

## ***Nouveautés techniques et industrielles***

# **Les signatures génétiques des lavandes et lavandins : des outils de traçabilité en cosmétique, parfums et nutrition**

*Nelly DUBRULLE, Nicole GIRAUD*

*DNA Gensee, 17, rue du lac St André, BP 90342, 73 377, Le Bourget du Lac cédex (France)*

### **Résumé:**

L'authentification et la traçabilité des matières premières sont aujourd'hui d'importance majeure pour les industriels de la cosmétique et de l'industrie des parfums ainsi que pour les consommateurs. Les technologies de DNA barcoding, utilisant les signatures génétiques des plantes, ont récemment révolutionné l'analytique dans ces domaines .

Notre expertise en lien avec ces méthodes, appliquée aux lavandes, a permis de démontrer la puissance et la précision des analyses ADN, à la fois sur plantes et produits à base de plantes comme par exemple une concrète de lavandes.

**Mots-clés:** Identification ADN, Traçabilité, DNA metabarcoding, séquençage nouvelle génération, lavande

### **Abstract:**

Raw material authentication and traceability has become very important nowadays for cosmetics and fragrance industry and for consumers. DNA barcoding technologies, using plant genetic signatures, have lately profoundly change analytics in these fields.

Our expertise, linked to these methods, applied to lavender, allowed us to demonstrate the power and accuracy of DNA analysis, both on plants and on products made from plants as for example a lavender concrete.

**Key-words:** DNA Identification, Traceability, DNA metabarcoding, next generation sequencing, lavender

## **1. Introduction**

L'identification botanique précise des matières premières végétales est indispensable pour les acteurs des domaines de la cosmétique, de l'industrie des parfums, des compléments alimentaires et de la santé. Le coût élevé de ces matériaux naturels pourrait conduire à des adultérations. Lorsque la chimie ne peut répondre complètement à ces problématiques d'identification, la génétique peut relayer et amener de l'information complémentaire. En effet, ***chaque plante a une signature génétique unique!***

La technologie de *DNA Barcoding* consiste à utiliser un fragment standard du génome comme marqueur génétique pour l'identification et la discrimination des espèces végétales. *Le DNA Metabarcoding* est une innovation récente permettant notamment de travailler avec des substrats complexes contenant des petits fragments d'ADN dégradés et en faible concentration.

Ces méthodes ont montré leur efficacité en écologie [1], en environnement [2] en alimentation [3] et en paléontologie [4]. Il est intéressant de noter qu'elles ont également été appliquées avec succès sur les produits de la ruche dont les miels [5] et la propolis.

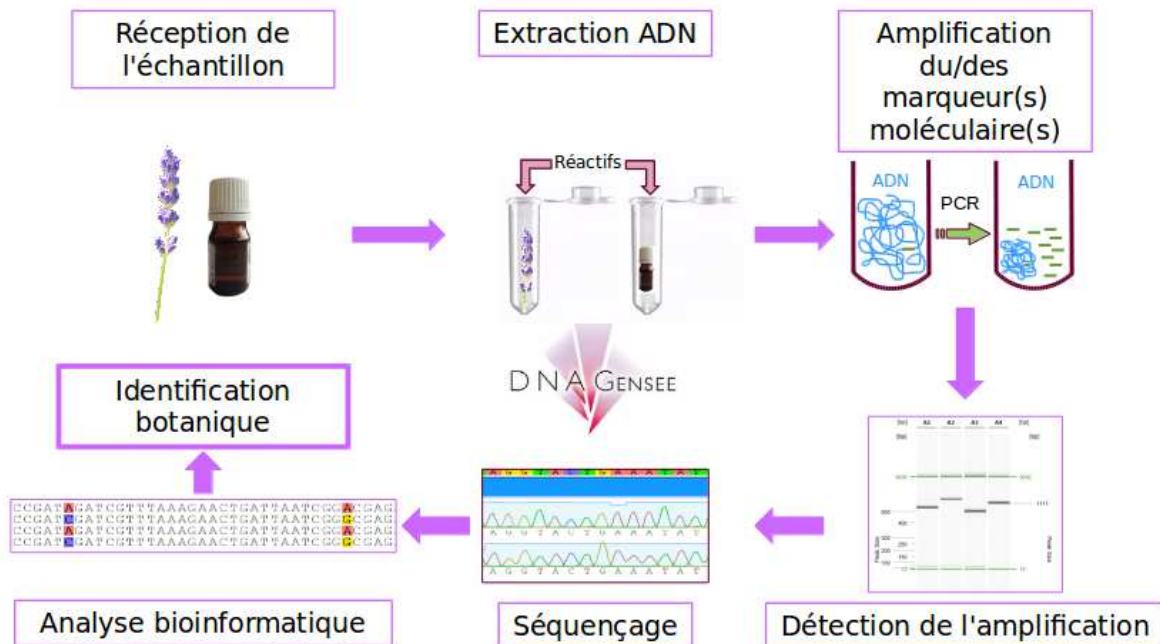
Nous avons utilisé le DNA metabarcoding avec succès dans le cas d'un problème d'importance majeure dans l'industrie : l'authentification et la traçabilité d'espèces et de cultivars<sup>1</sup> de lavandes dans des extraits et produits qui en contiennent. Nous avons pu apporter une identification allant jusqu'à l'espèce, voire la sous-espèce.

Le genre *Lavandula* est composé de 39 espèces acceptées [6]. Parmi celles-ci, *Lavandula angustifolia* Mill (la vraie lavande fine), *Lavandula latifolia* Medik et le lavandin hybride (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.) sont très utilisés pour la production d'huile essentielle. Les lavandins, plus cultivés sont moins onéreux que les lavandes fines, d'où le risque de contaminations voire d'adultération.

## 2. Les technologies DNA barcoding et metabarcoding

Le DNA barcoding utilise des petites portions de l'ADN (marqueurs génétiques) pour fournir l'empreinte génétique de la plante. L'ADN présent dans une matière première végétale est extrait, puis les marqueurs génétiques sont amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction). Enfin ces marqueurs sont séquencés par la méthode de Sanger [7] ou par la méthode de séquençage à haut débit dite "séquençage de nouvelle génération" (NGS), le choix se faisant notamment en fonction de la taille de la région d'intérêt. La séquence obtenue est comparée à la base de données publique (Genbank® [8]). Les marqueurs dits « longs » font en général plusieurs centaines de paires de bases (> 400). Cette approche n'est pas applicable pour l'analyse des extraits et produits dans lesquels les fragments d'ADN retrouvés sont d'une centaine de paires de bases ou moins. De plus, avec le DNA barcoding seule la séquence majoritaire sera séquencée et analysée.

Le DNA metabarcoding utilise le barcoding couplé à la technologie de séquençage nouvelle génération (NGS). Le NGS permet de surmonter les problèmes du barcoding ; il donne accès à toutes les séquences présentes dans un produit d'où la possibilité de faire des analyses en aveugle. Cependant, les séquences amplifiées (marqueurs « courts ») étant plus courtes, elles sont *a priori* moins informatives



**Figure 1 : Protocole du barcoding et du metabarcoding utilisé chez DNA Gensee. Étapes identiques pour les deux techniques, à l'exception de la méthode de séquençage, Sanger et NGS respectivement.**

<sup>1</sup> Le terme **cultivar** est synonyme de « variété cultivée »

L'ADN des produits issus de procédés de transformation est très dégradé : les fragments d'ADN sont ainsi plus courts. Le DNA barcoding n'est pas donc pas utilisable sur la majorité des produits cosmétiques et de la parfumerie par exemple, à l'inverse du DNA metabarcoding.

Les étapes du protocole, identiques pour le barcoding et le metabarcoding à l'exception de la technique de séquençage utilisée, sont schématisées dans la Figure 1.

Elles consistent en une extraction de l'ADN contenu dans chaque plante ou produit, puis une amplification des marqueurs moléculaires (« courts » ou « longs »). La présence d'ADN après l'amplification est confirmée par électrophorèse. Chaque échantillon est ensuite séquençé et les séquences obtenues sont comparées à la base de données Genbank<sup>®</sup> [8] et assignées à une espèce

Dans un premier temps, nous avons validé l'utilisation du marqueur « court » DNA Gensee, dont la séquence est tenue confidentielle, par la technique du metabarcoding.

En effet, le marqueur doit être suffisamment discriminant et permettre une assignation jusqu'à l'espèce pour avoir un intérêt. Cette validation a été réalisée sur un échantillonnage de 15 souches de lavande de référence. Nous avons comparé les résultats obtenus par metabarcoding (un marqueur « court ») avec les résultats obtenus sur les mêmes échantillons par barcoding (plusieurs marqueurs « longs ») en construisant des *arbres phylogénétiques*.

L'objectif d'un arbre phylogénétique est de classer les espèces selon la présence ou l'absence de plusieurs caractéristiques. Dans ce cas, chaque nucléotide constitutif de l'ADN est considéré comme une caractéristique. En pratique, un logiciel informatique aligne les séquences obtenues et les compare entre elles. Pour commencer, toutes les séquences strictement identiques sont placées sur une branche de l'arbre. Ensuite, le logiciel identifie la séquence qui a le plus de nucléotides en commun avec la séquence précédente. Cette séquence est placée sur une nouvelle branche à côté de la précédente, et ainsi de suite jusqu'à ce que toutes les séquences soient placées. Un arbre phylogénétique permet ainsi de visualiser la divergence ou la similitude génétique entre espèces proches.

Dans un second temps, nous avons confirmé l'utilisation du DNA metabarcoding sur un produit à base de plantes ayant subi de fortes transformations

### 3. La phylogénie des lavandes : évaluation des technologies

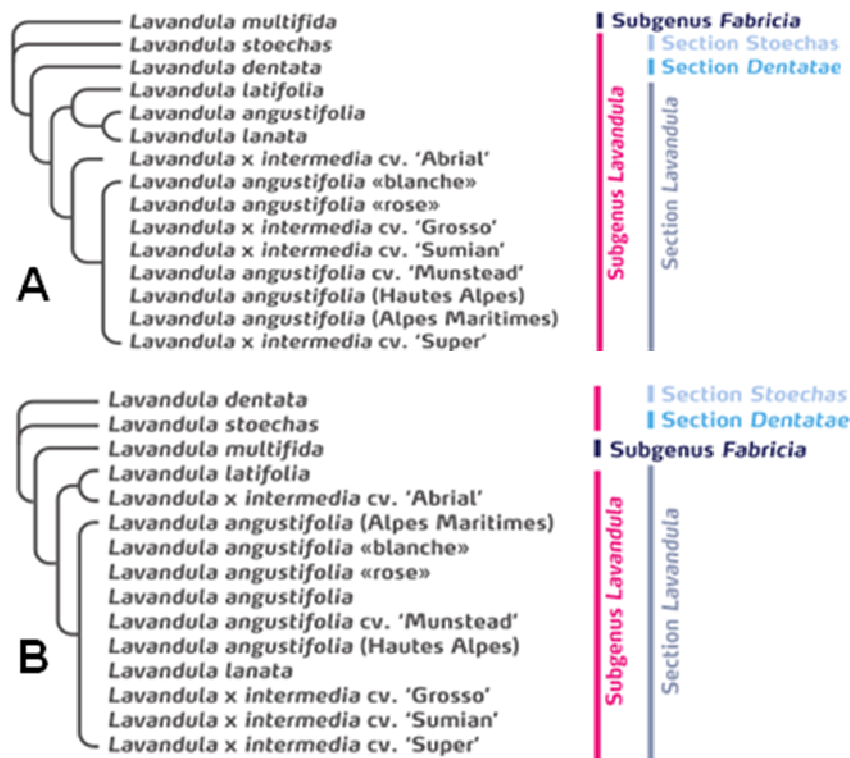
Chaque espèce peut être différenciée des autres sur des critères génétiques : comme nous l'avons déjà dit, chaque plante a une signature génétique unique.

La première partie de notre étude a consisté à analyser la diversité génétique entre des « vraies » lavandes et des lavandins ainsi que la spécificité du marqueur « court » DNA Gensee. Les séquences génétiques de chaque plante sont alignées pour créer un arbre phylogénétique. La construction d'un tel arbre est décrite ci-dessus dans la partie 2, la classification des espèces en section et en sous-genre est extraite du livre « The genus *Lavandula* » d'Upson et Andrews [6].

La Figure 2.A. correspond à l'arbre consensus construit avec des marqueurs « longs » provenant de la littérature [9]. La Figure 2.B. quant à elle, est construite avec le marqueur « court » DNA Gensee.

Il est possible de voir sur ces deux arbres que les espèces de lavande peuvent être différenciées car elles sont représentées sur différentes branches. En revanche, les séquences génétiques des cultivars (cv.) ne sont globalement pas suffisamment différentes et se retrouvent donc sur la même branche ('rose', 'blanche', 'Munstead', 'Super', 'Grosso', 'Sumian', Alpes)

Les phylogénies obtenues sont comparables aux dernières données publiées utilisant d'autres marqueurs [10]. Ceci montre que le DNA barcoding est utilisable sur les lavandes et lavandins et que notre marqueur « court » est approprié et suffisamment discriminant et informatif pour cette étude. **La robustesse de la technologie (NGS) et de notre marqueur permet donc de fournir des éléments pertinents d'assignation à partir d'une matière première végétale** ; elle est ici aussi résolutive que le DNA barcoding



**Figure 2: Arbres phylogénétiques consensus pour les 15 souches de lavande et lavandins, construits à partir: A. des marqueurs longs et de la technologie barcoding B. du marqueur génétique court et de la technologie metabarcoding.**

#### 4. Analyse d'une concrète de lavande

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons appliqué le DNA metabarcoding à l'analyse d'une concrète de lavande pour démontrer l'efficacité de la technique sur un produit transformé.

La concrète de lavande est la pâte obtenue après une première extraction de lavande fraîche par un solvant volatil et élimination de ce solvant. Ce procédé de transformation étant destructif pour l'ADN, ce dernier est dégradé et présent en faible quantité. La concrète sur laquelle nous avons travaillé, provient d'un partenariat avec le département de pharmacochimie moléculaire (DPM) de Grenoble sous la responsabilité du Pr Boumendjel.

Le résultat d'une analyse NGS consiste à la fois en une liste de séquences présentes dans le produit et le nombre relatif de répétitions de chaque séquence.

En calculant le pourcentage de chaque séquence génétique par rapport à la totalité des séquences (100 % des séquences trouvées dans le produit), nous pouvons construire un diagramme d'abondance (Figure 3).

L'assignation se fait par comparaison de ces séquences avec la base de données publique Genbank® [8]. Dans le cas de la concrète, comme le montre la Figure 3, les séquences sont assignées à :

- *Lavandula angustifolia* (99,55%) qui est l'espèce majoritaire,

- et à 3 plantes contaminantes (<0,2%) : du genre *Populus*, de la famille des Fagaceae et celle des Betulaceae. Ces séquences d'ADN pourraient provenir de contamination par des tissus végétaux qui sont arrivés au cours du processus de transformation, lors des transferts ou lors des prélèvements des échantillons.

Ce résultat garantit uniquement la présence de lavande fine et non de lavandins dans notre échantillon de concrète de lavande

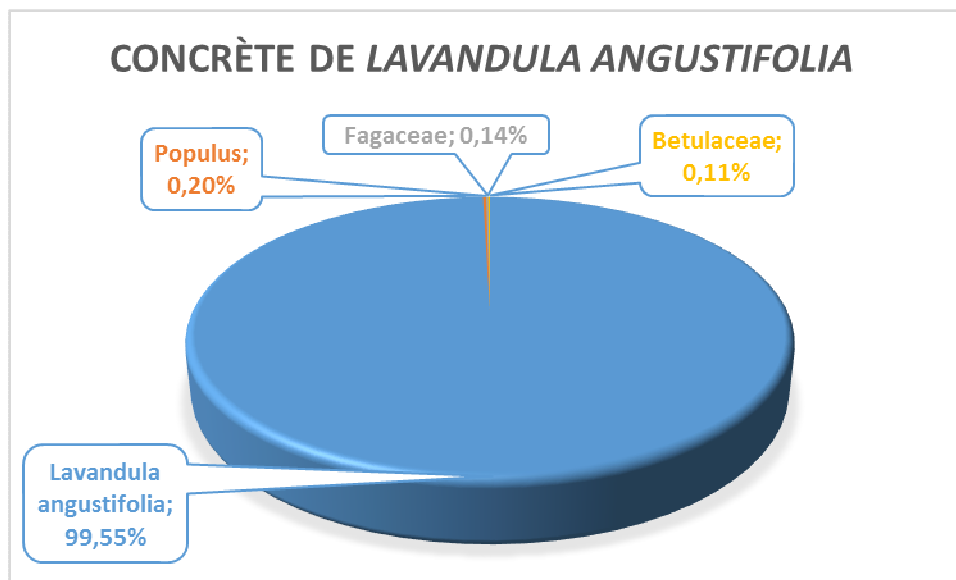


Figure 3 : Diagramme d'abondance obtenu après analyse de séquençage nouvelle génération (DNA Metabarcoding) d'un échantillon de concrète de Lavande

## 5. Conclusion

L'analyse phylogénétique des plantes du genre *Lavandula* démontre que le DNA barcoding ainsi que le metabarcoding sont capables de discriminer, en aveugle, les lavandes fines des lavandins. **Le marqueur « court » DNA Gensee est particulièrement pertinent pour l'analyse des lavandes.**

L'utilisation de marqueurs génétiques « courts » montre l'efficacité et la puissance de cette technologie pour identifier l'espèce de la plante d'intérêt et la tracer dans la composition d'un produit. Cette approche innovante est pertinente pour l'authentification des matières premières végétales et leur traçabilité dans les ingrédients et les produits finis.

Principalement utilisée dans les domaines de la cosmétique et de la parfumerie, notre approche peut s'appliquer à beaucoup d'autres domaines, comme ceux des compléments alimentaires, de la santé, de l'agro-alimentaire et notamment le domaine viti-vinicole et bien d'autres encore.

**Ces analyses de traçabilité sont un gage de sécurité et de qualité** pour nos partenaires industriels.

DNA Gensee a développé un savoir-faire très spécifique dans l'extraction d'ADN et dans les analyses sur extraits végétaux, ingrédients et produits finis. Nous avons de plus, accès à des plantes de référence pour valider nos outils génétiques. Nos études sont *sur-mesure* pour tout type de produit transformé. Enfin, DNA Gensee développe chaque jour sa propre base de données à partir de cette technologie qui enrichit considérablement le monde de l'analytique

## 6. Bibliographie:

- [1]. Lindahl, B. D., Nilsson, R.H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjølner, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J. & Kauserud, H. – 2013 –Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide – *New Phytologist*, **199**:288-299.
- [2] Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. – 2008 – Species detection using environmental DNA from water samples – *Biology Letters*, **4**:423-425.
- [3]. Shehzad, W., Riaz, T., Nawaz, M. A., Miquel, C., Poillot, C., Shah, S. A., Pompanon, F., Coissac, E. & Taberlet, P. – 2012 – Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan – *Molecular Ecology*, **21**:1951-1965.
- [4]. Knapp, M. & Hofreiter, M. – 2010 – Next generation sequencing of ancient DNA: requirements, strategies and perspectives – *Genes*, **1**:227-243.
- [5]. Valentini, A., Miquel C. & Taberlet P. – 2010 – DNA Barcoding for honey biodiversity – *Diversity*, **2**:610-617.
- [6]. Upson, T. & Andrews, S. – 2004 – The genus *Lavandula* – *Kew: Royal Botanic Gardens, Kew xiv, 442p.-illus., col. illus.. ISBN, 1842460102*.
- [7]. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. – 1977 – DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**:5463-7
- [8]. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. – 2009 – *GenBank*. – *Nucleic Acids Res.* **37**:D26-31
- [9]. Mishra P, Kumar A, Nagireddy A, Mani DN, Shukla AK, Tiwari R, et al. – 2016 – DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. – *Plant Biotechnol. J.* **14**:8–2
- [10]. Moja, S., Guitton, Y., Nicolè, F., Legendre, L., Pasquier, B., Upson, T. & Jullien, F. – 2015 – Genome size and plastid trnK-matK markers give new insights into the evolutionary history of the genus *Lavandula* L. – *Plant Biosystems*, ahead of print:1-9.

***Remerciements :*** DNA Gensee souhaite remercier le Musée de la Lavande (Saint Remèze, France) qui a aimablement fourni onze des quinze souches étudiées ainsi que le département de pharmacochimie moléculaire et notamment le Pr A Boumendjel. Par ailleurs, nous remercions aussi Benjamin Marteaux (DNA Gensee) et le Dr Aymeric Rocca (DNA Gensee) pour leurs contributions