1.81656	1.30823	1.68992
O-Acetylserine	acetyl-L-serine 1	splitless	10.009	0.00212	0.00175	0.00151	0.00485	0.00297	0.00321	0.00052	0.00032	0.00021
Oleic acid	oleic acid (et/ou elaidic acid)	splitless	20.504	0.03469	0.04007	0.05450	0.10369	0.07641	0.08415	0.06401	0.07706	0.07245
O-Phosphoethanolamine	O-phosphoethanolamine	splitless	16.232	0.01917	0.01688	0.01616	0.02518	0.03166	0.02321	0.00307	0.00078	0.00124
Ornithine	L-ornithine 2	splitless	16.632	0.13526	0.16846	0.03658	0.06411	0.08085	0.05568	0.01700	0.01670	0.01319
Palmitic acid	palmitic acid	splitless	18.846	0.23240	0.24873	0.23807	0.28693	0.27507	0.30423	0.44726	0.45134	0.46189
Palmitoleic acid	palmitoleic acid	splitless	18.728	0.00126	0.00109	0.00144	0.00214	0.00238	0.00253	0.00180	0.00226	0.00226
Phosphate	phosphoric acid	split30	6.332	1.66840	1.64555	1.34238	1.43965	1.20296	1.34225	0.37853	0.49001	0.23909
Phytosphingosine	phytosphingosine 2	splitless	23.812	0.00889	0.00767	0.00104	0.00989	0.01466	0.01084	0.00668	0.00448	0.00741
Picolinic acid	picolonic acid	splitless	10.598	0.00825	0.00662	0.00879	0.01030	0.00814	0.00899	0.00614	0.00620	0.00648
Putrescine	putrescine	splitless	15.709	0.18622	0.19646	0.02899	0.16897	0.16418	0.19832	0.15261	0.11338	0.16886
Pyruvic acid	pyruvic acid (sl)	splitless	7.151	0.00286	0.00209	0.00186	0.00430	0.00300	0.00380	0.00184	0.00187	0.00109
Shikimic acid	shikimic acid	splitless	16.433	0.04344	0.03793	0.05444	0.03227	0.03797	0.04032	0.00276	0.00350	0.00204
Sinapic acid	3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnami - 1	splitless	20.6	0.08558	0.07443	0.06931	0.06452	0.06360	0.07626	0.01419	0.01393	0.00788
Squalene	squalene	splitless	25.251	0.00099	0.00063	0.00039	0.00141	0.00244	0.00179	0.00075	0.00097	0.00056
Stearic acid	stearic acid (et/ou xanthotoxin 2)	splitless	20.675	0.23269	0.20518	0.18390	0.19823	0.22532	0.21887	0.31890	0.39796	0.37923
Stigmasterol	stigmasterol	splitless	28.442	0.00075	0.00148	0.00073	0.00063	0.00092	0.00081	0.00073	0.00117	0.00113
Succinic acid	succinic acid	splitless	10.509	0.03458	0.02856	0.02701	0.05810	0.04411	0.08029	0.05810	0.07019	0.00244
Sucrose	Sucrose	splitless	23.988	0.06184	0.01397	0.14753	0.09572	0.17665	0.14763	0.12875	0.05741	0.15574
Threonine acid	threonine acid	splitless	13.652	0.01070	0.01031	0.01778	0.01204	0.02679	0.01548	0.00257	0.00688	0.00208
Triethanolamine	triethanolamine	splitless	14.464	0.00587	0.00426	0.00902	0.00838	0.01115	0.00484	0.00679	0.00519	0.00425
Tyramine	tyramine	splitless	17.562	0.02298	0.03964	0.03530	0.02202	0.03983	0.02746	0.00746	0.01400	0.00970
Urea	urea	splitless	9.599	0.02765	0.02785	0.01891	0.02447	0.03325	0.01793	0.02258	0.01923	0.01270
Uric acid	uric acid 1	splitless	19.331	0.10936	0.12196	0.07033	0.02413	0.06347	0.02446	0.00683	0.00829	0.00291
Uridine	uridine	splitless	22.422	0.00084	0.00253	0.00159	0.00125	0.00206	0.00382	0.00493	0.00239	0.00146
Xanthine	xanthine	splitless	18.574	0.00333	0.00198	0.00220	0.00115	0.00255	0.00103	0.00056	0.00077	0.00027

Etude du mode d'action de la radulanine A, une molécule phytotoxique d'origine naturelle

Simon Thuillier

Common Name (MetaboAnalyst)	analyte	mode	RT (min)	L1 24h- DMSO1%	L2 24h- DMSO1%	L3 24h- DMSO1%	L1 24h-100 µM	L2 24h-100 µM	L3 24h-100 µM	L1 24h-400 µM	L2 24h-400 µM	L3 24h-400 µM
2-Hydroxypyridine	4-hydroxypyridine	splitless	8.204	N13	N14	N15	N20	N21	N22	N26	N27	N28
2-Isopropylmalic acid	2-isopropylmalic acid	splitless	13.836	0.0014	0.0012	0.0018	0.0013	0.0015	0.0015	0.00572	0.00180	0.00014
2S-amino-pentanoic acid	norvaline 1	splitless	7.582	0.10349	0.10720	0.25518	0.27620	0.26946	0.24506	0.03410	0.07469	0.03447
3-Hydroxymethylglutaric acid	3-hydroxy-3-methylglutaric acid	splitless	13.9	0.00620	0.00874	0.00626	0.00722	0.00720	0.00722	0.00041	0.00096	0.00027
3-Indoleacetoneitrile	3-Indoleacetoneitrile	splitless	17.214	0.06699	0.06153	0.10124	0.07178	0.06220	0.07942	0.01082	0.01344	0.00511
4-Hydroxybenzoic acid	4-hydroxybenzoic acid	splitless	17.124	0.00210	0.00183	0.00178	0.00307	0.00270	0.00236	0.00321	0.00327	0.00295
4-Hydroxyproline	trans-4-hydroxy-L-proline 1 (ms)	splitless	12.615	0.00646	0.00503	0.00604	0.00965	0.01004	0.00680	0.00071	0.00153	0.00049
Acetohydroxamic Acid	acetohydroxamic acid (ou hydroxylamine)	splitless	7.72	0.00596	0.00681	0.00202	0.00696	0.00634	0.00564	0.00438	0.00419	0.00704
Adenine	adenine 1	splitless	17.066	0.02129	0.02050	0.02858	0.04509	0.03252	0.03170	0.04923	0.04585	0.00759
Adenosine	adenosine	splitless	23.825	0.02837	0.01020	0.01300	0.02629	0.01391	0.01848	0.00783	0.01052	0.00670
Allantoin	allantoin 1	splitless	17.293	0.00885	0.00415	0.05855	0.01717	0.00028	0.02713	0.00035	0.00012	0.00009
Alpha-Lactose	lactose 2	splitless	24.534	0.00080	0.00067	0.00079	0.00151	0.00128	0.00114	0.00004	0.00054	0.00022
Arachidic acid	arachidic acid	splitless	22.367	0.00636	0.00723	0.00793	0.01205	0.03134	0.01333	0.00990	0.02067	0.01532
Arbutin	arbutin	splitless	23.393	0.00010	0.00021	0.00030	0.00808	0.01318	0.00910	0.00003	0.00001	0.00006
Benzoate	benzoic acid (pmm)	splitless	9.71	0.01498	0.01785	0.01782	0.02328	0.02258	0.01987	0.01116	0.01489	0.00772
Beta-Cortol	galactinol 2	splitless	26.479	0.01324	0.01706	0.02528	0.01473	0.00813	0.01506	0.00189	0.00175	0.00059
Beta-Sitosterol	beta-sitosterol	splitless	28.848	0.01627	0.01263	0.01814	0.01179	0.02045	0.01080	0.01280	0.01588	0.01207
Citric acid	citric acid	splitless	16.615	0.07351	0.07840	0.13011	0.04710	0.04007	0.05179	0.00183	0.00499	0.00143
Citrulline	citrulline 2	splitless	16.691	0.01728	0.01515	0.01337	0.01264	0.00336	0.01012	0.00171	0.00210	0.00127
D-Galactosamine	galactosamine 5	splitless	17.882	0.03371	0.04180	0.10886	0.02835	0.00536	0.09647	0.00665	0.00449	0.00161
D-Galacturonate	galacturonic acid 1	splitless	17.907	0.00173	0.00143	0.00178	0.00256	0.00222	0.00131	0.00151	0.00151	0.00193
D-Glucose	D-glucose 1	split30	8.844	2.65355	2.61864	3.57093	2.88899	2.53298	2.98231	3.0458	3.39487	0.17193
D-Glycerate 3-phosphate	3-phosphoglycerate	splitless	16.495	0.00319	0.00375	0.00308	0.00284	0.00161	0.00236	0.00004	0.00019	0.00010
D-Malic acid	D-malic acid	splitless	12.794	0.17344	0.26378	0.46884	0.07975	0.00866	0.00748	0.02614	0.00953	0.01238
D-Maltose	maltose 1	splitless	24.702	0.00422	0.00280	0.00506	0.01726	0.00866	0.00748	0.02614	0.00953	0.01238
D-Mannose	D-mannose 1 (et/ou D-allose 1)	splitless	17.287	2.80344	2.91138	3.02923	2.04086	0.04844	0.05701	0.07808	0.06881	0.09233
Dodecanoic acid	lauric acid	splitless	14.789	0.00411	0.00352	0.00437	0.00437	0.00602	0.00468	0.00348	0.00453	0.00419
D-Ribose	ribose	splitless	15.113	0.00431	0.00512	0.00633	0.01308	0.00588	0.01178	0.01635	0.01178	0.02450
D-Xylose	xylose 2	splitless	14.791	0.00855	0.01153	0.03298	0.02348	0.01307	0.01876	0.00243	0.01594	0.02299
Eicosadienoic acid	eicosa-11,14-dienoic acid	splitless	22.1	0.00119	0.00180	0.00267	0.00577	0.01217	0.00798	0.00416	0.00707	0.00683
Elaidic acid	trans-13-octadecenoic acid	splitless	20.55	0.00538	0.00709	0.00731	0.01047	0.01283	0.01004	0.01283	0.02256	0.01916
Erythrono-1,4-lactone	erythrono-1,4-lactone	splitless	12.049	0.002723266	0.002915659	0.004052951	0.002981555	0.00145852	0.002448753	0.000328715	0.000370114	0.000197271
Ethanolamine	ethanolamine	splitless	9.879	1.06166	0.96654	1.26211	0.91193	0.69211	0.76484	0.15962	0.24473	0.08461
Fructose 6-phosphate	fructose 6-phosphate	splitless	21.194	0.00578	0.00520	0.00919	0.01231	0.00507	0.00587	0.00016	0.00005	0.00001
Fructose-1P	fructose 1	split30	8.74	0.32716	0.47989	0.98036	0.78905	0.68776	0.86191	0.72333	0.12942	0.02619
Fumaric acid	fumaric acid	splitless	10.94	0.11663	0.12816	0.21802	0.09834	0.08113	0.11649	0.01643	0.00966	0.00996
Galactaric acid	galactaric acid	splitless	18.907	0.00158	0.00203	0.00204	0.00365	0.00235	0.00312	0.00066	0.00082	0.00066
Galactonic acid	galactonic acid 2	splitless	18.504	0.00406	0.00412	0.00570	0.00488	0.00462	0.00535	0.00134	0.00208	0.00091
GABA	gamma-aminobutyric acid (GABA)	splitless	13.3	0.14976	0.10152	0.19882	0.17850	0.11921	0.19397	0.06792	0.05630	0.05903
Glucose 6-phosphate	D-glucose-6-phosphate 2	splitless	21.55	0.00247	0.00248	0.00507	0.00441	0.00195	0.00305	0.00007	0.00007	0.00003
Glyceric acid	glyceric acid	splitless	10.735	0.04270	0.03549	0.04392	0.04066	0.03225	0.03720	0.00441	0.00455	0.00302
Glycerol	glycerol	splitless	9.941	0.25913	0.22246	0.26477	0.35297	0.37034	0.39690	0.14324	0.17646	0.11048
Glycerol 3-phosphate	glycerol 1-phosphate	splitless	16.056	0.01622	0.01710	0.02580	0.01990	0.00632	0.02270	0.00401	0.00387	0.00280
Glycine	glycine	splitless	10.456	0.24075	0.14964	0.14121	0.18181	0.13740	0.10560	0.00110	0.02501	0.01480
Glycolate	glycolic acid (sl)	splitless	7.451	0.00201	0.00234	0.00251	0.00254	0.00223	0.00223	0.00108	0.00120	0.00120
L-Alanine	L-alanine 1	splitless	7.4748	0.00690	0.00479	0.00922	0.02975	0.01552	0.01774	0.00509	0.00429	0.00535
L-Arabinose	arabinose	splitless	14.897	0.00744	0.01123	0.01376	0.01251	0.00730	0.00983	0.02385	0.01594	0.02299
L-Asparagine	L-asparagine 2	splitless	14.984	0.02027	0.02027	0.06117	0.04203	0.04279	0.04158	0.00096	0.00052	0.00082
L-Aspartic acid	aspartic acid 1	splitless	12.002	0.28458	0.24162	0.34609	0.08522	0.09036	0.07212	0.00337	0.00850	0.01094

Etude du mode d'action de la radulanine A, une molécule phytotoxique d'origine naturelle

Simon Thuillier

Bibliographie

- Abbas, H.K., Duke, S.O., Shier, W.T., Duke, M.V., 2002.** Inhibition of Ceramide Synthesis in Plants by Phytotoxins, in: Upadhyay, R.K. (Ed.), *Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation*. Springer US, Boston, MA, pp. 211–229. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4439-2_14
- Abbas, H.K., Tanaka, T., Duke, S.O., Porter, J.K., Wray, E.M., Hodges, L., Sessions, A.E., Wang, E., Merrill Jr, A.H., Riley, R.T., 1994.** Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiology* 106, 1085–1093. <https://doi.org/10.1104/pp.106.3.1085>
- Ajikumar, P.K., Xiao, W.-H., Tyo, K.E.J., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T.H., Pfeifer, B., Stephanopoulos, G., 2010.** Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 330, 70–74. <https://doi.org/10.1126/science.1191652>
- Aliferis, K.A., Jabaji, S., 2011.** Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.03.004>
- Amagasa, T., Paul, R.N., Heitholt, J.J., Duke, S.O., 1994.** Physiological Effects of Cornexistin on *Lemna paucicostata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 49, 37–52. <https://doi.org/10.1006/pest.1994.1032>
- Araniti, F., Costas-Gil, A., Cabeiras-Freijanes, L., Lupini, A., Sunseri, F., Reigosa, M.J., Abenavoli, M.R., Sánchez-Moreiras, A.M., 2018.** Rosmarinic acid induces programmed cell death in Arabidopsis seedlings through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *Plos One* 13, e0208802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208802>
- Araniti, F., Miras-Moreno, B., Lucini, L., Landi, M., Abenavoli, M.R., 2020.** Metabolomic, proteomic and physiological insights into the potential mode of action of thymol, a phytotoxic natural monoterpene phenol. *Plant Physiology and Biochemistry* 153, 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.008>
- Asakawa, Y., 2012.** *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Science & Business Media.
- Asakawa, Y., 2007.** Biologically active compounds from bryophytes. *Pure and Applied Chemistry* 79, 557–580. <https://doi.org/10.1351/pac200779040557>
- Asakawa, Y., 1995.** Chemical Constituents of the Bryophytes, in: *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer, Vienna, pp. 1–562. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6896-7_1
- Asakawa, Y., 1982.** Chemical Constituents of the Hepaticae, in: *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer, Vienna, pp. 1–285. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8677-0_1
- Asakawa, Y., Hashimoto, T., Takikawa, K., Tori, M., Ogawa, S., 1991.** Prenyl bibenzyls from the liverworts *Radula perrottetii* and *Radula complanata*. *Phytochemistry* 30, 235–251. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84130-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84130-K)
- Asakawa, Y., Kusube, E., Takemoto, T., Suire, C., 1978a.** New bibenzyls from *Radula complanata*. *Phytochemistry* 17, 2115–2117. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89292-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89292-4)
- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., 2018.** Chemical Constituents of Bryophytes: Structures and Biological Activity. *Journal of Natural Products* 81, 641–660. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01046>
- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., Nagashima, F., 2013a.** Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*, Meinhardt H. Zenk Memorial Issue 91, 52–80. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.012>
- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., Nagashima, F., 2013b.** Chemical Constituents of Bryophyta, in: *Chemical Constituents of Bryophytes: Bio- and Chemical Diversity, Biological Activity, and Chemosystematics, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer, Vienna, pp. 563–605. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1084-3_5

- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., Novakovic, M., Bukvicki, D., Anchang, K.Y., 2022.** Bis-bibenzyls, Bibenzyls, and Terpenoids in 33 Genera of the Marchantiophyta (Liverworts): Structures, Synthesis, and Bioactivity. *Journal of Natural Products* 85, 729–762. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00302>
- Asakawa, Y., Nagashima, F., Ludwiczuk, A., 2020.** Distribution of Bibenzyls, Prenyl Bibenzyls, Bis-bibenzyls, and Terpenoids in the Liverwort Genus *Radula*. *Journal of Natural Products* 83, 756–769. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01132>
- Asakawa, Y., Toyota, M., Takemoto, T., 1978b.** Seven new bibenzyls and a dihydrochalcone from *Radula variabilis*. *Phytochemistry* 17, 2005–2010. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88752-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88752-X)
- Backman, P.A., DeVay, J.E., 1971.** Studies on the mode of action and biogenesis of the phytotoxin syringomycin. *Physiological Plant Pathology* 1, 215–233. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(71\)90030-0](https://doi.org/10.1016/0048-4059(71)90030-0)
- Bajwa, D.S., Pourhashem, G., Ullah, A.H., Bajwa, S.G., 2019.** A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact. *Industrial Crops and Products* 139, 111526. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111526>
- Baker, E.A., Hayes, A.L., Butler, R.C., 1992.** Physicochemical properties of agrochemicals: Their effects on foliar penetration. *Pesticide Science* 34, 167–182. <https://doi.org/10.1002/ps.2780340212>
- Baloglu, E., Kingston, D.G.I., 1999.** A New Semisynthesis of Paclitaxel from Baccatin III. *Journal of Natural Products* 62, 1068–1071. <https://doi.org/10.1021/np990040k>
- Barbič, M., Schmidt, T.J., Jürgenliemk, G., 2012.** Novel Phenyl-1-benzoxepinols from Butcher’s Broom (*Ruscus rhizoma*). *Chemistry & Biodiversity* 9, 1077–1083. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100158>
- Battaglino, B., Grinzato, A., Pagliano, C., 2021.** Binding Properties of Photosynthetic Herbicides with the Q_B Site of the D1 Protein in Plant Photosystem II: A Combined Functional and Molecular Docking Study. *Plants* 10, 1501. <https://doi.org/10.3390/plants10081501>
- Baumgarten, A., Spiegel, H., 2004.** Phytotoxicity (plant tolerance). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 221–251.
- Beffa, R., Menne, H., Köcher, H., 2019.** Herbicide Resistance Action Committee (HRAC): Herbicide Classification, Resistance Evolution, Survey, and Resistance Mitigation Activities, in: *Modern Crop Protection Compounds*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 5–32. <https://doi.org/10.1002/9783527699261.ch1>
- Berthold, D.A., Babcock, G.T., Yocum, C.F., 1981.** A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Letters* 134, 231–234. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80608-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80608-4)
- Binder, S., 2010.** Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book* 8, e0137. <https://doi.org/10.1199/tab.0137>
- Bischoff, V., Nita, S., Neumetzler, L., Schindelasch, D., Urbain, A., Eshed, R., Persson, S., Delmer, D., Scheible, W.-R., 2010.** Trichome Birefringence and Its Homolog AT5G01360 Encode Plant-Specific DUF231 Proteins Required for Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 153, 590–602. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153320>
- Blatt-Janmaat, K., Neumann, S., Schmidt, F., Ziegler, J., Peters, K., Qu, Y., 2022.** Impact of in vitro hormone treatments on the bibenzyl production of *Radula complanata*. *Botany*. <https://doi.org/10.1139/cjb-2022-0048>
- Blatt-Janmaat, K., Qu, Y., 2021.** The Biochemistry of Phytocannabinoids and Metabolic Engineering of Their Production in Heterologous Systems. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 2454. <https://doi.org/10.3390/ijms22052454>
- Blatt-Janmaat, K.L., Neumann, S., Ziegler, J., Peters, K., 2023.** Host Tree and Geography Induce Metabolic Shifts in the Epiphytic Liverwort *Radula complanata*. *Plants* 12, 571. <https://doi.org/10.3390/plants12030571>
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000.** Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 13, 135–160. <https://doi.org/10.1021/tx9902082>
- Bonfield, H.E., Knauber, T., Lévesque, F., Moschetta, E.G., Susanne, F., Edwards, L.J., 2020.** Photons as a 21st century reagent. *Nature Communications* 11, 804. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13988-4>
- Boonphong, S., Puangsombat, P., Baramée, A., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P., 2007.** Bioactive Compounds from *Bauhinia purpurea* Possessing Antimalarial, Antimycobacterial, Antifungal, Anti-

inflammatory, and Cytotoxic Activities. *Journal of Natural Products* 70, 795–801. <https://doi.org/10.1021/np070010e>

- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161, 839–851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., Adam, C., Aki, S.S., Althoff, F., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M.A., Balasubramanian, S., Barry, K., Bauer, D., Boehm, C.R., Briginshaw, L., Caballero-Perez, J., Catarino, B., Chen, F., Chiyoda, S., Chovatia, M., Davies, K.M., Delmans, M., Demura, T., Dierschke, T., Dolan, L., Dorantes-Acosta, A.E., Eklund, D.M., Florent, S.N., Flores-Sandoval, E., Fujiyama, A., Fukuzawa, H., Galik, B., Grimanelli, D., Grimwood, J., Grossniklaus, U., Hamada, T., Haseloff, J., Hetherington, A.J., Higo, A., Hirakawa, Y., Hundley, H.N., Ikeda, Y., Inoue, K., Inoue, S., Ishida, S., Jia, Q., Kakita, M., Kanazawa, T., Kawai, Y., Kawashima, T., Kennedy, M., Kinose, K., Kinoshita, T., Kohara, Y., Koide, E., Komatsu, K., Kopischke, S., Kubo, M., Kyojuka, J., Lagercrantz, U., Lin, S.-S., Lindquist, E., Lipzen, A.M., Lu, C.-W., Luna, E.D., Martienssen, R.A., Minamino, N., Mizutani, Masaharu, Mizutani, Miya, Mochizuki, N., Monte, I., Mosher, R., Nagasaki, H., Nakagami, H., Naramoto, S., Nishitani, K., Ohtani, M., Okamoto, T., Okumura, M., Phillips, J., Pollak, B., Reinders, A., Rövekamp, M., Sano, R., Sawa, S., Schmid, M.W., Shirakawa, M., Solano, R., Spunde, A., Suetsugu, N., Sugano, S., Sugiyama, A., Sun, R., Suzuki, Y., Takenaka, M., Takezawa, D., Tomogane, H., Tsuzuki, M., Ueda, T., Umeda, M., Ward, J.M., Watanabe, Y., Yazaki, K., Yokoyama, R., Yoshitake, Y., Yotsui, I., Zachgo, S., Schmutz, J., 2017.** Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* 171, 287–304.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030>
- Bowyer, J.R., Camilleri, P., Stapleton, A., 1984.** Superoxide formation in pea chloroplasts by a dioxathiadiaza-2,5-pentalene derivative, a new lipophilic. *FEBS Letters* 172, 239–244. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)81133-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)81133-3)
- Brabham, C., Lei, L., Gu, Y., Stork, J., Barrett, M., DeBolt, S., 2014.** Indaziflam Herbicidal Action: A Potent Cellulose Biosynthesis Inhibitor. *Plant Physiology* 166, 1177–1185. <https://doi.org/10.1104/pp.114.241950>
- Breitenbach, J., Zhu, C., Sandmann, G., 2001.** Bleaching Herbicide Norflurazon Inhibits Phytoene Desaturase by Competition with the Cofactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 5270–5272. <https://doi.org/10.1021/jf0106751>
- Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A., 1982.** Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science* 13, 495–504. <https://doi.org/10.1002/ps.2780130506>
- Burken, J.G., Schnoor, J.L., 1998.** Predictive Relationships for Uptake of Organic Contaminants by Hybrid Poplar Trees. *Environmental Science Technologies*. 32, 3379–3385. <https://doi.org/10.1021/es9706817>
- Caffarri, S., Tibiletti, T., Jennings, R.C., Santabarbara, S., 2014.** A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Current Protein & Peptide Science* 15, 296–331. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140327102218>
- Campe, R., Hollenbach, E., Kämmerer, L., Hendriks, J., Höffken, H.W., Kraus, H., Lerchl, J., Mietzner, T., Tresch, S., Witschel, M., Hutzler, J., 2018.** A new herbicidal site of action: Cinmethylin binds to acyl-ACP thioesterase and inhibits plant fatty acid biosynthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 148, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.006>
- Cantrell, C.L., Dayan, F.E., Duke, S.O., 2012.** Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products* 75, 1231–1242. <https://doi.org/10.1021/np300024u>
- Carpita, N.C., 2011.** Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis: How Plants Make Cellulose and Other (1→4)-β-D-Glycans. *Plant Physiology* 155, 171–184. <https://doi.org/10.1104/pp.110.163360>
- Casey, C.P., 2006.** 2005 Nobel Prize in Chemistry. Development of the Olefin Metathesis Method in Organic Synthesis. *Journal of Chemical Education* 83, 192. <https://doi.org/10.1021/ed083p192>
- Chauhan, B.S., Gill, G.S., Preston, C., Chauhan, B.S., Gill, G.S., Preston, C., 2006.** Tillage system effects on weed ecology, herbicide activity and persistence: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46, 1557–1570. <https://doi.org/10.1071/EA05291>

- Chen, P., Wu, Q., Feng, J., Yan, L., Sun, Y., Liu, S., Xiang, Y., Zhang, M., Pan, T., Chen, Xiaying, Duan, T., Zhai, L., Zhai, B., Wang, W., Zhang, R., Chen, B., Han, X., Li, Yicong, Chen, L., Liu, Y., Huang, X., Jin, T., Zhang, W., Luo, H., Chen, Xiaohui, Li, Yongqiang, Li, Q., Li, G., Zhang, Q., Zhuo, L., Yang, Z., Tang, H., Xie, T., Ouyang, X., Sui, X., 2020. Erianin, a novel dibenzyl compound in *Dendrobium* extract, inhibits lung cancer cell growth and migration via calcium/calmodulin-dependent ferroptosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy - Nature* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0149-3>
- Chen, R., Yang, S., Zhang, L., Zhou, Y.J., 2020. Advanced Strategies for Production of Natural Products in Yeast. *iScience* 23, 100879. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100879>
- Chicca, A., Schafroth, M.A., Reynoso-Moreno, I., Erni, R., Petrucci, V., Carreira, E.M., Gertsch, J., 2018. Uncovering the psychoactivity of a cannabinoid from liverworts associated with a legal high. *Science Advances* 4, eaat2166. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat2166>
- Chong, J., Poutaraud, A., Hugueney, P., 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 177, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.012>
- Coetzer, E., Al-Khatib, K., Loughin, T.M., 2001. Glufosinate efficacy, absorption, and translocation in amaranth as affected by relative humidity and temperature. *Weed Science* 49, 8–13. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2001\)049\[0008:GEAATI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2001)049[0008:GEAATI]2.0.CO;2)
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., Davies, E., 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2, 144–151. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01019-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01019-4)
- Coleman, R., Penner, D., 2006. Desiccant Activity of Short Chain Fatty Acids. *Weed Technology* 20, 410–415.
- Commisso, M., Guarino, F., Marchi, L., Muto, A., Piro, A., Degola, F., 2021. Bryo-Activities: A Review on How Bryophytes Are Contributing to the Arsenal of Natural Bioactive Compounds against Fungi. *Plants* 10, 203. <https://doi.org/10.3390/plants10020203>
- Cullmann, F., Becker, H., 1999. Prenylated Bibenzyls from the Liverwort *Radula laxiramea*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 54, 147–150. <https://doi.org/10.1515/znc-1999-3-401>
- Cummins, I., Edwards, R., 2004. Purification and Cloning of an Esterase from the Weed Black-grass (*Alopecurus myosuroides*), which Bioactivates Aryloxyphenoxypropionate Herbicides. *The Plant Journal* 39, 894–904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02174.x>
- Czarnota, M.A., Paul, R.N., Dayan, F.E., Nimbai, C.I., Weston, L.A., 2001. Mode of Action, Localization of Production, Chemical Nature, and Activity of Sorgoleone: A Potent PSII Inhibitor in *Sorghum spp.* Root Exudates. *Weed Technology* 15, 813–825.
- Daub, M.E., Ehrenshaft, M., 2000. The Photoactivated Cercospora Toxin Cercosporin: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. *Annual Review of Phytopathology* 38, 461–490. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.461>
- Davis, E.F., 1928. The toxic principle of *Juglans nigra* as identified with synthetic juglone, and its toxic effects on tomato and alfalfa plants. *American Journal of Botany* 15, 620.
- Dayan, F.E., 2019. Current Status and Future Prospects in Herbicide Discovery. *Plants* 8. <https://doi.org/10.3390/plants8090341>
- Dayan, F.E., Duke, S.O., 2020. Discovery for New Herbicide Sites of Action by Quantification of Plant Primary Metabolite and Enzyme Pools. *Engineering* 6, 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.03.004>
- Dayan, F.E., Duke, S.O., 2014. Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant Physiology* 166, 1090–1105. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239061>
- Dayan, F.E., Duke, S.O., Sauldubois, A., Singh, N., McCurdy, C., Cantrell, C., 2007. *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for β -triketones from *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry, Phytochemical Society of North America* 68, 2004–2014. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.026>
- Dayan, F.E., Ferreira, D., Wang, Y.-H., Khan, I.A., McInroy, J.A., Pan, Z., 2008. A Pathogenic Fungi Diphenyl Ether Phytotoxin Targets Plant Enoyl (Acyl Carrier Protein) Reductase. *Plant Physiology* 147, 1062–1071. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118372>

- Dayan, F.E., Owens, D.K., Watson, S.B., Asolkar, R.N., Boddy, L.G., 2015.** Sarmentine, a natural herbicide from Piper species with multiple herbicide mechanisms of action. *Frontiers Plant Science* 6, 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00222>
- Dayan, F.E., Rimando, A.M., Pan, Z., Baerson, S.R., Gimsing, A.L., Duke, S.O., 2010.** Sorgoleone. *Phytochemistry* 71, 1032–1039. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.011>
- Dayan, F.E., Watson, S.B., 2011.** Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.09.004>
- De Causmaecker, S., 2017.** Bioenergetic studies on the quinone electron acceptors of photosystem II. <https://doi.org/10.25560/68272>
- DeBolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D.W., Somerville, C., 2007.** Nonmotile Cellulose Synthase Subunits Repeatedly Accumulate within Localized Regions at the Plasma Membrane in Arabidopsis Hypocotyl Cells following 2,6-Dichlorobenzonitrile Treatment. *Plant Physiology* 145, 334–338. <https://doi.org/10.1104/pp.107.104703>
- Delwiche, C.F., Cooper, E.D., 2015.** The Evolutionary Origin of a Terrestrial Flora. *Current Biology* 25, R899–R910. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.029>
- Dettenmaier, E.M., Doucette, W.J., Bugbee, B., 2009.** Chemical Hydrophobicity and Uptake by Plant Roots. *Environmental Science & Technology* 43, 324–329. <https://doi.org/10.1021/es801751x>
- Devine, M.D., Shukla, A., 2000.** Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection*, XIVth International Plant Protection Congress 19, 881–889. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00123-X)
- Ducrot, P.-H., Einhorn, J., Kerhoas, L., Lallemand, J.-Y., Milat, M.-L., Blein, J.-P., Neuman, A., Prangé, T., 1996.** *Cercospora beticola* toxins. Part XI: Isolation and structure of beticolin. *Tetrahedron Letters* 37, 3121–3124. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00506-0](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00506-0)
- Duke, S.O., 2018.** The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science* 74, 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>
- Duke, S.O., 2015.** Proving Allelopathy in Crop–Weed Interactions. *Weed Science* 63, 121–132. <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00130.1>
- Duke, S.O., Lydon, J., Becerril, J.M., Sherman, T.D., Lehnen, L.P., Matsumoto, H., 1991.** Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides. *Weed Science* 39, 465–473. <https://doi.org/10.1017/S0043174500073239>
- Dziwak, M., Wróblewska, K., Szumny, A., Galek, R., 2022.** Modern Use of Bryophytes as a Source of Secondary Metabolites. *Agronomy* 12. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061456>
- Einhellig, F.A., Rasmussen, J.A., Hejl, A.M., Souza, I.F., 1993.** Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. *Journal of Chemical Ecology* 19, 369–375. <https://doi.org/10.1007/BF00993702>
- Elliott, J.A., Cessna, A.J., Nicholaichuk, W., Tollefson, L.C., 2000.** Leaching Rates and Preferential Flow of Selected Herbicides through Tilled and Untilled Soil. *Journal of Environmental Quality* 29, 1650–1656. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900050036x>
- Engler, M., Anke, T., Sterner, O., 1997.** Pterulinic acid and pterulone, two novel inhibitors of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) produced by a Pterula species. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *The Journal of Antibiotics* 50, 330–333. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.50.330>
- Enroth, C., Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, Tomoko, Nishino, Takeshi, Pai, E.F., 2000.** Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 10723–10728. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10723>
- Fang, S.C., 1958.** Absorption, Translocation and Metabolism of 2,4–D–1–C14 in Pea and Tomato Plants. *Weeds* 6, 179–186. <https://doi.org/10.2307/4040291>
- Ferhatoglu, Y., Barrett, M., 2006.** Studies of clomazone mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.10.002>
- Fiehn, O., 2016.** Metabolomics by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology* 114, 30.4.1–30.4.32. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>

- Fiehn, O., 2006.** Metabolite profiling in Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology* 323, 439–447. <https://doi.org/10.1385/1-59745-003-0:439>
- Fiehn, O., Wohlgemuth, G., Scholz, M., Kind, T., Lee, D.Y., Lu, Y., Moon, S., Nikolau, B., 2008.** Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *The Plant Journal* 53, 691–704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03387.x>
- Figueiredo, A.C., Sim-Sim, M., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Esquível, M.G., Fontinha, S., Luís, L., Martins, S., Lobo, C., Stech, M., 2009.** Liverwort *Radula* species from Portugal: chemotaxonomical evaluation of volatiles composition. *Flavour and Fragrance Journal* 24, 316–325. <https://doi.org/10.1002/ffj.1943>
- Forlani, G., Obojska, A., Berlicki, Ł., Kafarski, P., 2006.** Phosphinothricin Analogues as Inhibitors of Plant Glutamine Synthetases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 796–802. <https://doi.org/10.1021/jf0526285>
- Foyer, C.H., Hanke, G., 2022.** ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. *The Plant Journal* 111, 642–661. <https://doi.org/10.1111/tpj.15856>
- Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A., Gierl, A., 2009.** Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* 70, 1645–1651. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.012>
- Fromme, P., Yu, H., DeRuyter, Y.S., Jolley, C., Chauhan, D.K., Melkozernov, A., Grotjohann, I., 2006.** Structure of photosystems I and II. *Comptes Rendus Chimie, Conversion photochimique et stockage de l'énergie solaire* 9, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2005.06.039>
- Fufezan, C., Rutherford, A.W., Krieger-Liszkay, A., 2002.** Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Letters* 532, 407–410. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03724-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03724-9)
- Fukuda, M., Tsujino, Y., Fujimori, T., Wakabayashi, K., Böger, P., 2004.** Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids I: effects on cell constituents. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.06.011>
- Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I.J., Filsinger Interrante, M., Smolke, C.D., 2015.** Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science* 349, 1095–1100. <https://doi.org/10.1126/science.aac9373>
- Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R.A., Cánovas-Díaz, M., de Diego Puente, T., 2020.** A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules* 25, 5986. <https://doi.org/10.3390/molecules25245986>
- Gandy, M.N., Corral, M.G., Mylne, J.S., Stubbs, K.A., 2015.** An interactive database to explore herbicide physicochemical properties. *Organic & Biomolecular Chemistry* 13, 5586–5590. <https://doi.org/10.1039/C5OB00469A>
- Gebhardt, P., Dornberger, K., Gollmick, F.A., Gräfe, U., Härtl, A., Görls, H., Schlegel, B., Hertweck, C., 2007.** Quercinol, an anti-inflammatory chromene from the wood-rotting fungus *Daedalea quercina* (Oak Mazegill). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17, 2558–2560. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.02.008>
- Gershater, M.C., Cummins, I., Edwards, R., 2007.** Role of a carboxylesterase in herbicide bioactivation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 21460–21466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701985200>
- Gerwick, B.C., Fields, S.S., Graupner, P.R., Gray, J.A., Chapin, E.L., Cleveland, J.A., Heim, D.R., 1997.** Pyridazocidin, A New Microbial Phytotoxin with Activity in the Mehler Reaction. *Weed Science* 45, 654–657.
- Gfeller, A., Glauser, G., Etter, C., Signarbieux, C., Wirth, J., 2018.** *Fagopyrum esculentum* Alters Its Root Exudation after *Amaranthus retroflexus* Recognition and Suppresses Weed Growth. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Giberti, S., Bertazzini, M., Liboni, M., Berlicki, Ł., Kafarski, P., Forlani, G., 2017.** Phytotoxicity of aminobisphosphonates targeting both $\delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase and glutamine synthetase. *Pest Management Science* 73, 435–443. <https://doi.org/10.1002/ps.4299>
- Gignac, L.D., 2001.** Bryophytes as Indicators of Climate Change. *The Bryologist* 104, 410–420.
- Gil, C.S., Hong, D., Duan, S., Eom, S.H., 2022.** Volatile and Non-Volatile Allelopathic Characteristics in Thermally Processed Needles of Two Conifers. *Plants* 11, 1003. <https://doi.org/10.3390/plants11081003>

- Gimsing, A.L., Baelum, J., Dayan, F.E., Locke, M.A., Sejerø, L.H., Jacobsen, C.S., 2009.** Mineralization of the allelochemical sorgoleone in soil. *Chemosphere* 76, 1041–1047. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.048>
- Gitsopoulos, T.K., Froud-Williams, R.J., 2004.** Effects of oxadiargyl on direct-seeded rice and *Echinochloa crusgalli* under aerobic and anaerobic conditions. *Weed Research* 44, 329–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2004.00407.x>
- Goudet, C., Milat, M.-L., Sentenac, H., Thibaud, J.-B., 2000.** Beticolins, Nonpeptidic, Polycyclic Molecules Produced by the Phytopathogenic Fungus *Cercospora beticola*, as a New Family of Ion Channel-Forming Toxins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 203–209. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.203>
- Gonzalez, V.M., Kazimir, J., Nimbale, C., Weston, L.A., Cheniae, G.M., 1997.** Inhibition of a Photosystem II Electron Transfer Reaction by the Natural Product Sorgoleone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1415–1421. <https://doi.org/10.1021/jf960733w>
- Gorham, J., Coughlan, S. J., 1980.** Inhibition of photosynthesis by stilbenoids. *Phytochemistry* 19, 2059–2064. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82194-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82194-9)
- Green, J.M., 2018.** The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 74, 1035–1039. <https://doi.org/10.1002/ps.4462>
- Green, J.M., 2012.** The benefits of herbicide-resistant crops. *Pest Management Science* 68, 1323–1331. <https://doi.org/10.1002/ps.3374>
- Gressel, J., 2020.** Perspective: present pesticide discovery paradigms promote the evolution of resistance – learn from nature and prioritize multi-target site inhibitor design. *Pest Management Science* 76, 421–425. <https://doi.org/10.1002/ps.5649>
- Grossmann, K., Christiansen, N., Looser, R., Tresch, S., Hutzler, J., Pollmann, S., Ehrhardt, T., 2012.** Physionomics and metabolomics—two key approaches in herbicidal mode of action discovery. *Pest Management Science* 68, 494–504. <https://doi.org/10.1002/ps.2300>
- Grubbs, R.H., 2006.** Olefin-Metathesis Catalysts for the Preparation of Molecules and Materials (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 45, 3760–3765. <https://doi.org/10.1002/anie.200600680>
- Grubbs, R.H., 2004.** Olefin metathesis. *Tetrahedron*. 60, 7117–7140. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.05.124>
- Grujters, B.W.T., van Veldhuizen, A., Weijers, C.A.G.M., Wijnberg, J.B.P.A., 2002.** Total Synthesis and Bioactivity of Some Naturally Occurring Pterulones. *Journal of Natural Products* 65, 558–561. <https://doi.org/10.1021/np010510m>
- Gülck, T., Møller, B.L., 2020.** Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science* 25, 985–1004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>
- Guo, Y., Liu, W., Wang, H., Wang, X., Qiang, S., Kalaji, H.M., Strasser, R.J., Chen, S., 2021.** Action Mode of the Mycotoxin Patulin as a Novel Natural Photosystem II Inhibitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69, 7313–7323. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01811>
- Hall, C.J., Mackie, E.R., Gendall, A.R., Perugini, M.A., Soares da Costa, T.P., 2020.** Review: amino acid biosynthesis as a target for herbicide development. *Pest Management Science* 76, 3896–3904. <https://doi.org/10.1002/ps.5943>
- Hao, G.-F., Zuo, Y., Yang, S.-G., Yang, G.-F., 2011.** Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitor: An Ideal Target for Herbicide Discovery. *Chimia* 65, 961–961. <https://doi.org/10.2533/chimia.2011.961>
- Harborne, J.B., 1999.** Classes and functions of secondary products from plants. *Chemicals from Plants*. pp. 1–25. https://doi.org/10.1142/9789812817273_0001
- Harinantenaina, L., Takahara, Y., Nishizawa, T., Kohchi, C., Soma, G.-I., Asakawa, Y., 2006.** Chemical Constituents of Malagasy Liverworts, Part V: Prenyl Bibenzyls and Clerodane Diterpenoids with Nitric Oxide Inhibitory Activity from *Radula appressa* and *Thysananthus spathulistipus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 54, 1046–1049. <https://doi.org/10.1248/cpb.54.1046>
- Harris, B.J., Harrison, C.J., Hetherington, A.M., Williams, T.A., 2020.** Phylogenomic Evidence for the Monophyly of Bryophytes and the Reductive Evolution of Stomata. *Current Biology* 30, 2001–2012.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.048>

- Haslam, R., Raveton, M., Cole, D.J., Pallett, K.E., Coleman, J.O.D., 2001.** The Identification and Properties of Apoplastic Carboxylesterases from Wheat That Catalyse Deesterification of Herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 71, 178–189. <https://doi.org/10.1006/pest.2001.2575>
- He, B., Hu, Y., Wang, W., Yan, W., Ye, Y., 2022.** The Progress towards Novel Herbicide Modes of Action and Targeted Herbicide Development. *Agronomy* 12, 2792. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112792>
- He, X., Sun, Y., Zhu, R.-L., 2013.** The Oil Bodies of Liverworts: Unique and Important Organelles in Land Plants. *Plant Sciences* 32, 293–302. <https://doi.org/10.1080/07352689.2013.765765>
- Heap, I., 2023.** The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. www.weedscience.org (accessed 7.21.23).
- Hefner, T., Arend, J., Warzecha, H., Siems, K., Stöckigt, J., 2002.** Arbutin synthase, a novel member of the NRD1 β glycosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 1731–1741. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00029-9)
- Hejl, A.A.M., Einhellig, F.A., Rasmussen, J.A., 1993.** Effects of juglone on growth, photosynthesis, and respiration. *Journal of Chemical Ecology* 19, 559–568. <https://doi.org/10.1007/BF00994325>
- Hejl, A.M., Koster, K.L., 2004a.** Juglone Disrupts Root Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity and Impairs Water Uptake, Root Respiration, and Growth in Soybean (*Glycine max*) and Corn (*Zea mays*). *Journal of Chemical Ecology* 30, 453–471. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000017988.20530.d5>
- Hejl, A.M., Koster, K.L., 2004b.** The Allelochemical Sorgoleone Inhibits Root H⁺-ATPase and Water Uptake. *Journal of Chemical Ecology* 30, 2181–2191. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000048782.87862.7f>
- Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M., Geller, G., 1973.** Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 314, 224–241. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90137-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90137-0)
- Henckens, M.L.C.M., Driessen, P.P.J., Worrell, E., 2018.** Molybdenum resources: Their depletion and safeguarding for future generations. *Resources, Conservation and Recycling* 134, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.03.002>
- Hernández-Romero, Y., Acevedo, L., de Los Ángeles Sánchez, M., Shier, W.T., Abbas, H.K., Mata, R., 2005.** Phytotoxic Activity of Bibenzyl Derivatives from the Orchid *Epidendrum rigidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6276–6280. <https://doi.org/10.1021/jf0508044>
- Hernández-Romero, Y., Rojas, J.-I., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R., 2004.** Spasmodic Effects, Mode of Action, and Structure–Activity Relationships of Stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal of Natural Products* 67, 160–167. <https://doi.org/10.1021/np030303h>
- Hess, F.D., 2000.** Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* 48, 160–170. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2000\)048\[0160:LDHAO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2000)048[0160:LDHAO]2.0.CO;2)
- Hiraki, M., Ohki, S., Sato, Y., Jablonkai, I., Böger, P., Wakabayashi, K., 2001.** Protoporphyrinogen-IX Oxidase Inhibitors: Bioactivation of Thiadiazolidines. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70, 159–167. <https://doi.org/10.1006/pest.2001.2552>
- Hoerlein, G., 1994.** Glufosinate (Phosphinothricin), A Natural Amino Acid with Unexpected Herbicidal Properties, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, pp. 73–145. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2672-7_4
- Horn, A., Pascal, A., Lončarević, I., Volpatto Marques, R., Lu, Y., Miguel, S., Bourgaud, F., Thorsteinsdóttir, M., Cronberg, N., Becker, J.D., Reski, R., Simonsen, H.T., 2021.** Natural Products from Bryophytes: From Basic Biology to Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 40, 191–217. <https://doi.org/10.1080/07352689.2021.1911034>
- Hounjet, L.J., Bannwarth, C., Garon, C.N., Caputo, C.B., Grimme, S., Stephan, D.W., 2013.** Combinations of Ethers and B(C₆F₅)₃ Function as Hydrogenation Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 7492–7495. <https://doi.org/10.1002/anie.201303166>
- Hounjet, L.J., Stephan, D.W., 2014.** Hydrogenation by Frustrated Lewis Pairs: Main Group Alternatives to Transition Metal Catalysts? *Organic Process Research & Development* 18, 385–391. <https://doi.org/10.1021/op400315m>

- Hsiao, P., Sanjaya, null, Su, R.-C., Teixeira da Silva, J.A., Chan, M.-T., 2007.** Plant native tryptophan synthase beta 1 gene is a non-antibiotic selection marker for plant transformation. *Planta* 225, 897–906. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0405-y>
- Hsu, F.C., Marxmiller, R.L., Yang, A.Y., 1990.** Study of root uptake and xylem translocation of cinmethylin and related compounds in detopped soybean roots using a pressure chamber technique. *Plant Physiology* 93, 1573–1578. <https://doi.org/10.1104/pp.93.4.1573>
- Hu, L., Robert, C.A.M., Cadot, S., Zhang, X., Ye, M., Li, B., Manzo, D., Chervet, N., Steinger, T., van der Heijden, M.G.A., Schlaeppi, K., Erb, M., 2018.** Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications* 9, 2738. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05122-7>
- Huang, H., Morgan, C.M., Asolkar, R.N., Koivunen, M.E., Marrone, P.G., 2010.** Phytotoxicity of Sarmentine Isolated from Long Pepper (*Piper longum*) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 9994–10000. <https://doi.org/10.1021/jf102087c>
- Huneck, S., Schreiber, K., 1972.** Wachstumsregulatorische eigenschaften von flechten-und moos-inhaltsstoffen. *Phytochemistry* 11, 2429–2434. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88510-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88510-6).
- Hussain, T., Espley, R.V., Gertsch, J., Whare, T., Stehle, F., Kayser, O., 2019.** Demystifying the liverwort *Radula marginata*, a critical review on its taxonomy, genetics, cannabinoid phytochemistry and pharmacology. *Phytochemistry Reviews* 18, 953–965. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09638-8>
- Hussain, T., Plunkett, B., Ejaz, M., Espley, R.V., Kayser, O., 2018.** Identification of Putative Precursor Genes for the Biosynthesis of Cannabinoid-Like Compound in *Radula marginata*. *Frontiers in Plant Science* 9, 537. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00537>
- Inderjit, 1996.** Plant phenolics in allelopathy. *The Botanical Review* 62, 186–202. <https://doi.org/10.1007/BF02857921>
- Inderjit, Duke, S.O., 2003.** Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217, 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1054-z>
- Inderjit, Weiner, J., 2001.** Plant allelochemical interference or soil chemical ecology? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 4, 3–12. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00011>
- Inoue, Y., Ishizuka, K., Mitsui, S., 1967.** Inhibition of Respiration of Yeast by Photosynthesis Inhibiting Herbicides. *Agricultural and Biological Chemistry* 31, 422–427. <https://doi.org/10.1080/00021369.1967.10858836>
- Ishii-Iwamoto, E.L., Abraham, D., Sert, M.A., Bonato, C.M., Kelmer-Bracht, A.L., Bracht, A., 2006.** Mitochondria as a site of allelochemical action, in: *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 267–284. https://doi.org/10.1007/1-4020-4280-9_12
- Ithal, N., Recknor, J., Nettleton, D., Maier, T., Baum, T.J., Mitchum, M.G., 2007.** Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 510–525. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0510>
- Jabs, T., 1999.** Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology* 57, 231–245. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00227-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00227-5)
- Jagendorf, A.T., Uribe, E., 1966.** ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 55, 170–177. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.1.170>
- Jeffree, C.E., 2006.** The Fine Structure of the Plant Cuticle, in: *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 11–125. <https://doi.org/10.1002/9780470988718.ch2>
- Jennings, J.A., Nelson, C.J., 1998.** Influence of Soil Texture on Alfalfa Autotoxicity. *Agronomy Journal* 90, 54–58. <https://doi.org/10.2134/agronj1998.00021962009000010010x>
- Jensen, P.E., Haldrup, A., Rosgaard, L., Scheller, H.V., 2003.** Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function. *Physiologia Plantarum* 119, 313–321. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00157.x>
- Jhala, A.J., Kumar, V., Yadav, R., Jha, P., Jugulam, M., Williams, M.M., Hausman, N.E., Dayan, F.E., Burton, P.M., Dale, R.P., Norsworthy, J.K., 2023.** 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD)-inhibiting herbicides: past, present, and future. *Weed Technology* 37, 1–14. <https://doi.org/10.1017/wet.2022.79>

- Kageyama, A., Ishizaki, K., Kohchi, T., Matsuura, H., Takahashi, K., 2015.** Abscisic acid induces biosynthesis of bisbibenzyls and tolerance to UV-C in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry* 117, 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.009>
- Kanazawa, T., Morinaka, H., Ebine, K., Shimada, T.L., Ishida, S., Minamino, N., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Kohchi, T., Nakano, A., Ueda, T., 2020.** The liverwort oil body is formed by redirection of the secretory pathway. *Nature Communications* 11, 6152. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19978-1>
- Kato, T., Kabuto, C., Sasaki, N., Tsunagawa, M., Aizawa, H., Fujita, K., Kato, Y., Kitahara, Y., Takahashi, N., 1973.** Momilactones, growth inhibitors from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron Letters* 14, 3861–3864. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)87058-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)87058-1)
- Kato-Noguchi, H., 2009.** Secretion of momilactone A and B by the moss *Hypnum plumaeforme*. *Plant Signaling & Behavior* 4, 737–739.
- Kato-Noguchi, H., Macías, F.A., 2008.** Inhibition of germination and α -amylase induction by 6-methoxy-2-benzoxazolinone in twelve plant species. *Biol Plant* 52, 351–354. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0072-x>
- Kato-Noguchi, H., Macías, F.A., 2005.** Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the germination and alpha-amylase activity in lettuce seeds. *Journal of Plant Physiology* 162, 1304–1307. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.03.013>
- Kerler, F., Schönherr, J., 1988.** Accumulation of lipophilic chemicals in plant cuticles: Prediction from octanol/water partition coefficients. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17, 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF01055146>
- Khanal, B.P., Knoche, M., 2017.** Mechanical properties of cuticles and their primary determinants. *Journal of Experimental Botany* 68, 5351–5367. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx265>
- Kim, H.U., 2020.** Lipid Metabolism in Plants. *Plants* 9, 871. <https://doi.org/10.3390/plants9070871>
- Kirkwood, R.C., 1999.** Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides†. *Pesticide Science* 55, 69–77. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199901\)55:1<69::AID-PS860>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199901)55:1<69::AID-PS860>3.0.CO;2-H)
- Koch, K., Barthlott, W., 2006.** Plant Epicuticular Waxes: Chemistry, Form, Self-Assembly and Function. *Natural Product Communications* 1, 1934578X0600101123. <https://doi.org/10.1177/1934578X0600101123>
- Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R., Messerschmidt, A., 2004.** Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in heme and chlorophyll biosynthesis. *The EMBO Journal* 23, 1720–1728. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600189>
- Kramer, D.M., Sacksteder, C.A., Cruz, J.A., 1999.** How acidic is the lumen? *Photosynthesis Research* 60, 151–163. <https://doi.org/10.1023/A:1006212014787>
- Krayesky, D., Leonardi, L., Chmielewski, J., 2018.** Bryophyte Flora of North America, Provisional Publication. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri.
- Kroymann, J., 2011.** Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.021>
- Kunz, H.-H., Scharnewski, M., Feussner, K., Feussner, I., Flügge, U.-I., Fulda, M., Gierth, M., 2009.** The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness. *Plant Cell* 21, 2733–2749. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064857>
- Labandeira, C.C., Tremblay, S.L., Bartowski, K.E., VanAller Hernick, L., 2014.** Middle Devonian liverwort herbivory and antiherbivore defence. *New Phytologist* 202, 247–258. <https://doi.org/10.1111/nph.12643>
- Lederer, B., Fujimori, T., Tsujino, Y., Wakabayashi, K., Böger, P., 2004.** Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.06.010>
- Lee, D.L., Prisbylla, M.P., Cromartie, T.H., Dagarin, D.P., Howard, S.W., Provan, W.M., Ellis, M.K., Fraser, T., Mutter, L.C., 1997.** The Discovery and Structural Requirements of Inhibitors of *p*-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Weed Science* 45, 601–609.

- Lee, Y.R., Choi, J.H., Yoon, S.H., 2005. Efficient and general method for the synthesis of benzopyrans by ethylenediamine diacetate-catalyzed reactions of resorcinols with α,β -unsaturated aldehydes. One step synthesis of biologically active (\pm)-confluentin and (\pm)-daurichromenic acid. *Tetrahedron Letters* 46, 7539–7543. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.08.159>
- Levin, S., Nani, R.R., Reisman, S.E., 2011. Enantioselective Total Synthesis of (+)-Salvileucalin B. *Journal of the American Chemical Society* 133, 774–776. <https://doi.org/10.1021/ja110192b>
- Li, D., Fu, D., Zhang, Y., Ma, X., Gao, L., Wang, X., Zhou, D., Zhao, K., 2017. Isolation, Purification, and Identification of Taxol and Related Taxanes from Taxol-Producing Fungus *Aspergillus niger* subsp. *taxi*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 1379–1385. <https://doi.org/10.4014/jmb.1701.01018>
- Lichtenthaler, H.K., Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C., 2000. The Non-Mevalonate Isoprenoid Biosynthesis of Plants as a Test System for New Herbicides and Drugs against Pathogenic Bacteria and the Malaria Parasite. *Zeitschrift für Naturforschung C* 55, 305–313. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-5-601>
- Liu, H., Xu, R.-X., Zhang, X.-S., Zhu, T.-T., Lou, H.-X., Cheng, A.-X., 2019. The identification and functional characterization of three liverwort class I *O*-methyltransferases. *Phytochemistry* 159, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.001>
- Liu, Q., Luo, L., Zheng, L., 2018. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 335. <https://doi.org/10.3390/ijms19020335>
- Liu, X.-S., Gao, B., Dong, Z.-D., Qiao, Z.-A., Yan, M., Han, W.-W., Li, W.-N., Han, L., 2021. Chemical Compounds, Antioxidant Activities, and Inhibitory Activities Against Xanthine Oxidase of the Essential Oils From the Three Varieties of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Receptacles. *Frontiers in Nutrition* 8.
- Lockett-Walters, B., Thuillier, S., Baudouin, E., Nay, B., 2022. Total Synthesis of Phytotoxic Radulanin A Facilitated by the Photochemical Ring Expansion of a 2,2-Dimethylchromene in Flow. *Organic Letters* 24, 4029–4033. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c01462>
- López-González, D., Graña, E., Teijeira, M., Verdeguer, M., Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A.M., Araniti, F., 2023. Similarities on the mode of action of the terpenoids citral and farnesene in Arabidopsis seedlings involve interactions with DNA binding proteins. *Plant Physiology and Biochemistry* 196, 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.02.004>
- Lu, Y.C., Luo, F., Pu, Z.J., Zhang, S., Huang, M.T., Yang, H., 2016. Enhanced detoxification and degradation of herbicide atrazine by a group of *O*-methyltransferases in rice. *Chemosphere* 165, 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.025>
- Ludwiczuk, A., Asakawa, Y., 2019. Bryophytes as a source of bioactive volatile terpenoids – A review. *Food and Chemical Toxicology* 132, 110649. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110649>
- Luo, X.-L., Li, N., Xu, M., Zhu, H.-T., He, P., Ding, Y., Zhao, P., Zhang, Y.-J., 2015. HPLC simultaneous determination of arbutin, chlorogenic acid and 6'-*O*-caffeoylarbutin in different parts of *Vaccinium dunalianum* Wight. *Natural Product Research* 29, 1963–1965. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1013472>
- Lyga, J.W., Patera, R.M., Theodoridis, G., Halling, B.P., Hotzman, F.W., Plummer, M.J., 1991. Synthesis and quantitative structure-activity relationships of herbicidal N-(2-fluoro-5-methoxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophthalimides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1667–1673. <https://doi.org/10.1021/jf00009a025>
- Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., 2003. Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals. CRC Press.
- Macías, F.A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Castellano, D., Simonet, A.M., Molinillo, J.M., 2006. Structure-activity relationship (SAR) studies of benzoxazinones, their degradation products, and analogues. Phytotoxicity on problematic weeds *Avena fatua* L. and *Lolium rigidum* Gaud. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1040–1048.
- Macías, F. A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., & Molinillo, J. M., 2009. Rediscovering the bioactivity and ecological role of 1,4-benzoxazinones. *Natural product reports*, 26(4), 478-489.
- Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M., Torres, A., Fronczek, F.R., 1994. Structural Elucidation and Chemistry of a Novel Family of Bioactive Sesquiterpenes: Heliannuols. *The Journal of Organic Chemistry* 59, 8261–8266. <https://doi.org/10.1021/jo00105a052>

- Macías, F.A. , Oliveros-Bastidas, A. , Marín, D. , Chinchilla, N. , Castellano, D. , Molinillo, J.M., 2014.** Evidence for an allelopathic interaction between rye and wild oats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 9450–9457.
- Maeda, H.A., 2019.** Evolutionary Diversification of Primary Metabolism and Its Contribution to Plant Chemical Diversity. *Frontiers in Plant Science* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00881>
- Malev, V.V., Kaulin, Y.A., Bezrukov, S.M., Gurnev, P.A., Takemoto, J.Y., Shchagina, L.V., 2001.** Kinetics of opening and closure of syringomycin E channels formed in lipid bilayers. *BMC Molecular and Cell Biology* 14, 813–829.
- Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M.-T., Sekaki, A., Gardès-Albert, M., 1994.** [46] Antioxidant action of Ginkgo biloba extract EGb 761, in: *Methods in Enzymology, Oxygen Radicals in Biological Systems Part D*. Academic Press, pp. 462–475. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34117-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34117-6)
- Marone, D., Mastrangelo, A.M., Borrelli, G.M., Mores, A., Laidò, G., Russo, M.A., Ficco, D.B.M., 2022.** Specialized metabolites: Physiological and biochemical role in stress resistance, strategies to improve their accumulation, and new applications in crop breeding and management. *Plant Physiology and Biochemistry* 172, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.037>
- Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., 1991.** Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: The effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution* 69, 223–235. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90146-N](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90146-N)
- Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., Plant, R.A., 1989.** Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution* 59, 71–86. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(89\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90022-5)
- Marschner, H., 2011.** Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants. *Academic Press*.
- Martínez-Abaiagar, J., Núñez-Olivera, E., 2021.** Chapter 11 - Novel biotechnological substances from bryophytes, in: *Natural Bioactive Compounds*. Academic Press, pp. 233–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820655-3.00011-2>
- Mata, R., Martínez-Luis, S., Pérez-Vásquez, A., 2007.** Phytotoxic compounds with calmodulin inhibitor properties from selected mexican fungi and plants, in: *Selected Topics in the Chemistry of Natural Products*. pp. 427–470. https://doi.org/10.1142/9789812790781_0013
- Matringe, M., Camadro, J.M., Labbe, P., Scalla, R., 1989.** Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochemical Journal* 260, 231–235. <https://doi.org/10.1042/bj2600231>
- Matsue, Y., Mizuno, H., Tomita, T., Asami, T., Nishiyama, M., Kuzuyama, T., 2010.** The herbicide ketoclozazole inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against *Haemophilus influenzae*. *J Antibiot* 63, 583–588. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.100>
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000.** Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659–668. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
- McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., 1998.** Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394, 531–532. <https://doi.org/10.1038/28970>
- Meazza, G., Scheffler, B.E., Tellez, M.R., Rimando, A.M., Romagni, J.G., Duke, S.O., Nanayakkara, D., Khan, I.A., Abourashed, E.A., Dayan, F.E., 2002.** The inhibitory activity of natural products on plant *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Phytochemistry* 60, 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00121-8)
- Medic, A., Zamljen, T., Hudina, M., Veberic, R., 2022.** Time-Dependent Degradation of Naphthoquinones and Phenolic Compounds in Walnut Husks. *Biology* 11, 342. <https://doi.org/10.3390/biology11020342>
- Mehmood, A., Ishaq, M., Zhao, L., Safdar, B., Rehman, A., Munir, M., Raza, A., Nadeem, M., Iqbal, W., Wang, C., 2019.** Natural compounds with xanthine oxidase inhibitory activity: A review. *Chemical Biology & Drug Design* 93, 387–418. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13437>
- Meihls, L.N., Handrick, V., Glauser, G., Barbier, H., Kaur, H., Haribal, M.M., Lipka, A.E., Gershenzon, J., Buckler, E.S., Erb, M., Köllner, T.G., Jander, G., 2013.** Natural variation in maize aphid resistance is associated with 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside methyltransferase activity. *Plant Cell* 25, 2341–2355. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.112409>

- Michel, Pascale, Burritt, D.J., Lee, W.G., 2011.** Bryophytes display allelopathic interactions with tree species in native forest ecosystems. *Oikos* 120, 1272–1280.
- Michel, P., McC Overton, J., Mason, N.W.H., Hurst, J.M., Lee, W.G., 2011.** Species-environment relationships of mosses in New Zealand indigenous forest and shrubland ecosystems. *Plant Ecology* 212, 353–367.
- Mitchell, R.E., Bielecki, R.L., 1977.** Involvement of Phaseolotoxin in Halo Blight of Beans: Transport and Conversion to Functional Toxin. *Plant Physiology* 60, 723–729. <https://doi.org/10.1104/pp.60.5.723>
- Mookerjee, S., Campbell, A.J., wiltshire, Z.D, K.J., 2021.** Method and cell line for production of phytocannabinoids and phytocannabinoid analogues in yeast. EP3583222A4.
- Motti, R., Palma, A.D., de Falco, B., 2023.** Bryophytes Used in Folk Medicine: An Ethnobotanical Overview. *Horticulturae* 9, 137. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020137>
- Mueller, C., Schwender, J., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., 2000.** Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Biochemical Society Transformations* 28, 792–793.
- Muszyńska, B., Sułkowska-Ziaja, K., Ekiert, H., 2013.** Analysis of indole compounds in methanolic extracts from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius* (the Chanterelle) and from the mycelium of this species cultured in vitro. *Journal of Food Science and Technology* 50, 1233–1237. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1009-8>
- Nakajima, M., Itoi, K., Takamatsu, Y., Sato, S., Furukawa, Y., Furuya, K., Honma, T., Kadotani, J., Kozasa, M., Haneishi, T., 1991.** Cornexistin: A new fungal metabolite with herbicidal activity. *The Journal of Antibiotics* 44, 1065–1072. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.1065>
- Nakayama, T., Fukushi, Y., Mizutani, J., Tahara, S., 1996.** Inhibiting Effects of Lunularic Acid Analogs on the Growth of Liverwort, Watercress, and Timothy Grass. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60, 862–865. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.862>
- Nandula, V.K., Vencill, W.K., 2015.** Herbicide Absorption and Translocation in Plants using Radioisotopes. *Weed Science* 63, 140–151. <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00107.1>
- Nandy, S., Dey, A., 2020.** Bibenzyls and bisbenzyls of bryophytic origin as promising source of novel therapeutics: pharmacology, synthesis and structure-activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 28, 701–734. <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00341-0>
- Nay, B., Baudouin, E., Zhang, W., 2020.** Use of Benzoxepin Derivatives as a Herbicide. WO2020207714 (A1).
- Nguyen, G.-N., Jordan, E.N., Kayser, O., 2022.** Protecting-Group-Free Synthesis of Novel Cannabinoid-Like 2,5-Dihydrobenzoxepines. *Synthesis* <https://doi.org/10.1055/s-0042-1751361>
- Niemeyer, H.M., 2009.** Hydroxamic Acids Derived from 2-Hydroxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one: Key Defense Chemicals of Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1677–1696. <https://doi.org/10.1021/jf8034034>
- Nikus, J., Daniel, G., Jonsson, L.M.V., 2001.** Subcellular localization of β -glucosidase in rye, maize and wheat seedlings. *Physiologia Plantarum* 111, 466–472. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110406.x>
- Norris, S.R., Barrette, T.R., DellaPenna, D., 1995.** Genetic dissection of carotenoid synthesis in Arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *The Plant Cell* 7, 2139–2149. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139>
- Nozaki, H., Hayashi, K., Nishimura, N., Kawaide, H., Matsuo, A., Takaoka, D., 2007.** Momilactone A and B as Allelochemicals from Moss *Hypnum plumaeforme*: First Occurrence in Bryophytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 3127–3130. <https://doi.org/10.1271/bbb.70625>
- Oettmeier, W., 1999.** Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cellular and Molecular Life Sciences* <https://doi.org/10.1007/s000180050370>
- Oršolić, D., Pehar, V., Šmuc, T., Štepanić, V., 2021.** Comprehensive machine learning based study of the chemical space of herbicides. *Scientific Reports* 11, 11479. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90690-w>
- O’Sullivan, A.C., 1997.** Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207. <https://doi.org/10.1023/A:1018431705579>
- Otoguro, K., Ishiyama, A., Iwatsuki, M., Namatame, M., Nishihara-Tukashima, A., Kiyohara, H., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Ōmura, S., Yamada, H., 2012.** In vitro antitrypanosomal activity of bis(bibenzyl)s and

- bibenzyls from liverworts against *Trypanosoma brucei*. *Journal of Natural Medicines* 66, 377–382. <https://doi.org/10.1007/s11418-011-0587-x>
- Owens, D.K., Nanayakkara, N.P.D., Dayan, F.E., 2013.** In planta Mechanism of Action of Leptospermone: Impact of Its Physico-Chemical Properties on Uptake, Translocation, and Metabolism. *Journal of Chemical Ecology* 39, 262–270. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0237-8>
- Paddon, C.J., Keasling, J.D., 2014.** Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature Reviews Microbiology* 12, 355–367. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3240>
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., Kishore, G.M., 1995.** Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. *Crop Science* 35, <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500050032x>
- Painter, T.J., 2003.** Concerning the wound-healing properties of Sphagnum holocellulose: the Maillard reaction in pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 145–148. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00189-2)
- Painter, T.J., 1998.** Carbohydrate polymers in food preservation: an integrated view of the Maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum-dominated peat bogs. *Carbohydrate Polymers* 36, 335–347. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00258-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00258-0)
- Paiva, A.P., 2017.** Recycling of Palladium from Spent Catalysts Using Solvent Extraction—Some Critical Points. *Metals* 7, 505. <https://doi.org/10.3390/met7110505>
- Palmeira, C.M., Moreno, A.J., Madeira, V.M.C., 1995.** Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1229, 187–192. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)00202-G](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)00202-G)
- Papackova, Z., Cahova, M., 2015.** Fatty Acid Signaling: The New Function of Intracellular Lipases. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 3831–3855. <https://doi.org/10.3390/ijms16023831>
- PATH, 2014.** *Stabilizing the Antimalarial Drug Supply: Semisynthetic Artemisinin Could Meet up to One-Third of Global Need.* <https://www.path.org/resources/stabilizing-the-antimalarial-drug-supply-semisynthetic-artemisinin-could-meet-up-to-one-third-of-global-need/> (accessed 7.28.23).
- Peek, J., Shi, T., Christendat, D., 2014.** Identification of Novel Polyphenolic Inhibitors of Shikimate Dehydrogenase. *Journal of Biomolecular Screening* 19, 1090–1098. <https://doi.org/10.1177/1087057114527127>
- Peters, B., Strek, H.J., 2018.** Herbicide discovery in light of rapidly spreading resistance and ever-increasing regulatory hurdles. *Pest Management Science* 74, 2211–2215. <https://doi.org/10.1002/ps.4768>
- Peterson, M.A., Collavo, A., Ovejero, R., Shivrain, V., Walsh, M.J., 2018.** The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest Management Science* 74, 2246–2259. <https://doi.org/10.1002/ps.4821>
- Pettit, G.R., Numata, A., Iwamoto, C., Usami, Y., Yamada, T., Ohishi, H., Cragg, G.M., 2006.** Antineoplastic Agents. 551. Isolation and Structures of Bauhiniastatins 1–4 from *Bauhinia purpurea*. *Journal of Natural Products* 69, 323–327. <https://doi.org/10.1021/np058075+>
- Pierce, L.A., Tarnow-Mordi, W.O., Cree, I.A., 1995.** Antibiotic effects on phagocyte chemiluminescence *in vitro*. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 25, 93–98. <https://doi.org/10.1007/BF02592364>
- Post-Beittenmiller, D., 1996.** Biochemistry and Molecular Biology of Wax Production in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 405–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.405>
- Pott, D.M., Osorio, S., Vallarino, J.G., 2019.** From Central to Specialized Metabolism: An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. *Frontiers in Plant Science* 10, 835. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>

- Protti, S., Ravelli, D., Fagnoni, M., 2019.** Wavelength dependence and wavelength selectivity in photochemical reactions. *Photochemical & Photobiological Sciences* 18, 2094–2101. <https://doi.org/10.1039/c8pp00512e>
- Pryce, R.J., 1971.** Lunularic acid, a common endogenous growth inhibitor of liverworts. *Planta* 97, 354–357. <https://doi.org/10.1007/BF00390214>
- Raj, V., Lee, J., 2020.** 2H/4H-Chromenes—A Versatile Biologically Attractive Scaffold. *Frontiers in Chemistry* 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00623>
- Rajasekharan, R., Sastry, P.S., 1990.** Effect of thiocarbamate, urea, and uracil herbicides on lipid metabolism in groundnut (*Arachis hypogaea*) leaves. *Biochemistry and Cell Biology* 68, 567–573. <https://doi.org/10.1139/o90-081>
- Rajasekharan, R., Sastry, P.S., 1987.** Effect of pyridazinone herbicides on lipid metabolism in groundnut (*Arachis hypogaea*) leaves. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 29, 163–175. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(87\)90075-7](https://doi.org/10.1016/0048-3575(87)90075-7)
- Ranty, B., Aldon, D., Galaud, J.-P., 2006.** Plant Calmodulins and Calmodulin-Related Proteins. *Plant Signaling & Behavior* 1, 96–104. <https://doi.org/10.4161%2Fpsb.1.3.2998>
- Reddy, M.V.B., Reddy, M.K., Gunasekar, D., Caux, C., Bodo, B., 2003.** A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry* 64, 879–882. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00416-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00416-3)
- Rehm, T.H., 2020.** Reactor Technology Concepts for Flow Photochemistry. *ChemPhotoChem* 4, 235–254. <https://doi.org/10.1002/cptc.201900247>
- Reis, M.H., Antunes, D., Santos, L.H.S., Guimarães, A.C.R., Caffarena, E.R., 2020.** Shared Binding Mode of Perrottetinene and Tetrahydrocannabinol Diastereomers inside the CB1 Receptor May Incentivize Novel Medicinal Drug Design: Findings from an *in silico* Assay. *ACS Chemical Neuroscience* 11, 4289–4300. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00547>
- Ren, H., Zhao, X., Li, W., Hussain, J., Qi, G., Liu, S., 2021.** Calcium Signaling in Plant Programmed Cell Death. *Cells* 10, 1089. <https://doi.org/10.3390/cells10051089>
- Rendina, A.R., Felts, J.M., 1988.** Cyclohexanedione Herbicides Are Selective and Potent Inhibitors of Acetyl-CoA Carboxylase from Grasses. *Plant Physiology* 86, 983–986. <https://doi.org/10.1104/pp.86.4.983>
- Rice, E.L., 1985.** Allelopathy — An Overview, in: *Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms, Recent Advances in Phytochemistry*. Springer US, Boston, MA, pp. 81–105. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9658-2_4
- Riemens, M.M., Dueck, T., Kempenaar, C., 2008.** Predicting sublethal effects of herbicides on terrestrial non-crop plant species in the field from greenhouse data. *Environmental Pollution* 155, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.034>
- Riemens, M.M., Dueck, T., Kempenaar, C., Lotz, L.A.P., Kropff, M.J.J., 2009.** Sublethal effects of herbicides on the biomass and seed production of terrestrial non-crop plant species, influenced by environment, development stage and assessment date. *Environmental Pollution* 157, 2306–2313. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.03.037>
- Ro, D.-K., Paradise, E.M., Ouellet, M., Fisher, K.J., Newman, K.L., Ndungu, J.M., Ho, K.A., Eachus, R.A., Ham, T.S., Kirby, J., Chang, M.C.Y., Withers, S.T., Shiba, Y., Sarpong, R., Keasling, J.D., 2006.** Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440, 940–943. <https://doi.org/10.1038/nature04640>
- Romagnì, J.G., Allen, S.N., Dayan, F.E., 2000.** Allelopathic Effects of Volatile Cineoles on Two Weedy Plant Species. *Journal of Chemical Ecology* 26, 303–313. <https://doi.org/10.1023/A:1005414216848>
- Romani, F., Banić, E., Florent, S.N., Kanazawa, T., Goodger, J.Q.D., Mentink, R.A., Dierschke, T., Zachgo, S., Ueda, T., Bowman, J.L., Tsiantis, M., Moreno, J.E., 2020.** Oil Body Formation in *Marchantia polymorpha* Is Controlled by MpC1HDZ and Serves as a Defense against Arthropod Herbivores. *Current Biology* 30, 2815–2828.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.081>
- Romani, F., Flores, J.R., Tolopka, J.I., Suárez, G., He, X., Moreno, J.E., 2022.** Liverwort oil bodies: diversity, biochemistry, and molecular cell biology of the earliest secretory structure of land plants. *Journal of Experimental Botany* 73, 4427–4439. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac134>

- Ruiter, H.D., Uffing, A., Dijk, N.V., 2000. The influence of growth stage of weeds on the glyphosate dose needed.
- Rutherford, A.W., Krieger-Liszkay, A., 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 648–653. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01953-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01953-3)
- Sabina, R.L., Paul, A.-L., Ferl, R.J., Laber, B., Lindell, S.D., 2007. Adenine Nucleotide Pool Perturbation Is a Metabolic Trigger for AMP Deaminase Inhibitor-Based Herbicide Toxicity. *Plant Physiology* 143, 1752–1760. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096487>
- Sabzehzari, M., Zeinali, M., Naghavi, M.R., 2020. Alternative sources and metabolic engineering of Taxol: Advances and future perspectives. *Biotechnology Advances* 43, 107569. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107569>
- Sambiagio, C., Noël, T., 2020. Flow Photochemistry: Shine Some Light on Those Tubes! *Trends in Chemistry* 2, 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.09.003>
- Sammons, R.D., Gaines, T.A., 2014. Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science* 70, 1367–1377. <https://doi.org/10.1002/ps.3743>
- Scavo, A., Abbate, C., Mauromicale, G., 2019. Plant allelochemicals: agronomic, nutritional and ecological relevance in the soil system. *Plant Soil* 442, 23–48. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04190-y>
- Schandry, N., Becker, C., 2020. Allelopathic Plants: Models for Studying Plant–Interkingdom Interactions. *Trends in Plant Science* 25, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.11.004>
- Scheller, H.V., Jensen, P.E., Haldrup, A., Lunde, C., Knoetzel, J., 2001. Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1507, 41–60. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00196-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00196-7)
- Schlegel, B., Härtl, A., Gollmick, F.A., Gräfe, U., 2003. 7-Methoxy-2, 3-dimethylbenzofuran-5-ol, a New Antioxidant from *Malbranchea cinnamomea*. *The Journal of Antibiotics* 56, 792–794. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.792>
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W.A., Schloss, J.V., Amrhein, N., Evans, J.N.S., Kabsch, W., 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 1376–1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1376>
- Schrock, R.R., Hoveyda, A.H., 2003. Molybdenum and Tungsten Imido Alkylidene Complexes as Efficient Olefin-Metathesis Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition* 42, 4592–4633. <https://doi.org/10.1002/anie.200300576>
- Schulz, M., Knop, M., Kant, S., Sicker, D., Voloshchuk, N., Gryganskyi, A., 2005. Detoxification of allelochemicals—The case of bezoxazolin-2(3H)-one(BOA), in: *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. pp. 157–170. https://doi.org/10.1007/1-4020-4280-9_8
- Schuster, R.M., 1992. The Oil-Bodies of the Hepaticae. I. Introduction. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 72, 151–162. https://doi.org/10.18968/jhbl.72.0_151
- Schuster, R.M., Hattori, S., 1954. The Oil-Bodies of the Hepaticae. II. the Lejeuneaceae. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 11, 11–86. https://doi.org/10.18968/jhbl.11.0_11
- Schwartner, C., Bors, W., Michel, C., Franck, U., Müller-Jakic, B., Nenninger, A., Asakawa, Y., 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. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80055-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80055-3)
- Shen, S., Zhan, C., Yang, C., Fernie, A.R., Luo, J., 2023. Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: Past decade and future perspectives. *Molecular Plant* 16, 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.09.007>
- Shino, M., Hamada, T., Shigematsu, Y., Hirase, K., Banba, S., 2018. Action mechanism of bleaching herbicide cyclopyrimorate, a novel homogentisate solanesyltransferase inhibitor. *Journal of Pest Science* 43, 233–239. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D18-008>
- Shone, M.G.T., Bartlett, B.O., Wood, A.V., 1974. A Comparison of the Uptake and Translocation of Some Organic Herbicides and a Systemic Fungicide by Barley: II. Relationship between uptake by roots and translocation to shoots. *Journal of Experimental Botany* 25, 401–409. <https://doi.org/10.1093/jxb/25.2.401>

- Sikorski, J.A., Gruys, K.J., 1997.** Understanding Glyphosate's Molecular Mode of Action with EPSP Synthase: Evidence Favoring an Allosteric Inhibitor Model. *Accounts of Chemical Research* 30, 2–8. <https://doi.org/10.1021/ar950122+>
- Simmons, K.A., Dixon, J.A., Halling, B.P., Plummer, E.L., Plummer, M.J., Tymonko, J.M., Schmidt, R.J., Wyle, M.J., Webster, C.A., Bayer, W.A., 1992.** Synthesis and activity optimization of herbicidal substituted 4-aryl-1,2,4-triazole-5(1H)-thiones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 297–305. <https://doi.org/10.1021/jf00014a027>
- Soderquist, C.J., 1973.** Juglone and allelopathy. *Journal of Chemical Education* 50, 782–783. <https://doi.org/10.1021/ed050p782>
- Sparks, T.C., Bryant, R.J., 2021.** Crop protection compounds – trends and perspective. *Pest Management Science* 77, 3608–3616. <https://doi.org/10.1002/ps.6293>
- Srivastava, L.M., 2002.** Chapter 2 - Cell Wall, Cell Division, and Cell Growth, in: *Plant Growth and Development*. Academic Press, San Diego, pp. 23–74. <https://doi.org/10.1016/B978-012660570-9/50142-8>
- Stahl, E., 1888.** Pflanzen und Schnecken: eine biologische Studie über die Schutzmittel der Pflanzen gegen Schneckenfrass. G. Fischer.
- Stirbet, A., Govindjee, 2011.** On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 104, 236–257. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010>
- Stalheim, T., Ballance, S., Christensen, B.E., Granum, P.E., 2009.** Sphagnum – a pectin-like polymer isolated from Sphagnum moss can inhibit the growth of some typical food spoilage and food poisoning bacteria by lowering the pH. *Journal of Applied Microbiology* 106, 967–976. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04057.x>
- Staszek, P., Krasuska, U., Ciacka, K., Gniadzowska, A., 2021.** ROS Metabolism Perturbation as an Element of Mode of Action of Allelochemicals. *Antioxidants* 10, 1648. <https://doi.org/10.3390/antiox10111648>
- Stefinovic, M., Snieckus, V., 1998.** Connecting Directed *ortho* Metalation and Olefin Metathesis Strategies. Benzene-Fused Multiring-Sized Oxygen Heterocycles. First Syntheses of Radulanin A and Helianane. *The Journal of Organic Chemistry* 63, 2808–2809. <https://doi.org/10.1021/jo980299s>
- Sterling, T.M., 1994.** Mechanisms of Herbicide Absorption Across Plant Membranes and Accumulation in Plant Cells. *Weed Science* 42, 263–276. <https://doi.org/10.1017/S0043174500080383>
- Stevens, N.E., 1910.** Discoid Gemmae in the Leafy Hepatics of New England. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 37, 365–373. <https://doi.org/10.2307/2479264>
- Stirbet, A., Lazár, D., Guo, Y., Govindjee, G., 2020.** Photosynthesis: basics, history and modelling. *Annals of Botany* 126, 511–537. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz171>
- Strugstad, M., Despotovski, S., 2012.** A Summary of Extraction, Synthesis, Properties, and Potential Uses of Juglone: A Literature Review. *Journal of Ecosystems and Management* 13. <https://doi.org/10.22230/jem.2012v13n3a119>
- Sun, H., Tawa, G., Wallqvist, A., 2012.** Classification of scaffold-hopping approaches. *Drug Discovery Today* 17, 310–324. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.10.024>
- Takahashi, H., Asakawa, Y., 2017.** Transcriptome Analysis of Marchantin Biosynthesis from the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Natural Product Communications* 12, 8. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200831>
- Takahashi, L., Sert, M.A., Kelmer-Bracht, A.M., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., 1998.** Effects of rutin and quercetin on mitochondrial metabolism and on ATP levels in germinating tissues of *Glycine max*. *Plant Physiology and Biochemistry* 36, 495–501. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80174-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80174-5)
- Takahashi, N., Kato, T., Tsunagawa, M., Sasaki, N., Kitahara, Y., 1976.** Mechanisms of Dormancy in Rice Seeds : II. New Growth Inhibitors, Momilactone-A and-B Isolated from the Hulls of Rice Seeds. *Japanese Journal of Breeding* 26, 91–98. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.26.91>
- Takahashi, R., Hasegawa, K., Takano, A., Noguchi, T., 2010.** Structures and Binding Sites of Phenolic Herbicides in the Q_B Pocket of Photosystem II. *Biochemistry* 49, 5445–5454. <https://doi.org/10.1021/bi100639q>

- Takano, H.K., Beffa, R., Preston, C., Westra, P., Dayan, F.E., 2020.** A novel insight into the mode of action of glufosinate: how reactive oxygen species are formed. *Photosynthesis Research* 144, 361–372. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00749-4>
- Takano, H.K., Dayan, F.E., 2020.** Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Management Science* 76, 3911–3925. <https://doi.org/10.1002/ps.5965>
- Tateno, M., Brabham, C., DeBolt, S., 2016.** Cellulose biosynthesis inhibitors – a multifunctional toolbox. *Journal of Experimental Botany* 67, 533–542. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv489>
- Tharayil, N., Bhowmik, P.C., Xing, B., 2008.** Bioavailability of allelochemicals as affected by companion compounds in soil matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 3706–3713. <https://doi.org/10.1021/jf073310a>
- Tharayil, N., Bhowmik, P.C., Xing, B., 2006.** Preferential Sorption of Phenolic Phytotoxins To Soil: Implications for Altering the Availability of Allelochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3033–3040. <https://doi.org/10.1021/jf053167q>
- Theodoridis, G., 1997.** Structure–Activity Relationships of Herbicidal Aryltriazolinones. *Pesticide Science* 50, 283–290. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199708\)50:4<283::AID-PS600>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199708)50:4<283::AID-PS600>3.0.CO;2-L)
- Theodoridis, G., Bahr, J.T., Hotzman, F.W., Saroj Sehgel, Suarez, D.P., 2000.** New generation of protox-inhibiting herbicides. *Crop Protection* 19, 533–535. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00069-7)
- Thuillier, S., Viola, S., Lockett-Walters, B., Nay, B., Bailleul, B., Baudouin, E., 2023.** Mode-of-action of the natural herbicide radulanin A as an inhibitor of photosystem II. *Pest Management Science* <https://doi.org/10.1002/ps.7609>
- Toutenhoofd, S.L., Strehler, E.E., 2000.** The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell Calcium* 28, 83–96. <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0136>
- Toyota, M., Kinugawa, T., Asakawa, Y., 1994.** Bibenzyl cannabinoid and bisbibenzyl derivative from the liverwort *Radula perrottetii*. *Phytochemistry* 37, 859–862. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90371-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90371-6)
- Toyota, M., Shimamura, T., Ishii, H., Renner, M., Braggins, J., Asakawa, Y., 2002.** New Bibenzyl Cannabinoid from the New Zealand Liverwort *Radula marginata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50, 1390–1392. <https://doi.org/10.1248/cpb.50.1390>
- Trapp, S., 2000.** Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Management Science* 56, 767–778. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200009\)56:9<767::AID-PS198>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200009)56:9<767::AID-PS198>3.0.CO;2-Q)
- Trebst, A., 1987.** The Three-Dimensional Structure of the Herbicide Binding Niche on the Reaction Center Polypeptides of Photosystem II. *Zeitschrift für Naturforschung C* 42, 742–750. <https://doi.org/10.1515/znc-1987-0616>
- Trenkamp, S., Eckes, P., Busch, M., Fernie, A.R., 2009.** Temporally resolved GC-MS-based metabolic profiling of herbicide treated plants reveals that changes in polar primary metabolites alone can distinguish herbicides of differing mode of action. *Metabolomics* 5, 277–291. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0149-8>
- Trenkamp, S., Martin, W., Tietjen, K., 2004.** Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 11903–11908. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404600101>
- Tuba, Z., Slack, N.G., Stark, L.R., 2011.** *Bryophyte Ecology and Climate Change*. Cambridge University Press.
- Tuten, B.T., Menzel, J.P., Pahnke, K., Blinco, J.P., Barner-Kowollik, C., 2017.** Pyreneacyl sulfides as a visible light-induced versatile ligation platform. *Chemical Communications* 53, 4501–4504. <https://doi.org/10.1039/C7CC00711F>
- Ugarte, R., 2014.** Interaction between glyphosate and mitochondrial succinate dehydrogenase. *Computational and Theoretical Chemistry* 1043, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2014.05.018>
- Valencia-Islas, N., Abbas, H., Bye, R., Toscano, R., Mata, R., 2002.** Phytotoxic compounds from *Prionosciadium watsoni*. *Journal of Natural Products* 65, 828–834. <https://doi.org/10.1021/np010448t>

- Vandekerckhove, B., Piens, N., Metten, B., Stevens, C.V., Heugebaert, T.S.A., 2022.** Practical Ferrioxalate Actinometry for the Determination of Photon Fluxes in Production-Oriented Photoflow Reactors. *Organic Process Research & Development* 26, 2392–2402. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.2c00079>
- Venturelli, S., Belz, R.G., Kämper, A., Berger, A., von Horn, K., Wegner, A., Böcker, A., Zabulon, G., Langenecker, T., Kohlbacher, O. and Barneche, F., 2015.** Plants release precursors of histone deacetylase inhibitors to suppress growth of competitors. *The Plant Cell*, 27(11), pp.3175–3189.
- Villalain, J., Mateo, C.R., Aranda, F.J., Shapiro, S., Micol, V., 2001.** Membranotropic Effects of the Antibacterial Agent Triclosan. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 390, 128–136. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2356>
- Voss, K.A., Riley, R.T., 2013.** Fumonisin Toxicity and Mechanism of Action: Overview and Current Perspectives. *Food Safety* 1, 2013006–2013006. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2013006>
- Wang, C.-H., Zhang, C., Xing, X.-H., 2016.** Xanthine dehydrogenase: An old enzyme with new knowledge and prospects. *Bioengineered* 7, 395–405. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1206168>
- Wang, H., Yao, Q., Guo, Y., Zhang, Q., Wang, Z., Strasser, R.J., Valverde, B.E., Chen, S., Qiang, S., Kalaji, H.M., 2022.** Structure-based ligand design and discovery of novel tenuazonic acid derivatives with high herbicidal activity. *Journal of Advanced Research* 40, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.001>
- Wang, K., Zheng, X., Yang, Q., Zhang, H., Apaliya, M.T., Dhanasekaran, S., Zhang, X., Zhao, L., Li, J., Jiang, Z., 2019.** S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferase Helps *Pichia caribbica* Degrade Patulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, 11758–11768. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05144>
- Wang, T.S.C., Li, S.W., Ferng, Y.L., 1978.** Catalytic polymerization of phenolic compounds by clay minerals. *Soil Science* 126, 15.
- Wang, X., Li, L., Zhu, R., Zhang, J., Zhou, J., Lou, H., 2017.** Bibenzyl-Based Meroterpenoid Enantiomers from the Chinese Liverwort *Radula sumatrana*. *Journal of Natural Products* 80, 3143–3150. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00394>
- Wasternack, C., 2004.** Jasmonates—Biosynthesis and Role in Stress Responses and Developmental Processes, in: *Plant Cell Death Processes*. Elsevier, pp. 143–155. <https://doi.org/10.1016/B978-012520915-1/50012-6>
- Weber, H.A., Gloer, J.B., 1988.** Interference Competition Among Natural Fungal Competitors: an Antifungal Metabolite from the Coprophilous Fungus *Preussia fleischhakkii*. *Journal of Natural Products* 51, 879–883. <https://doi.org/10.1021/np50059a011>
- Werdan, K., Heldt, H.W., Milovancev, M., 1975.** The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO₂ fixation in the light and dark. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 396, 276–292. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90041-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90041-9)
- Weston, L.A., Czarnota, M.A., 2001.** Activity and persistence of sorgoleone, a long-chain hydroquinone produced by *Sorghum bicolor*. *Journal of Crop Improvement* 4, 363–377. https://doi.org/10.1300/J144v04n02_17
- White, C.S., 1994.** Monoterpenes: Their effects on ecosystem nutrient cycling. *Journal of Chemical Ecology* 20, 1381–1406. <https://doi.org/10.1007/BF02059813>
- White, C.S., 1986.** Volatile and water-soluble inhibitors of nitrogen mineralization and nitrification in a ponderosa pine ecosystem. *Biology and Fertility of Soils* 2, 97–104. <https://doi.org/10.1007/BF00257586>
- Whitehead, J., Wittemann, M., Cronberg, N., 2018.** Allelopathy in bryophytes - a review. *Lindbergia* 41(1). <https://doi.org/10.25227/linbg.01097>
- Widhalm, J.R., Rhodes, D., 2016.** Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Horticulture Research* 3, 16046. <https://doi.org/10.1038/hortres.2016.46>
- Wink, M., 2010.** Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites, in: *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–19. <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch1>
- Winter, G., Todd, C.D., Trovato, M., Forlani, G., Funck, D., 2015.** Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00534>
- Wishart, D.S., 2019.** Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. *Physiological Reviews* 99, 1819–1875. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2018>

- Wouters, F.C., Gershenzon, J., Vassão, D.G., 2016.** Benzoxazinoids: Reactivity and Modes of Action of a Versatile Class of Plant Chemical Defenses. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27, 1379–1397. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160177>
- Wriedt, B., Ziegenbalg, D., 2021.** Application Limits of the Ferrioxalate Actinometer. *ChemPhotoChem* 5, 947–956. <https://doi.org/10.1002/cptc.202100122>
- Wu, X.-Z., Cheng, A.-X., Sun, L.-M., Sun, S.-J., Lou, H.-X., 2009.** Plagiochin E, an antifungal bis(bibenzyl), exerts its antifungal activity through mitochondrial dysfunction-induced reactive oxygen species accumulation in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1790, 770–777. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.002>
- Wu, Y.-F., Zhao, Y., Liu, X.-Y., Gao, S., Cheng, A.-X., Lou, H.-X., 2018.** A bHLH Transcription Factor Regulates Bisbibenzyl Biosynthesis in the Liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. *Plant and Cell Physiology* 59, 1187–1199. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy053>
- Xi, J., Xu, P., Xiang, C.-B., 2012.** Loss of AtPDR11, a plasma membrane-localized ABC transporter, confers paraquat tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 69, 782–791. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04830.x>
- Xie, C.-F., Lou, H.-X., 2009.** Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect. *Chemistry & Biodiversity* 6, 303–312. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200700450>
- Xu, L., Zhu, H., Ozkan, H.E., Bagley, W.E., Krause, C.R., 2011.** Droplet evaporation and spread on waxy and hairy leaves associated with type and concentration of adjuvants. *Pest Management Science* 67, 842–851. <https://doi.org/10.1002/ps.2122>
- Yang, X., Guschina, I.A., Hurst, S., Wood, S., Langford, M., Hawkes, T., Harwood, J.L., 2010.** The action of herbicides on fatty acid biosynthesis and elongation in barley and cucumber. *Pest Management Science* 66, 794–800. <https://doi.org/10.1002/ps.1944>
- Yang, Z., 1998.** On the Best Evolutionary Rate for Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology* 47, 125–133. <https://doi.org/10.1080/106351598261067>
- Yoshida, M., Nakatani, K., Shishido, K., 2009.** Total synthesis of radulanin H and proposed structure of radulanin E. *Tetrahedron* 65, 5702–5708. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.05.027>
- Yoshikawa, H., Ichiki, Y., Sakakibara, K., Tamura, H., Suiko, M., 2002.** The Biological and Structural Similarity between Lunularic Acid and Abscisic Acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66, 840–846. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.840>
- Yueh, H., Gao, Q., Porco, J.A., Beeler, A.B., 2017.** A photochemical flow reactor for large scale syntheses of aglain and rocaglate natural product analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25, 6197–6202. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.010>
- Zabalza, A., Orcaray, L., Fernández-Escalada, M., Zulet-González, A., Royuela, M., 2017.** The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 141, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.12.005>
- Zarepour, M., Kaspari, K., Stagge, S., Rethmeier, R., Mendel, R.R., Bittner, F., 2010.** Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Molecular Biology* 72, 301–310. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9570-2>
- Zeng, H.-Y., Bao, H.-N., Chen, Y.-L., Chen, D.-K., Zhang, K., Liu, S.-K., Yang, L., Li, Y.-K., Yao, N., 2022.** The Two Classes of Ceramide Synthases Play Different Roles in Plant Immunity and Cell Death. *Frontiers in Plant Science* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.824585>
- Zhang, H., Liao, G., Luo, X., Tang, X., 2022.** Harnessing nature's biosynthetic capacity to facilitate total synthesis. *National Science Review* 9, nwac178. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwac178>
- Zhang, J., Fu, X.-X., Li, R.-Q., Zhao, X., Liu, Y., Li, M.-H., Zwaenepoel, A., Ma, H., Goffinet, B., Guan, Y.-L., Xue, J.-Y., Liao, Y.-Y., Wang, Q.-F., Wang, Q.-H., Wang, J.-Y., Zhang, G.-Q., Wang, Z.-W., Jia, Y., Wang, M.-Z., Dong, S.-S., Yang, J.-F., Jiao, Y.-N., Guo, Y.-L., Kong, H.-Z., Lu, A.-M., Yang, H.-M., Zhang, S.-Z., Van de Peer, Y., Liu, Z.-J., Chen, Z.-D., 2020.** The hornwort genome and early land plant evolution. *Nature Plants* 6, 107–118. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0588-4>

- Zhang, W., Baudouin, E., Cordier, M., Frison, G., Nay, B., 2019.** One-Pot Synthesis of Metastable 2,5-Dihydrooxepines through Retro-Claisen Rearrangements: Method and Applications. *Chemistry – A European Journal* 25, 8643–8648. <https://doi.org/10.1002/chem.201901675>
- Zhang, Z., Liu, Y., Yuan, L., Weber, E., van Kleunen, M., 2021.** Effect of allelopathy on plant performance: a meta-analysis. *Ecology Letters* 24, 348–362. <https://doi.org/10.1111/ele.13627>
- Zhou, C., Luo, X., Chen, N., Zhang, L., Gao, J., 2020.** C–P Natural Products as Next-Generation Herbicides: Chemistry and Biology of Glufosinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 3344–3353. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00052>
- Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., Liu, K.K., 2007.** Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.04.004>
- Zimdahl, R.L., 2007.** *Fundamentals of weed science*, third edition. ed. Elsevier, Amsterdam.

Production scientifique

- **Articles :**

Total Synthesis of Phytotoxic Radulanin A Facilitated by the Photochemical Ring Expansion of a 2,2-Dimethylchromene in Flow. Bruce Lockett-Walters, Simon Thuillier, Emmanuel Baudouin, et Bastien Nay. *Organic Letters*, 2022, 24 (22), 4029-4033.

Mode-of-action of the natural herbicide radulanin A as an inhibitor of photosystem II. Simon Thuillier, Stefania Viola, Bruce Lockett-Walters, Benjamin Bailleul, Bastien Nay et Emmanuel Baudouin. *Pest Management Science*, 2023.

- **Brevets :**

Procédé de synthèse de benzoxépines biologiquement actives - Bastien Nay, Bruce Lockett-Walters, Simon Thuillier

Composés herbicides naturels et analogues à noyau chromane ou chromène - Bastien Nay, Emmanuel Baudouin, Bruce Lockett-Walters, Simon Thuillier

- **Conférences :**

Trends in Natural Products Research: A PSE Young Scientists' Meeting par Société Phytochimique d'Europe – Faculté de Pharmacie Paris-Cité, Paris. 28-30 juin 2023. *Deciphering the mode of action of a phytotoxic natural product, radulanin A: From total synthesis to photosynthesis* - **Présentation orale**

Séminaire BIS – Laboratoire de Biologie du Développement – Institut de Biologie Paris-Seine, Paris. 14 mars 2023. *Deciphering the mode of action of a natural phytotoxic compound, Radulanin A* – **Présentation orale**

Journées de la Chimie Organique (JCO) par la Division Chimie Organique de la Société Chimique de France – Ecole Polytechnique, Palaiseau. 2-4 novembre 2022. *From total synthesis to photosynthesis, a detective journey to the site of action of a phytotoxic natural product* – **Présentation poster**, prix Servier & DCO « Best poster prize of the JCO2022 »

Journées Boris Ephrussi de l'ED515 Complexité du vivant – Sorbonne Université, Paris. 27&28 mai 2021 et 5&6 mai 2022 – **Présentations poster**

Etude du mode d'action de la radulanine A, une molécule phytotoxique d'origine naturelle

Les radulanines sont des composés bibenzyls présents dans les hépatiques du genre *Radula*. En 2019, des expériences menées dans nos laboratoires ont révélé l'activité phytotoxique de la radulanine A sur *Arabidopsis thaliana*. Les travaux présentés dans ce manuscrit mettent en lumière les processus biologiques affectés par la radulanine A au sein des plantules traitées. Afin de permettre ces études biologiques, une nouvelle méthode de synthèse de la radulanine A a d'abord été développée, employant une réaction finale de photochimie en flux. Divers analogues structuraux ont été obtenus *via* cette nouvelle voie, et ont permis de mieux comprendre la relation entre structure et phytotoxicité de la radulanine A. L'impact du traitement phytotoxique sur la photosynthèse a été étudié en profondeur par des études de fluorescence des chlorophylles et de thermoluminescence. Ces études ont permis de caractériser la radulanine A comme un inhibiteur du site Q_B de la protéine D1 constituant le photosystème II. De façon intéressante, le précurseur de synthèse de la radulanine A, un analogue à la fonction chromène également présent chez les *Radulae*, a montré une efficacité et un mode d'action identique à la radulanine A. Ce chromène étant davantage disponible, son impact sur le métabolisme des plantules d'*Arabidopsis* a été étudié *via* une approche métabolomique par GC-MS. Son application induit une réduction de la quantité de la plupart des métabolites détectés, suggérant un impact sur la globalité du métabolisme primaire des plantules. Des expériences préliminaires ont été réalisées pour établir un lien fonctionnel entre l'effet du précurseur chromène sur le métabolisme et sa phytotoxicité.

Mots-clés : herbicide, synthèse totale, photosynthèse, métabolomique

Investigating the mode of action of radulanine A, a phytotoxic natural product

Radulanins are bibenzyl compounds found in liverworts of the *Radula* genus. In 2019, experiments conducted in our laboratories revealed the phytotoxic activity of radulanine A on *Arabidopsis thaliana*. The work of this thesis highlights the biological processes affected by radulanine A within treated seedlings. To enable these biological studies, a new approach to radulanine A synthesis was first developed, employing a final flow photochemistry reaction. Various structural analogues were obtained *via* this new route, leading to a better understanding of the relationship between structure and phytotoxicity of radulanine A. The impact of the phytotoxic treatment on photosynthesis was studied in depth using chlorophyll fluorescence and thermoluminescence studies. These studies characterized radulanine A as an inhibitor of the Q_B site of the D1 protein of photosystem II. Interestingly, the synthetic precursor of radulanine A, a chromene analog also present in *Radulae*, showed identical activity and mode of action. As this chromene is more readily available, its impact on the metabolism of *Arabidopsis* seedlings was studied using a GC-MS metabolomics approach. Its application induced a reduction in the quantity of most of the metabolites detected, suggesting an impact on the overall primary metabolism of seedlings. Preliminary experiments were carried out to establish a functional link between the effect of the chromene precursor on metabolism and its phytotoxicity.

Keywords: herbicide, total synthesis, photosynthesis, metabolomics