

Pour le soutien de la recherche sur les plantes de santé, beauté et bien-être

Share est un fonds de dotation destiné à soutenir la recherche sur les plantes de santé, beauté, bien-être et ses premiers donateurs sont heureux de vous proposer cette troisième lettre d'information.

Dans cette édition, nous revenons sur une conférence du Professeur Frédéric Bourgaud, Directeur du Laboratoire d'Université de Lorraine et Vice-président de Plants Advanced Technologie SA, membre du Conseil scientifique de l'iteipmai, donnée à la séance dédiée au PPAM à l'Académie d'Agriculture de France. Elle a pour thème l'apport des sciences cognitives à la production et à la valorisation des métabolites secondaires.

Un second article traite des premiers résultats d'une étude animée par l'iteipmai, ThermoPAM, qui s'est attaché à évaluer et tester des méthodes de thérapie pour la désinfection des semences de fenouil et de persil.

Ces deux sujets illustrent le dynamisme qui existe en matière de recherche et la nécessité de soutenir son développement.

N° 3

novembre 2014

© PAT

Suivez les pionniers et rejoignez le club des premiers donateurs : www.sharepam.eu

Actions auxquelles SHARE a apporté un cofinancement :

- Valorisation des ressources génétiques pour créer de nouvelles variétés de lavande, lavandin, sauge sclérée, thym, romarin, cynara, valériane,
- Maîtrise des maladies, ravageurs et adventices,
- Développement et expérimentation de l'agriculture biologique par la mise au point de techniques de production adaptées,
- Amélioration des techniques d'évaluation de la qualité et contribution à la fixation des normes.

EVEAR / Extraits d'Anjou

**distillerie
Bleu
PROVENCE**

NAT INOV

Fytosan

APS
Ardennes Plantes Santé

Daregal

EARL du Patuet

PHARMANAGER
Ingredients

**SA Plantes
Aromatiques
du Diois**

PMA 28

Gel'Pam

DUJARDIN GROUP • Food you can trust

LES QUESTIONS ET TRAVAUX DE RECHERCHE NÉCESSAIRES AU DÉVELOPPEMENT DE LA FILIÈRE ; EXEMPLE DE L'APPORT DES SCIENCES COGNITIVES À LA PRODUCTION/VALORISATION DES MÉTABOLITES SECONDAIRES



Par le Professeur Frédéric BOURGAUD

Introduction sur le métabolisme secondaire

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Ce concept est historiquement attribué à Kossel (Kossel, 1891) qui l'introduisit par opposition à celui de métabolites primaires, ces derniers étant directement impliqués dans les grandes voies du métabolisme basal de la cellule. Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tels que les polyphénols, les terpènes et stéroïdes, les alcaloïdes, les polycétides, etc. Outre la très grande diversité chimique qu'ils représentent, ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végé-

taux (généralement quelques pourcents du carbone total, si on exclut la lignine de cette catégorie) ainsi que par leur stockage souvent réalisé dans des cellules ou organes dédiés. Pour ce qui concerne leurs fonctions chez les plantes, les métabolites secondaires exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. Ils assurent des fonctions clés dans la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température, etc.). Sur le plan agronomique, le rôle de ces composés dans la protection des cultures est connu (résistance aux maladies cryptogamiques, aux infections bactériennes, à certains insectes), mais a été relativement peu exploité pour ce qui concerne le développement de variétés résistantes. Ces métabolites secondaires constituent, aujourd'hui,

un des leviers d'une possible intensification écologique de l'agriculture, en substituant notamment l'usage d'intrants chimiques par des mécanismes de défense naturelle des plantes. D'un point de vue pharmacologique, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux et on estime aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale (Newman and Cragg, 2012). Cette efficacité pharmacologique des métabolites secondaires s'est traduite par le développement de médicaments majeurs sur les 30 dernières années, tels que le Taxotère® (Sanofi-Aventis), ou la Vinorelbine® (Pierre Fabre Médicaments) utilisés dans le traitement de certains cancers.

Synthèse de métabolites secondaires chez les végétaux

De nombreuses familles de métabolites secondaires ont fait l'objet de recherches actives lors des 30 dernières années et certains processus de synthèse sont aujourd'hui bien décrits, comme dans le cas des flavonoïdes (Pfeiffer and Hegedus, 2011; Tanaka *et al.*, 2008), des dérivés d'acide caféique (Weng and Chapple, 2010), des coumarines et furocoumarines (Karamat *et al.*, 2012; Larbat *et al.*, 2009; Larbat *et al.*, 2007; Vialart *et al.*, 2012), des terpènes et stéroïdes (Lee *et al.*, 2012), ou de certains alcaloïdes (Jirsitzka *et al.*, 2012). Cependant, dans la mesure où les plantes élaborent des

dizaines de milliers de composés secondaires, de nombreuses voies restent encore à découvrir aujourd'hui. L'organisation de la synthèse des métabolites secondaires est schématisée au travers de l'exemple des furocoumarines (Fig. 1), molécules de défenses bien connues de la famille des Apiacées (céleri, persil, panais, etc.) (Bourgaud *et al.*, 2006). D'une manière générale les stress environnementaux, qu'ils soient biotiques ou abiotiques, provoquent des cascades réactionnelles conduisant à la transcription de certains gènes appartenant à des superfamilles de « facteurs de transcription » (ex :

MYB, MYC, WRKY, ORCA, etc.). Lorsqu'ils sont transcrits, ces gènes vont générer la synthèse de protéines spécifiques qui déclencheront à leur tour l'activité transcriptionnelle d'autres familles de gènes codant pour des enzymes directement impliquées dans la synthèse des métabolites secondaires (ex : gène codant pour les enzymes PAL et C4H, Fig. 1). L'étude des voies de biosynthèse des métabolites secondaires suppose donc d'identifier les différentes molécules chimiques intermédiaires et de comprendre les fonctions des différentes enzymes ainsi que les processus de régulation associés.

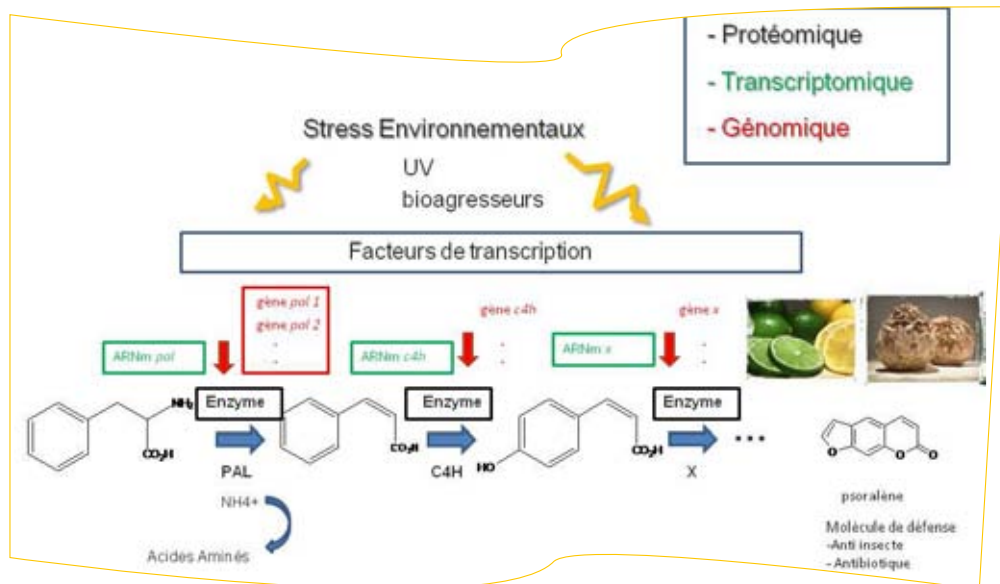


Figure 1 :
 Organisation simplifiée de la voie des furocoumarines chez les végétaux supérieurs. Comme beaucoup de métabolites secondaires, ces molécules ont une distribution limitée à quelques familles botaniques (Apiacées, Moracées, Rutacées et Fabacées). Cette voie est branchée sur la phénylalanine, métabolite primaire qui va subir une série de réactions enzymatiques conduisant aux produits finaux. Les méthodes relevant de domaines de la protéomique, transcriptomique, génomique, mais aussi de la métabolomique et fluxomique sont couramment utilisées dans les programmes de recherche.

Vers une accélération des découvertes portant sur les voies de biosynthèse

Les nouvelles techniques de séquençage de gènes à haut débit (pyroséquençage, technologies de type 454-Roche, Illumina, etc.), accessibles depuis environ 5 ans à la plupart des laboratoires de recherche, ont considérablement mo-

difié et accéléré les travaux sur l'organisation des voies du métabolisme secondaire. L'exemple de la compréhension de la synthèse des alcaloïdes du pavot (morphine et noscapine) est à ce sujet très illustratif. Il a fallu pratiquement 20 ans à la commu-

nauté internationale afin d'élucider la synthèse de la morphine, alors que l'utilisation récente de techniques de séquençage haut-débit a permis de résoudre le cas de la synthèse de noscapine en quelques années seulement (Winzer *et al.*, 2012).

Débouchés industriels issus de la recherche fondamentale

En dépit de leur intérêt pharmaceutique, les métabolites secondaires végétaux restent complexes à produire pour l'industrie pharmaceutique, car ils sont généralement synthétisés en très petite quantité par des végétaux, dans leurs milieux naturels. Plusieurs stratégies ont été développées lors des 30 dernières années, comme la mise en place de stratégies d'hémisynthèse, la culture de cellules végétales indifférenciées, ou encore la culture d'organes végétaux en bioréacteurs (Bourgaud *et al.*, 2001). De nos jours, la connaissance approfondie des gènes et enzymes impliqués dans la synthèse de composés secondaires peut être mise à profit, dans des approches d'ingénierie métabolique, visant à modifier le fonctionnement de ces voies de synthèse. Il est aujourd'hui clairement envisagé de reprogrammer ces synthèses au niveau moléculaire, par transformation génétique, en faisant appel aux concepts et outils de la bio-

logie synthétique, afin de produire les nouvelles plantes médicinales de demain. Des travaux de cette nature ont été récemment réalisés dans le cadre du consortium de recherche européen Smartcell (<http://www.smart-cell.org>) où un groupe de partenaires a pu programmer la synthèse de 10-hydroxygéraniol chez le tabac, en y introduisant 3 gènes de la valériane (géraniol synthase), de Catharanthus (géraniol 10 hydroxylase), et d'Arabidopsis (cytochrome P450 réductase) (Fig.2). Les tabacs ainsi modifiés deviennent capables de synthétiser le produit final. Si le 10-hydroxygéraniol ne présente pas d'intérêt en termes de marché industriel, ce travail préfigure ce qui devient possible, aujourd'hui, en matière de biologie synthétique. Au niveau international, des projets comparables sont aujourd'hui lancés afin de produire les substances naturelles végétales dans des organismes

recombinés, y compris des microorganismes cultivés en réacteurs, dans lesquels on arrive à programmer la synthèse de métabolites secondaires d'origine végétale (Ye and Bhatia, 2012). D'autres travaux de recherche ont porté sur des procédés de cultures de plantes productrices de métabolites secondaires, ainsi que sur des méthodes originales permettant de récolter les substances naturelles d'intérêt. Ainsi, la technologie des « plantes à traire » consiste à cultiver des végétaux en conditions hors-sol (hydroponie, aéroponie) et à récupérer les substances naturellement présentes au niveau des racines, en forçant les processus naturels d'exsudation racinaire (Gontier *et al.*, 1999 ; Gontier *et al.*, 2002) (Fig. 3). La culture des plantes en conditions contrôlées (serres) permet d'appliquer aux végétaux des conditions de croissance qui seront particulièrement efficaces, afin de produire les métabolites secondaires recherchés.

Ces conditions de croissance peuvent correspondre à un milieu nutritif, où la composition minérale aurait été optimisée, ou encore à l'application d'agents éliciteurs qui vont spécifiquement déclencher la synthèse des substances naturelles. De cette

façon, il est possible de multiplier par un facteur allant de 50 à 100 la concentration en molécules d'intérêt chez des plantes sauvages. Cette technologie issue de la recherche de l'Institut National Polytechnique de Lorraine (désormais Université de

Lorraine) et de l'INRA est actuellement développée au stade industriel par la société Plant Advanced Technologies (<http://www.plantadvanced.com>).

Figure 2 :

Travaux entrepris dans le cadre du consortium européen de recherche Smartcell (<http://www.smart-cell.org>).

Trois gènes issus de plantes différentes ont été introduits dans des tabacs cultivés en conditions confinées, à des fins de recherche. Les tabacs générés se sont avérés capables de synthétiser le 10 hydroxygéranol. Cette molécule est absente des tabacs témoins, non transformés.

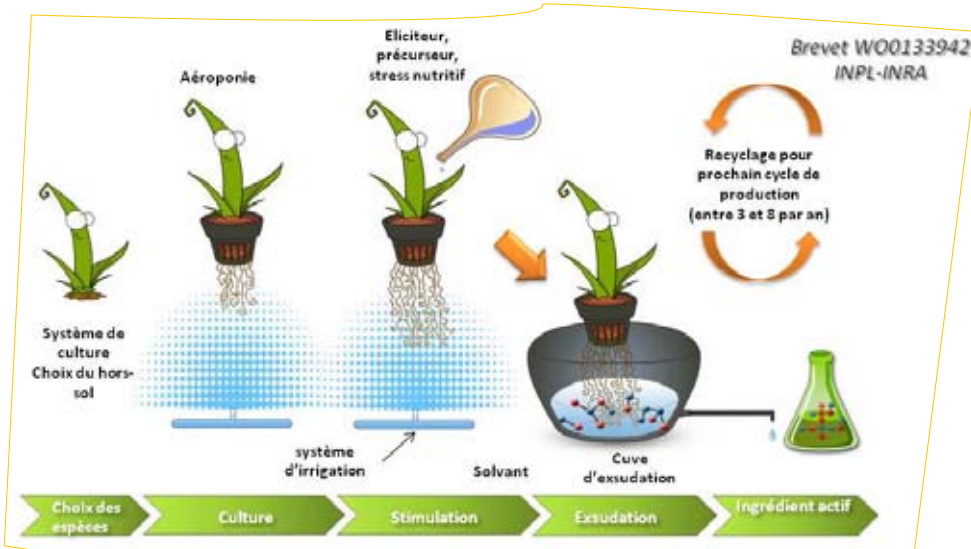
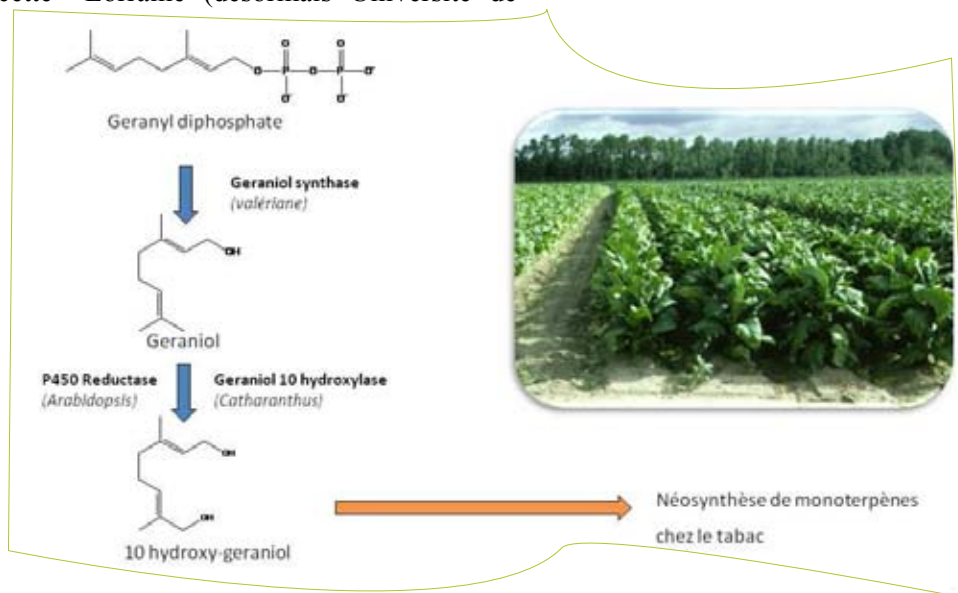


Figure 3 :

Principe de la technologie des « plantes à traire ». Cette technologie s'adresse plus particulièrement à la collecte de métabolites secondaires localisés dans les racines. Les végétaux sont cultivés en conditions hors-sol. Des traitements d'élicitation, permettant de découpler les teneurs en composés secondaires, sont appliqués en cours de culture. La phase de récolte consiste à placer les systèmes racinaires dans un solvant d'extraction (type détergent non toxique) de manière à favoriser l'exsudation des molécules en dehors de la racine. Cette récolte est non-destructrice pour la plante, et les mêmes végétaux sont remis en culture avant de procéder à un nouveau cycle de récolte. Cette technologie a été inventée par l'Institut National Polytechnique de Lorraine (Université de Lorraine) et l'INRA.

Perspectives d'évolution pour la filière des PPAM

Les biotechnologies émergentes comme l'ingénierie métabolique ou la culture en milieu confiné (serres, chambres de cultures, utilisation de lumière LED) ne peuvent s'adresser qu'à des métabolites secondaires à très forte valeur, compte tenu des coûts afférents à ces techniques de production. Il y a donc raisonnablement peu à craindre que ces nouvelles technologies concurrencent des filières de production déjà

existantes, comme les cultures de PPAM. En revanche, on peut mesurer tout le potentiel qu'offrent ces nouvelles technologies de production, lorsqu'il s'agit de produire un métabolite secondaire qui ne serait pas récoltable par des approches conventionnelles telles que la culture au champ, ou la cueillette de végétaux. Il est acquis que les progrès de la génétique moléculaire permettront le développement de nouvelles variétés

végétales, qui auront la capacité de produire des métabolites secondaires aux propriétés remarquables, constituant les matières actives de certains médicaments de demain. Il restera à la société de décider si ces végétaux pourront être cultivés de manière conventionnelle, par les agriculteurs, cultivateurs de PPM, ou bien si ces végétaux devront être contenus dans des systèmes de cultures clos.

PPAM : LA THERMOTHÉRAPIE POUR TRAITER LES SEMENCES

Le projet ThermoPAM, animé par l'iteipmai, a permis de valider l'efficacité de deux méthodes de thermothérapie pour la désinfection des semences de fenouil et de persil. La désinfection par vapeur aérée et le trempage à l'eau chaude, techniques alternatives et compatibles avec le cahier des charges AB, sont d'ores et déjà applicables aux semences contaminées par certains pathogènes. Leur impact, à long terme, sur la longévité des semences est en cours d'évaluation.

Par Mathieu Wident (**iteipmai**¹)

La qualité des semences est un facteur essentiel de la réussite d'une culture de plantes à parfum, aromatiques et médicinales (PPAM). Or, dans ce secteur, comme dans celui des grandes cultures ou des cultures potagères, certaines maladies d'origine fongique (cercosporiose, septoriose, mildiou, alternariose...) ou bactérienne (pourriture bactérienne) sont véhiculées par les semences et peuvent impacter lourdement la production et mettre en

péril la pérennité des cultures. Devant les risques environnementaux et sanitaires posés par le recours à des traitements chimiques, notamment des semences, il existe une demande sociétale forte pour le développement de méthodes alternatives pour le contrôle des maladies et ravageurs des cultures. De plus, la production biologique, très présente dans le secteur des PPAM, requiert l'utilisation de semences de qualité, indemnes de tout traitement chimique.

Désinfecter les semences par la chaleur

C'est pour ces raisons que l'iteipmai a initié, en 2012, des travaux de recherche visant à mettre au point des méthodes de désinfection des semences par thermothérapie qui soient efficaces, adaptées à des espèces d'importance économique pour la filière PPAM, et compatibles avec le cahier des charges AB. Le projet ThermoPAM était né.

La thermothérapie est un terme générique regroupant toutes les techniques de désinfection par la chaleur, quelque soit le fluide employé pour la transmettre (soufflage à l'air chaud, trempage à l'eau chaude, pulvérisation de vapeur aérée). Ces techniques sont très anciennes mais suscitent un regain d'intérêt depuis quelques années dans le traitement

des semences de céréales et potagères. Son principe de base tient dans le fait que certains microorganismes pathogènes sont sensibles à des traitements à la chaleur dans des gammes de température et de durée d'exposition suffisamment faibles pour qu'elles ne soient pas dommageables au matériel végétal hôte du pathogène (ici la semence).

ThermoPAM, un projet collaboratif

Afin de mener à bien le projet ThermoPAM, l'iteipmai, appuyé financièrement par la région Pays-de-la-Loire, a collaboré avec :

- **Mediplant**, institut de recherche suisse sur les plantes aromatiques et médicinales, pour la désinfection par vapeur aérée ;
- **Labosem**, laboratoire d'analyse des semences, pour le trempage à l'eau chaude et son expertise en qualité des semences ;
- **le Geves**, Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences, pour son expertise en pathologie des semences ;
- **l'Itab**, via sa commission Semences et plants.

Des méthodes efficaces identifiées

En 2012-2013, l'iteipmai a collecté des lots de semences de persil, fenouil et basilic d'origines très variées. L'analyse pathologique de ces lots a permis d'identifier cinq couples espèce végétale / agent pathogène à travailler : la cercosporiose (*Cercosporidium punctum*) et l'alternariose (*Stemphylium radicum*) du fenouil et du persil, la septoriose du persil (*Septoria petroselinii*). Le basilic n'a pas pu être retenu car aucun des lots collectés ne présentait de contamination significative par un agent pathogène.

Les tests de sélectivité des méthodes de désinfection par vapeur aérée (DVA) et de trempage à l'eau chaude ont permis de déterminer les conditions optimales de traitement (température / durée d'exposition) garantissant le maintien de la qualité germinative des lots de semences (tableau). Dans ces gammes de température et de durée d'exposition, la DVA et le trempage à l'eau chaude se sont avérés suffisamment efficaces pour contrôler les différents agents pathogènes sur persil et fenouil.

	Traitement et conditions d'application			Agents pathogènes contrôlés
Persil	Trempe à l'eau chaude	55°C	10 min.	<i>Stemphylium radicinum</i> , <i>Cercosporidium punctum</i> et <i>Septoria petroselini</i>
	Désinfection à la vapeur aérée	60°C	90 sec.	
	Désinfection à la vapeur aérée	65°C	60 sec.	
Fenouil	Trempe à l'eau chaude	50°C	20 min.	<i>Stemphylium radicinum</i> et <i>Cercosporidium punctum</i>
	Trempe à l'eau chaude	55°C	10 min.	
	Désinfection à la vapeur aérée	60°C	90 sec.	
	Désinfection à la vapeur aérée	65°C	60 sec.	

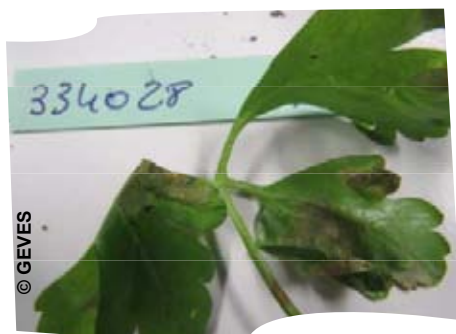
Tableau : Le projet ThermoPAM a permis d'identifier différents traitements efficaces pour désinfecter les semences de persil et de fenouil

Une étude complémentaire sur le séchage post-trempe a été menée afin d'éviter que le trempage ne provoque l'initiation de la germination des lots de semences. Une durée de séchage post-trempe de 24 heures à 20-25°C sous ventilation active

permet de garantir la qualité des lots de semences. Des études de longévité des lots traités par thermothérapie sont en cours de réalisation.

Devant le succès de ce projet, l'iteipmai recherche actuellement des par-

tenaires privés qui souhaiteraient poursuivre les travaux de recherche initiés dans le cadre de ThermoPAM, dans le but d'élargir le champ d'application de ces méthodes alternatives de traitements à d'autres espèces de PPAM ou potagères.



Symptômes de *Septoria petroselini* sur persil lors d'un test de pouvoir pathogène



Symptômes de *Cercosporidium punctum* sur fenouil lors d'un test de pouvoir pathogène



Bain marie utilisé pour les tests de trempage et de séchage



Dispositif expérimental de désinfection à la Vapeur Aérée

NB : cet article a déjà été publié dans Alter Agri n° 127 - sept/oct 2014

NOUVEAUTE : les dons peuvent être faits en ligne

www.sharepam.eu

(1) iteipmai : institut technique interprofessionnel des plantes à parfum, médicinales et aromatiques