

La biotechnologie des plantes aromatiques: la production de métabolites secondaires en vitro

Barbara Ruffoni
CRA FSO
Sanremo (I)



Production de biomasse pour l'extraction

En VIVO:

- A partir de graines
- A partir de génotypes sélectionnés
- espèces vivaces
- cueillette sauvage

En VITRO

- Biomasse différenciée (bourgeons, racines)
- Biomasse non différenciée (callus, cellules)
- automation

Culture *in vitro* de plantes aromatiques

Le commerce mondial est alimenté par 70 à 90% environ de stocks naturels.

Impacts sur les écosystèmes.

Qualité de la matière première!!!!

In vivo: forte variabilité en raison de différentes sources et des conditions climatiques

In vitro: condition de culture contrôlée et constante

Possibilité d'automatiser la production

Amélioration de la qualité et de l'uniformité

Conservation de génotypes (banques de gènes)

CULTURE *IN VITRO*

La production de plantes en cultivant des fragments microscopiques, comme les cellules et les tissus méristématiques, ou macroscopiques, des fragments de tige, racine, feuille, dans des conditions stériles

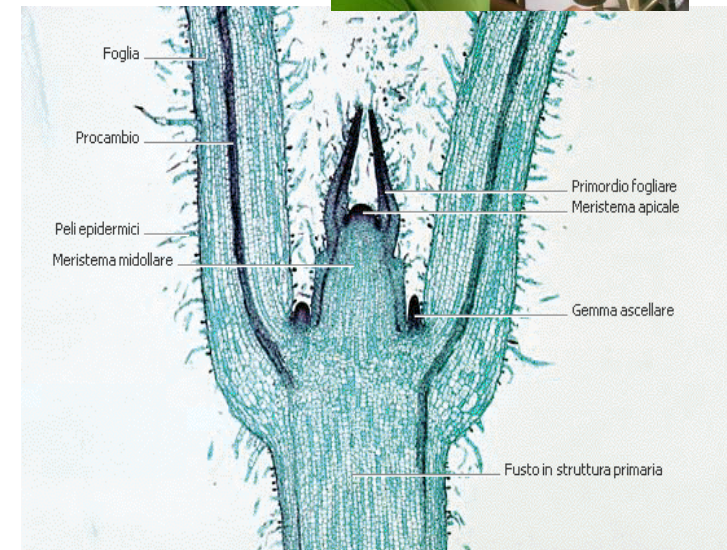
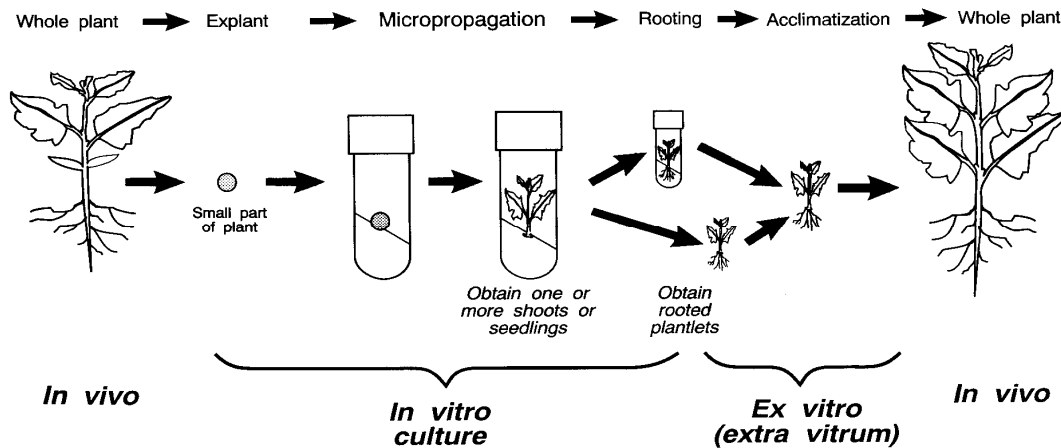
Étapes de la micropropagation:

La culture et l'adaptation vitro

Multiplication de pousses

enracinement

acclimatation



Préparation de milieux de culture



sterilisation



Multiplication ; travail en
atmosphère stérile



Culture contrôlé

Culture *in vitro*



Helichrysum italicum Clonage de géotypes sélectionnés pour une bonne production de métabolites (huiles essentielles) extraites de bouton floral.



Culture *in vitro* de *Salvia Cinnabarina*

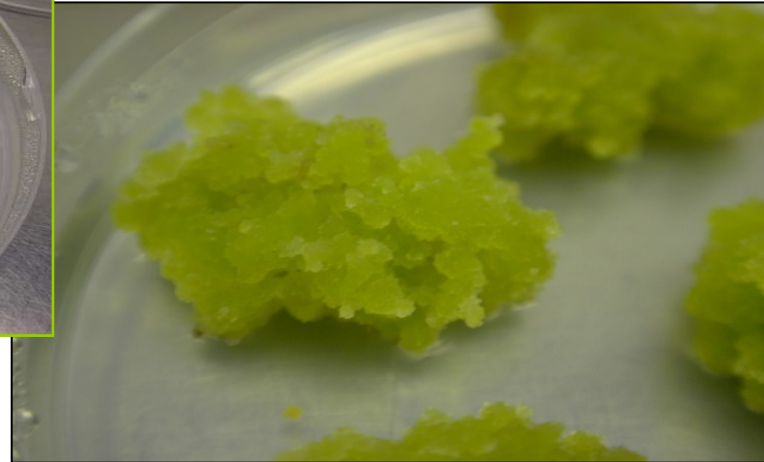
La formation de cultures cellulaires de callus

Salvia officinalis

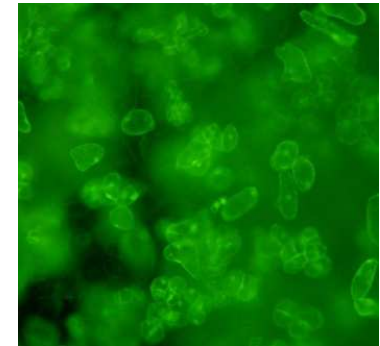
- La matière de départ: cotylédons - feuilles - pétioles
- L'induction par stimulation hormonale
- Le stress : physique / mécanique



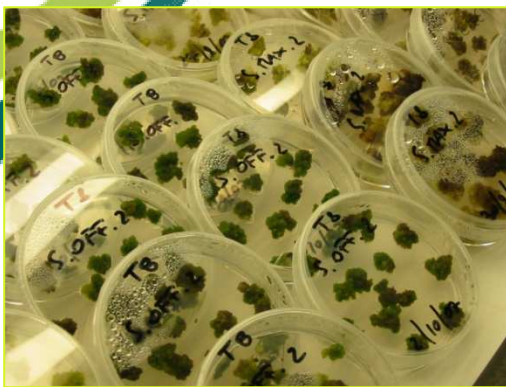
Mise en place de la culture cellulaire



Après plusieurs transferts, le cal devient friable et très soluble en culture liquide.



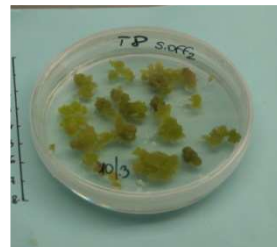
Production de callus



automation

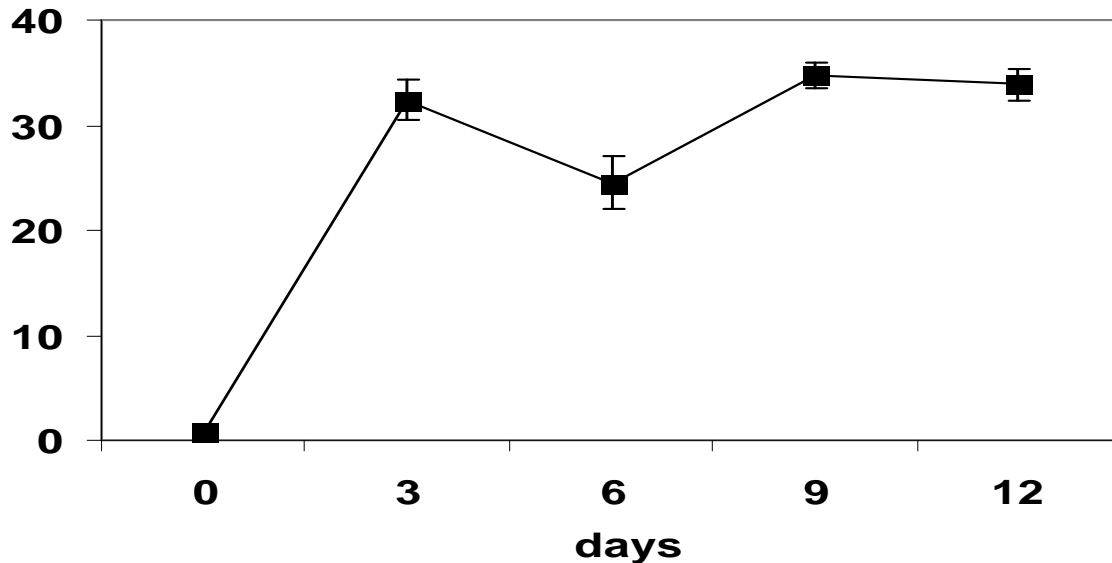


La production d'acide rosmarinique pendant la culture cellulaire de *S.officinalis*



Fresh weight (g)

RA mg/g



Liquid cell cultures
(120 rpm)



solvent extraction (ASE 200)

Le projet BIOAROMA (2013-2015)

Diterpeni
icetaxanici

- ✓ La culture in vitro et in vivo
- ✓ elicitation
- ✓ la caractérisation phytochimique

S.
corrugata



S.
dolomitica



- ✓ *Salvia dolomitica* d'Afrique du Sud (province du nord-est du Transvaal)
- ✓ Arôme fort en raison de l'émission de COV (Composés Organiques Volatils)
- ✓ Profil aromatique de EO extraits de plantes in vivo a été caractérisée par (Kamatou et al., 2007, 2008, 2010)
- ✓ Le profil de l'OT est influencée par le génotype / chemotype et les conditions environnementales / saisonnière

Les huiles
essentielles

L'acide
rosmarinique

In vivo production de *S. dolomitica* and *S. corrugata* biomasse clonale

Préparation, de développement de l'appareil de la racine, en plein air, après 20 jours.

S. dolomitica



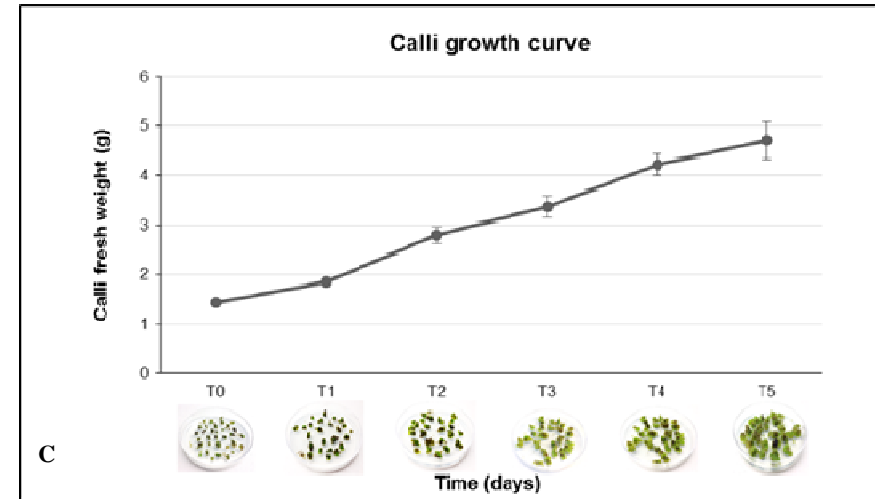
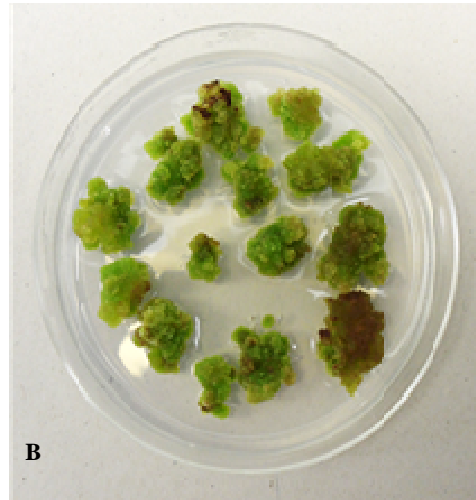
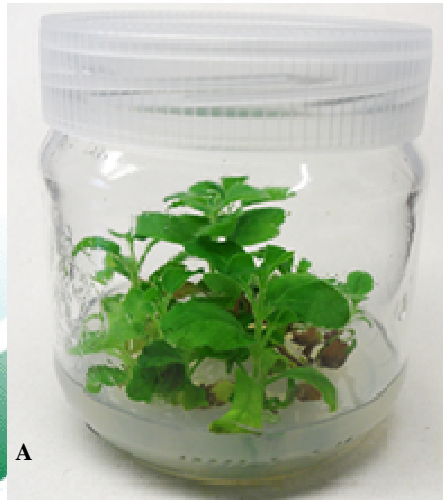
**Haute efficacité de l'enracinement,
la croissance végétative rapide**

S. corrugata



**Faible efficacité de l'enracinement, la
croissance végétative lente**

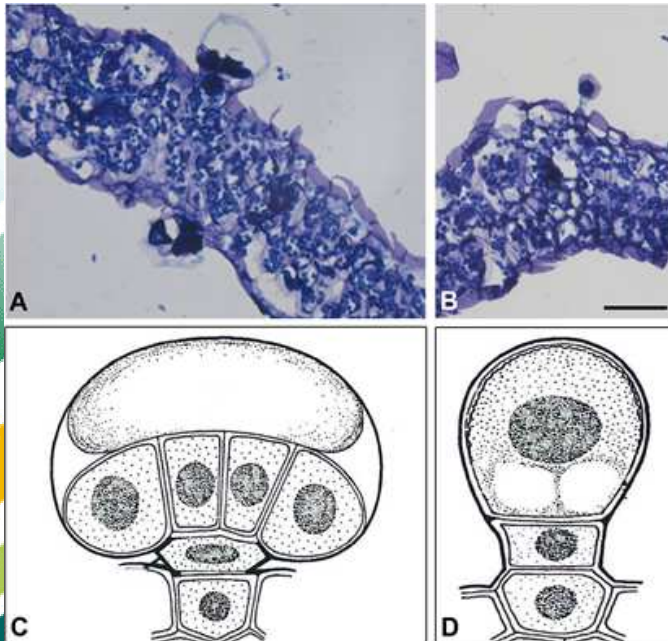
In vitro production of *S. dolomitica* biomasse



(A) Explants nodaux cultivés sur MSO additionné de BA, (B) plaqué cals sur MSO additionné de 2,4-D et Kinetin. (C) le développement de *S. dolomitica* callus plaqué sur MSO + 2,4-D et l'augmentation de poids frais de callus au fil du temps.

✓ *Salvia dolomitica* peut être facilement propagé in vitro et est caractérisé par un arôme intense in vivo et in vitro

L'histologie des trichomes glandulaires



A) Trichomes peltées et trichomes (B) capitate présents dans les feuilles de *S. dolomitica* (plantes *in vitro*) (bar = 5 μ m). En C et D respectivement, glandes et capitates peltées de *S. dolomitica*.

Rendement de l'huile essentielle

Growth condition	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> HL
EO Yield (% w/v)	0,1	0,2	0,3

- ✓ Bassolino L, Giacomelli E, Giovanelli S, Pistelli L, Damonte G, Bisio A, Ruffoni B. (2014). **Tissue culture and aromatic profile of essential oil in *Salvia dolomitica* Codd.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* DOI: 10.1007/s11240-014-0681-3.

Composition de l'huile essentielle dans les plantes de *S. dolomitica*

Growth condition	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> HL
Non terpenic compounds	0,0	0,0	0,0
Hydrogenated monoterpenes	9,48	33,54	39,06
Oxygenated monoterpene	2,69	25.73	30.85
Hydrogenated sesquiterpenes	71,54	29.81	18,62
Oxygenated sesquiterpenes	13,64	10,11	11,11
Diterpene hydrocarbons	0,17	0,00	0,00
Total	97,52	99,19	99.64

- ✓ *Les conditions in vitro et le stress de haute luminosité influencent la compositions quali-quantitative de l'HE de S. dolomitica en comparaison avec les plantes mères cultivées in vivo.*

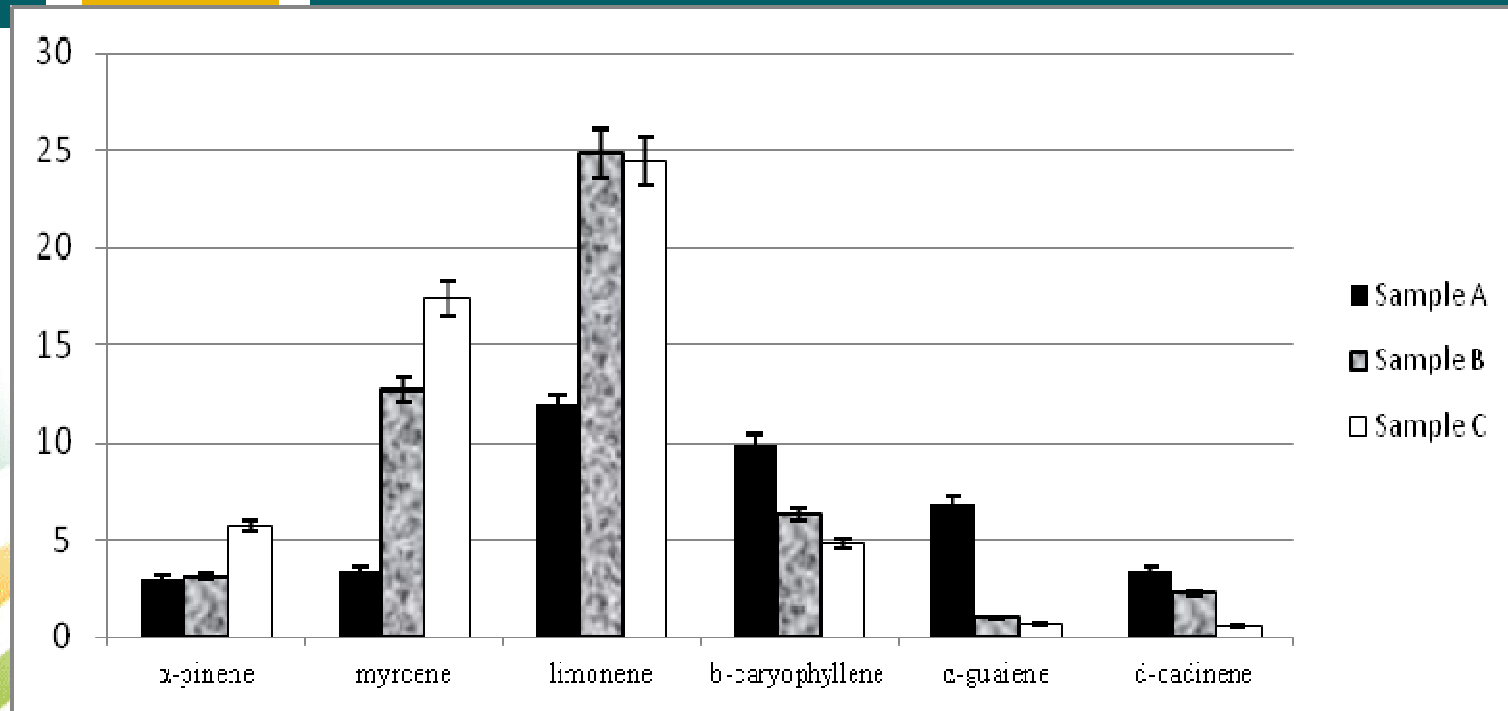
HS-SPME en *S. dolomitica*

Growth condition	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> HL
Non terpenic compounds	0,0	0,0	0,0
Hydrogenated monoterpenes	38,86	63,07	66,72
Oxygenated monoterpene	1,38	1,43	2,77
Hydrogenated sesquiterpenes	54,41	34,41	23,47
Oxygenated sesquiterpenes	4,93	1,22	5,30
Total	99,58	100,13	98,26

La micropropagation et le traitement lumineux ont provoqué une augmentation de monoterpène; dans les meme conditions le contenu sesquiterpénique est diminué

- ✓ Après les données HS et HE ensemble, il est possible de spéculer que la lumière module sélectivement la biosynthèse de terpénoïdes conduisant à monoterpènes ou sesquiterpènes.

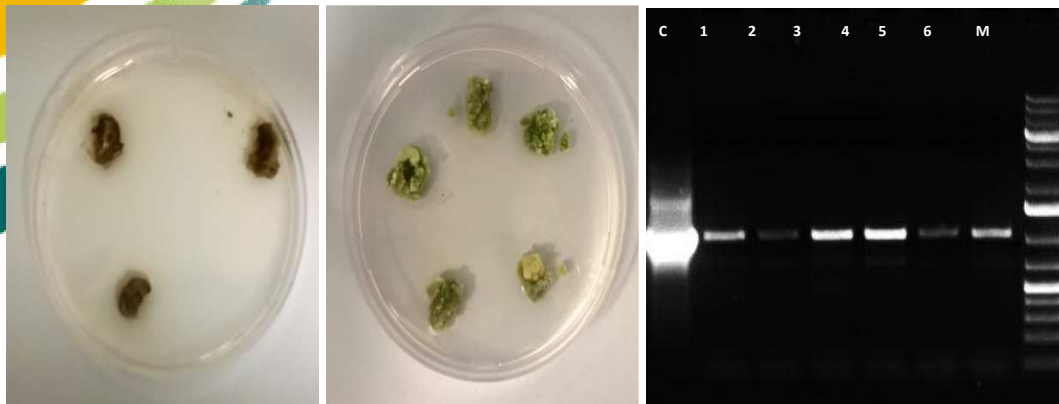
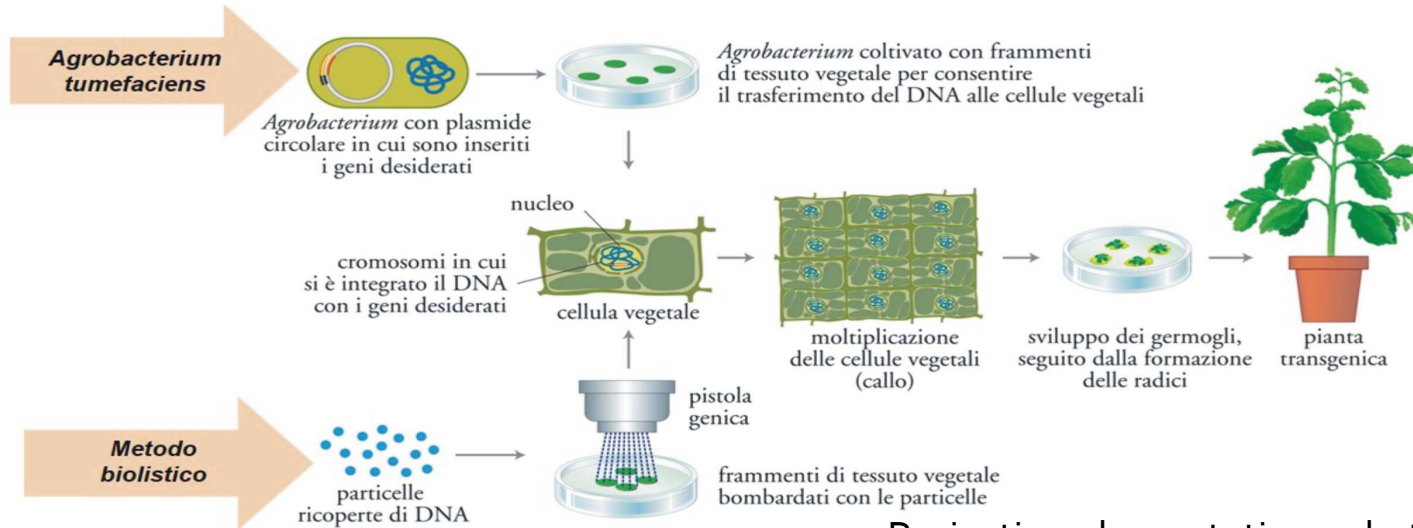
HS-SPME PROFILES



Sample A (black) indicates in vivo; Sample B (grey) indicates in vitro; Sample C (white) are in vitro plants exposed to high light treatment.

- ✓ α -pinène, b-phellandrène et le bornéol se accumulent principalement dans les plantes micropropagés ce qui suggère que la manipulation in vitro de *S. dolomitica* pourrait être exploité pour augmenter la quantité relative de composés spécifiques.

L'acide rosmarinique: transformation génétique



Projection des putative cals transformés avec P_{35S}: HPPR

(a) cals sénescente et résistant à la kanamycine après 30 jours de sous-culture en présence de kanamycine

(b) test PCR pour la présence du transgène SoHPPR (1046 pb). (La ligne C représente le plasmide de contrôle positif; lignes 1 à 6 sont l'amplification du transgène dans les cals régénérée, et M représente le marqueur

Salvia corrugata: Production de biomasse *in vitro*

- ✓ *Salvia corrugata* en Amérique du Sud (Colombie, Equateur et Pérou)
- ✓ Comme *S. fruticosa* accumule deux diterpènes, FA et DFA
- ✓ Phytochimiques propriétés connues (extrait de la biomasse produite *in vivo*)



Multiplication sur milieu de culture avec Benzyladenine

Difficile à manipuler *in vitro*, l'obtention de cals est très complexe

Quantification de Fruticulina et dimetilfruticulina

Campioni	SCO1 (mg/mg estratto)	SCO2 (mg/mg estratto)
Foglie	3,2±0,3	2,5±0,2
Apici	5,7±0,5	4,6±0,6
Fiori	1,1±0,1	1,3±0,2
Steli	5,8±0,5	4,5±0,4
Radici	0,003±0,001	0,002±0,001

Feuilles caulinaires et citations sont les tissus qui se accumulent de plus grandes quantités


Campioni	SCO1 (mg/mg estratto)	SCO2 (mg/mg estratto)	Media SCO1	Media SCO2
HL_1	0,041±0,001	0,052±0,001	0,065±0,001	0,087±0,001
HL_2	0,076±0,002	0,100±0,001		
HL_3	0,080±0,002	0,111±0,002		
CTRL_1	0,232±0,004	0,280±0,001	0,237±0,008	0,325±0,001
CTRL_2	0,176±0,010	0,256±0,001		
CTRL_3	0,305±0,011	0,441±0,001		

La lumière module négativement l'accumulation de FA et DFA



Les perspectives d'avenir

La multiplication in vitro permet de multiplier rapidement les chénotypes notamment pour la production de molécules à haute valeur ajoutée



Le développement de culture de cellules en suspension permet d'automatiser la production de substances particulières, complémentaire à la production sur le terrain.

Les conditions de culture in vitro peuvent simuler les conditions environnementales (changement climatique) et on peut évaluer le degré du stress (grâce à l'émission de COV).

Les information seront rapidement utiliser en cultures





MERCI de votre attention!