

Titre: Développement d'un procédé d'élicitation par plasma froid d'argon de cellules de la plante *Catharanthus roseus* pour la production de molécules à haute valeur ajoutée
Title:

Auteur: Marion Lautier
Author:

Date: 2025

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Lautier, M. (2025). Développement d'un procédé d'élicitation par plasma froid d'argon de cellules de la plante *Catharanthus roseus* pour la production de molécules à haute valeur ajoutée [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/69269/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/69269/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Mario Jolicoeur, & Stephan Reuter
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Développement d'un procédé d'élicitation par plasma froid d'argon de cellules
de la plante *Catharanthus roseus* pour la production de molécules à haute
valeur ajoutée**

MARION LAUTIER

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Octobre 2025

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Développement d'un procédé d'élicitation par plasma froid d'argon de cellules
de la plante *Catharanthus roseus* pour la production de molécules à haute
valeur ajoutée**

présenté par **Marion LAUTIER**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Jason Robert TAVARES, président

Mario JOLICOEUR, membre et directeur de recherche

Stephan REUTER, membre et codirecteur de recherche

Olivier HENRY, membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Professeur Mario Jolicoeur. Je le remercie sincèrement de m'avoir fait confiance pour ce projet, d'avoir cru en mes capacités malgré ma réorientation et mon absence totale de connaissances pratiques en biologie cellulaire et de m'avoir poussée à, moi aussi, croire en moi. Il a toujours été là pour m'aider quand j'en avais besoin et m'encourager quand je doutais.

Je souhaite également remercier Viridios : Xavier Kasim et Maxim Charland, et Biopierre : Guillaume Thérout-Rancourt et Viviane Bao Vy Lam, pour avoir imaginé, rendu possible et accompagné ce si beau projet.

J'aimerais adresser tous mes remerciements à mon co-directeur, le Professeur Stephan Reuter, pour avoir accepté de me soutenir, moi et mon projet, jusqu'à la fin de ma maîtrise, même avant de devenir officiellement mon co-directeur de recherche, il a toujours pris le temps de répondre à mes questions et de m'inciter à garder un regard scientifique sur mes résultats. Son soutien constant a été précieux dans l'avancement de mon projet.

Je tiens aussi à exprimer le plus sincère des remerciements et tout mon amour à mon conjoint, Gabriel, pour avoir été à mes côtés et m'avoir soutenu depuis le tout début. Merci de m'avoir encouragée à entreprendre ce projet, merci pour toutes ces soirées où tu es venu me chercher tard au labo, merci pour ton soutien inconditionnel, pour tes encouragements constants et pour le bonheur de t'avoir dans ma vie.

Je souhaite également remercier chaleureusement Jorgelindo, Yuan et Lydia pour toute leur aide au laboratoire. Merci à Jorge pour tout le temps passé à analyser mes échantillons, pour son aide précieuse, dès que j'en avais besoin et pour avoir toujours été là lorsque je ne pouvais pas effectuer le transfert de mes petites cellules. Merci à Yuan et Lydia pour avoir toujours été présentes, avoir égayé mes journées de labo et m'avoir appris tout ce dont j'avais besoin. Sans eux, je n'aurais jamais pu mener ce projet à bien.

Merci à Juliette et Jean-Philippe, qui m'ont non seulement toujours aidé avec la source plasma, mais qui ont aussi été une si bonne compagnie pendant toutes ces longues heures de traitements. Merci à Dariouch pour avoir été un si bon partenaire de laboratoire, un soutien quotidien, toujours présent au labo, même les week-ends.

Je veux aussi remercier Louise, Marine, François, Lusie, Sasha, Geneviève, Xinyi, Miriam, Léa et tous les autres, qui m'ont permis de vivre de si belles soirées et de merveilleux week-ends. Merci de m'avoir soutenue dans mon projet, mais surtout de m'avoir permis de passer

d'inoubliables années au Canada. Merci pour tous ces rires, ces jeux de société, ces activités et tous les bons moments partagés ensemble. Merci également à ma famille, qui n'a pas toujours compris ce que je faisais, mais qui m'a toujours offert son plus grand soutien dans cette aventure.

Enfin, je tiens également à remercier Ilona Metayer pour tout son travail avant mon arrivée, qui a permis la concrétisation de mon projet.

RÉSUMÉ

Les métabolites secondaires produits par les plantes constituent une source essentielle de molécules à haute valeur ajoutée pour l'industrie pharmaceutique. Parmi eux, la vinblastine et la vincristine, deux alcaloïdes biosynthétisés par *Catharanthus roseus* comme stratégie de défense, occupent une place centrale pour leur utilisation en chimiothérapie. Toutefois, leur concentration naturelle dans la plante est extrêmement faible, ce qui limite leur disponibilité et entraîne des coûts de production très élevés. Afin de surmonter ces contraintes, plusieurs stratégies d'élicitation ont été développées pour induire un stress dans les cultures cellulaires et ainsi activer les voies de biosynthèse de ces composés. Cependant, ces stratégies ne sont aujourd'hui pas assez efficaces pour répondre à la demande mondiale.

Dans ce contexte, le plasma froid, un état de la matière générant des espèces réactives à température ambiante, apparaît comme une approche innovante et prometteuse. Bien que déjà étudié dans des domaines tels que la stérilisation ou la cicatrisation, son application comme éliciteur de métabolites secondaires végétaux est très récente. Il a été appliqué sur les graines de *C. roseus* à partir de 2019 et sur des cellules végétales à partir de 2022, mais malgré son fort potentiel, aucune étude ne s'était encore intéressée à son utilisation sur les cellules de *C. roseus*.

Ce mémoire s'inscrit donc dans la perspective d'évaluer le potentiel du plasma froid d'argon comme procédé d'élicitation pour accroître la production d'alcaloïdes chez *C. roseus*, en proposant une première évaluation de son efficacité, seul ou en combinaison avec une méthode déjà utilisée, le jasmonate de méthyle. L'étude a été réalisée sur des suspensions cellulaires de *C. roseus* exposées à un plasma jet froid d'argon durant des périodes comprises entre 30 et 150 secondes. Le suivi de la viabilité cellulaire, du taux de respiration comme indicateur de l'activité métabolique, la quantification des alcaloïdes par chromatographie liquide à ultra-haute performance, ainsi que l'évaluation de leur activité cytotoxique, ont permis d'obtenir un premier aperçu du potentiel de cette méthode.

Les résultats ont montré que le plasma froid stimule la production d'alcaloïdes cytotoxiques sans compromettre la viabilité ni la croissance cellulaire. De plus, son couplage avec le jasmonate de méthyle présente un effet synergique marqué, confirmant son potentiel comme méthode d'élicitation efficace et ouvrant la voie à une application transposable à l'échelle industrielle.

ABSTRACT

Secondary metabolites produced by plants are an essential source of high value-added molecules for the pharmaceutical industry. Among them, vinblastine and vincristine, two alkaloids biosynthesized by *Catharanthus roseus* as a defense strategy, occupy a central place for their use in chemotherapy. However, their natural concentration in the plant is extremely low, which limits their availability and results in very high production costs. To overcome these limitations, several elicitation strategies have been developed to induce stress in cell cultures, thereby activating the biosynthetic pathways of these compounds. However, these strategies are currently not effective enough to meet global demand.

In this context, cold plasma, a state of matter that generates reactive species at room temperature, appears to be an innovative and promising approach. Although it has already been studied in fields such as sterilization and wound healing, its application as an elicitor of secondary plant metabolites is very recent. It has been applied to *C. roseus* seeds since 2019 and to plant cells since 2022, but despite its high potential, no studies have yet focused on its use on *C. roseus* cells.

This thesis therefore aims to evaluate the potential of cold argon plasma as an elicitation process to increase alkaloid production in *C. roseus*, by proposing an initial assessment of its effectiveness, either alone or in combination with an already established method, methyl jasmonate. The study was conducted on cell suspensions of *C. roseus* exposed to cold argon plasma jet for periods ranging from 30 to 150 seconds. Monitoring cell viability, respiration rate as an indicator of metabolic activity, quantifying alkaloids by ultra-high performance liquid chromatography, and evaluating their cytotoxic activity provided an initial insight into the potential of this method.

The results showed that cold plasma stimulates the production of cytotoxic alkaloids without compromising cell viability or growth. Furthermore, its coupling with methyl jasmonate has a marked synergistic effect, confirming its potential as an effective elicitation method and paving the way for an application that can be scaled up to industrial level.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vi
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiv
LISTE DES ANNEXES	xvi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Contexte Général	1
1.2 Objectifs de recherche	2
1.3 Plan du mémoire	3
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 La plante <i>C. roseus</i> comme source d’alcaloïdes thérapeutiques	4
2.1.1 Histoire et usages traditionnels	4
2.1.2 Métabolites secondaires : des composés bioactifs d’origine végétale . .	5
2.1.3 Les alcaloïdes anticancéreux issus de <i>C. roseus</i>	6
2.1.4 Enjeux liés à la production de Vinblastine et de Vincristine	7
2.2 La culture <i>in vitro</i> de cellules végétales	9
2.2.1 Les principaux types de cultures végétales <i>in vitro</i>	9
2.2.2 Optimisation des conditions de cultures	10
2.2.3 Stimulation de la production de métabolites secondaires	11
2.3 L’éllicitation pour stimuler la production d’alcaloïdes d’une suspension cellu- laire de <i>C. roseus</i>	13
2.3.1 Types d’élliciteurs utilisés chez les cellules de <i>C. roseus</i>	13
2.3.2 Mécanismes de réponse des cellules de <i>C. roseus</i> à l’éllicitation	14
2.4 L’utilisation de plasma froid comme éliciteur de <i>C. roseus</i>	15
2.4.1 Le plasma froid : principes, applications et génération	15
2.4.2 Effets biologiques du plasma froid	16
2.4.3 Applications du plasma froid aux plantes	17

2.4.4	Le plasma froid comme éliciteur chez les cellules végétales	18
2.4.5	Le plasma froid comme éliciteur chez <i>C. roseus</i>	19
CHAPITRE 3	MATÉRIEL ET MÉTHODES	21
3.1	Culture cellulaire de <i>catharanthus roseus</i>	21
3.1.1	Lignée cellulaire	21
3.1.2	Conditions de culture	21
3.1.3	Échantillonnage de cellules végétales	21
3.2	Élicitation des cellules	21
3.2.1	Préparation des cellules avant traitement	21
3.2.2	Application du plasma froid d'argon	22
3.2.3	Élicitation par Jasmonate de Méthyle	23
3.2.4	Campagnes expérimentales	24
3.3	Analyses de viabilité et d'activité métabolique	24
3.3.1	Suivi de la viabilité cellulaire	24
3.3.2	Mesure du taux de consommation d'oxygène	26
3.3.3	Mesure de la concentration cellulaire	26
3.3.4	Calcul de la consommation spécifique en oxygène	27
3.3.5	Analyse statistique	27
3.4	Extraction des métabolites	28
3.5	Quantification des métabolites	29
3.5.1	Quantification par chromatographie ultra haute performance et spectrométrie de masse	29
3.5.2	Mesure de la masse sèche cellulaire	30
3.5.3	Calcul des taux de production spécifiques	30
3.6	Évaluation de l'activité cytotoxique des extraits	30
3.6.1	Culture de cellules de cornée ARPE-19	30
3.6.2	Test de cytotoxicité	31
CHAPITRE 4	RÉSULTATS ET DISCUSSION	32
4.1	Contrôle de la viabilité cellulaire lors des traitements expérimentaux	32
4.1.1	Le plasma froid, un éliciteur sans impact sur la viabilité cellulaire	32
4.1.2	L'extraction sur billes XAD-7, une méthode sans effet sur la viabilité cellulaire	33
4.1.3	Le Jasmonate de Méthyle, un éliciteur à l'impact modéré sur la viabilité cellulaire à long terme	34
4.2	Impact du plasma froid sur le taux de consommation spécifique d'oxygène	36

4.3	Effet du plasma froid sur la production d'alcaloïdes détectés par UPLC-MS/MS	39
4.4	Effet du plasma froid sur l'activité cytotoxique des alcaloïdes produits	41
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE		47
5.1	Le plasma froid, un éliciteur non cytotoxique mais capable d'induire un stress contrôlé	47
5.2	Une production accrue d'alcaloïdes anticancéreux stimulée par le plasma froid	47
5.3	Le plasma froid comme outil clé dans les stratégies d'élicitation combinée . .	49
CHAPITRE 6 CONCLUSION		50
6.1	Synthèse des travaux	50
6.2	Limitations	50
6.3	Améliorations futures	51
RÉFÉRENCES		53
ANNEXES		60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Exemples d'éliciteurs biotiques d'origine biologique [1–4].	12
Tableau 2.2	Exemples d'éliciteurs abiotiques d'origine non biologique [1–4].	12
Tableau 2.3	Éliciteurs abiotiques et biotiques utilisés pour stimuler la production de métabolites secondaires chez <i>C. roseus</i> [5–9].	13
Tableau 2.4	Études sur l'effet du plasma froid sur des cals végétaux.	18
Tableau 2.5	Études sur l'effet du plasma froid sur des graines de <i>C. roseus</i>	19
Tableau A.1	Composition du milieu MS (en mg/L) [10]	60
Tableau B.1	Moyennes (a) et écarts-types (b) de la viabilité cellulaire (en %) pour les cellules contrôle et les cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 60, 90, 120 et 150 s, correspondant aux données présentées à la figure 4.1.	61
Tableau B.2	Moyennes (a) et écarts-types (b) de la viabilité cellulaire (en %) pour les cellules contrôle et les cellules traitées par plasma froid d'argon (120 s), avec ou sans présence de billes XAD-7, correspondant aux données présentées à la figure 4.2.	62
Tableau B.3	Moyennes (a) et écarts-types (b) de la viabilité cellulaire (en %) pour les cellules contrôle et les cellules traitées par plasma froid d'argon 30, 60 et 90 s, avec ou sans MeJA, correspondant aux données présentées à la figure 4.3.	63
Tableau D.1	Moyennes (a) et écarts-types (b) des concentrations en tryptamine (en $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$) mesurées par UPLC dans les cellules contrôle et traitées par plasma froid pendant 30, 60 et 90 s, avec ou sans MeJA, correspondant à la figure 4.6.	66

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	<i>Catharanthus roseus</i> . Photo : Joydeep, Wikimedia Commons, 24 août 2012. Licence CC BY-SA 3.0.	4
Figure 2.2	Voie métabolique de biosynthèse de la VBL et de la VCR dans <i>C. roseus</i> . Image reproduite de Guo et al. (2024) [11], sous licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/	8
Figure 3.1	Jet de plasma froid d'argon appliqué à des cellules de <i>C. roseus</i> dans une plaque de 24 puits.	22
Figure 3.2	Suivi de la viabilité cellulaire par coloration au bleu de trypan et observation au microscope optique à champ clair.	25
Figure 4.1	Évolution de la viabilité cellulaire normalisée (par rapport à la valeur mesurée avant traitement, au temps 0) au cours du temps après traitement. Les courbes correspondent aux cellules contrôle et aux cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 60, 90, 120 et 150 s. Chaque point représente la moyenne issue du comptage d'un seul échantillon mesuré en quadruplicata. Les barres d'erreur indiquent la précision attendue de 2,4 %, tel que décrite à la sous-section 3.3.1.	33
Figure 4.2	Évolution de la viabilité cellulaire normalisée (par rapport à la valeur mesurée avant traitement, au temps 0) au cours du temps après traitement, en présence ou en absence de billes XAD-7, pour les cellules contrôle (a) et les cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 120 s (b). Chaque point représente la moyenne issue du comptage d'un seul échantillon mesuré en quadruplicata. Les barres d'erreur indiquent la précision attendue de 2,4 %, tel que décrite à la sous-section 3.3.1.	34

Figure 4.3	Évolution de la viabilité cellulaire normalisée (par rapport à la valeur mesurée avant traitement, au temps 0) au cours du temps après traitement, en présence ou en absence de MeJA, pour les cellules contrôle (a) et les cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 30 s (b), 60 s (c) et 90 s (d). Chaque point correspond à la moyenne issue du comptage de cinq échantillons indépendants pour la condition contrôle (a) et de trois échantillons indépendants pour les conditions traitées (b-d), chaque échantillon étant compté en quadruplicata, tel que décrit à la sous-section 3.3.1. L'écart-type est représenté en transparence.	35
Figure 4.4	Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement, des cellules après traitement par plasma froid d'argon (30, 60 et 90 s), en présence ou en absence de MeJA. Les courbes représentent la moyenne des puits pour chaque condition sur toutes les sous-cultures, l'écart-type étant indiqué en transparence. Les cellules contrôle sont incluses pour comparaison.	37
Figure 4.5	Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement, des cellules après traitement par plasma froid d'argon (30, 60 et 90 s), en présence ou en absence de MeJA, sans les deux puits présentant des mesures aberrantes (un pour 60 s et MeJA et un pour 90 s et MeJA). Les courbes représentent la moyenne des puits pour chaque condition sur toutes les sous-cultures, l'écart-type étant indiqué en transparence. Les cellules contrôle sont incluses pour comparaison.	38
Figure 4.6	Concentration de tryptamine normalisée par rapport aux cellules contrôle pour les cellules non traitées et celles exposées au plasma froid d'argon pendant 30, 60 et 90 s, en présence ou absence de MeJA. Les concentrations des cellules contrôle (avec et sans MeJA) proviennent de cinq expériences indépendantes, tandis que celles des cellules traitées proviennent de trois expériences indépendantes. Les moyennes et écarts-types sont représentés en (a), et les valeurs individuelles de chaque expérience sont tracées en (b).	40
Figure 4.7	Mesure de l'absorbance à 570 nm des cellules ARPE-19 après 24 h (a), après 12 h (b) et après 48 h de contact avec les extraits obtenus à partir des billes XAD-7 des cellules contrôle et des cellules traitées par plasma froid d'argon (30 s, 60 s et 90 s) lors du test MTT. La courbe d'étalonnage est tracée en pointillés.	43

Figure 4.8	Mesure de l'absorbance à 570 nm des cellules ARPE-19 après 48 h de contact avec les extraits obtenus à partir de la lyse cellulaire des cellules contrôle et des cellules traitées par plasma froid d'argon (30 s, 60 s et 90 s) lors du test MTT. La courbe d'étalonnage est tracée en pointillés.	44
Figure C.1	Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement, en présence ou en absence de MeJA, pour les cellules contrôle et les cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 30 s, 60 s et 90 s. Chaque mesure correspond à la moyenne des triplicats de mesure de consommation d'oxygène réalisé pour chaque condition, et l'écart-type est représenté en transparence. Les sous-figures (a) à (e) correspondent aux mesures réalisées sur différentes sous-cultures. . . .	64
Figure C.2	Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement, pour les cellules contrôle (sans MeJA (a) et avec MeJA (b)), les cellules traitées par plasma froid 30 s (sans MeJA (c) et avec MeJA (d)), 60 s (sans MeJA (e) et avec MeJA (f)) et 90 s (sans MeJA (g) et avec MeJA (h)). Chaque courbe représente la moyenne des puits pour chaque condition sur toutes les sous-cultures. Les boîtes représentent la médiane, le premier et le troisième quartile. Les mesures situées en dehors de cette plage sont représentées par des ronds.	65

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2,4-D	2,4-dichlorophénoxyacétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATCC	American Type Culture Collection
<i>C. roseus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>
CBC	Cannabichromène
CBD	Cannabidiol
DBD	Décharge à barrière diélectrique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
FBS	Sérum fœtal bovin
LS	Linsmaier et Skoog
MAPK	Kinases activées par un mitogène
MeJA	Jasmonate de méthyle
MS	Murashige & Skoog
MS/MS	spectrométrie de masse tandem
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PEG	polyéthylène glycol
Pen-Strep	Pénicilline-streptomycine
ppm	parties par million
q_{O_2}	taux de consommation spécifique d'oxygène
RNS	Espèces réactives de l'azote
RONs	Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SA	Acide salicylique
SH	Schenk et Hildebrandt
SLM	Litres standard par minute
TRM	Tryptamine
TAB	Tabersonine
UPLC	Chromatographie liquide à ultra haute performance
UV	Ultraviolet
VBL	Vinblastine
VCR	Vincristine

Formules chimiques et ions

Ag^+	Ion argent(I)
Ca^{2+}	Ion calcium
CaCl	Chlorure de calcium
Cd^{2+}	Ion cadmium(II)
CeCl_3	Chlorure de cérium(III)
CeO_2	Oxyde de cérium(IV)
Cl^-	Ion chlorure
Co^{2+}	Ion cobalt(II)
Fe^{2+}	Ion fer(II)
H^+	Ion hydrogène
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
K^+	Ion potassium
KCl	Chlorure de potassium
NaCl	Chlorure de sodium
NdCl_3	Chlorure de néodyme(III)
NO	Oxyde nitrique
Y_2O_3	Oxyde d'yttrium

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	Composition du milieu MS	60
Annexe B	Suivi de la viabilité cellulaire après traitement par plasma froid d'argon	61
Annexe C	Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement	64
Annexe D	Concentration en tryptamine après traitement des extrait issues de la lyse cellulaire	66

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte Général

En 2022, près de dix millions de décès liés au cancer ont été recensés, faisant de cette maladie l’une des principales causes de mortalité dans le monde. Cette même année, l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait qu’une personne sur cinq développerait un cancer au cours de sa vie [12]. La disponibilité et le coût des traitements représentent donc un enjeu de santé publique majeur.

La vinblastine (VBL) et la vincristine (VCR) sont deux molécules de chimiothérapie largement utilisées depuis les années 1960 [13], en raison de leur efficacité contre les cancers à un stade avancé [14] et les tumeurs multirésistantes [15]. Elles sont souvent administrées en thérapies combinées, associées à d’autres agents chimiothérapeutiques, ce qui permet d’améliorer l’efficacité des traitements [16]. Ces deux alcaloïdes sont biosynthétisés par la plante *Catharanthus roseus*, seule source naturelle capable d’en produire en quantités significatives [5]. Cependant, leurs rendements de production sont extrêmement faibles : plusieurs centaines de kg de feuilles sont nécessaires pour extraire seulement 1 g de VBL ou de VCR [17]. Compte tenu des posologies cliniques usuelles, entre 2,5 et 12,5 mg m⁻² pour la VBL et 1,4 mg m⁻² de surface corporelle pour la VCR par semaine, environ 2 kg de feuilles sont nécessaires pour traiter un seul patient pendant une semaine [18]. Ces contraintes entraînent de fortes pressions écologiques et économiques, expliquant le prix très élevé de ces molécules, entre 1 et 3,5 millions de dollars par kg [19].

Afin de diminuer ces pressions, plusieurs méthodes alternatives de production ont été explorées : la production *in vitro* à partir des cellules de la plante, la biotransformation ou la synthèse chimique. Ces approches sont toutefois très complexes à mettre en œuvre, en raison de la grande complexité de la voie de biosynthèse de ces composés, qui implique au moins 35 intermédiaires et 30 enzymes répartis dans sept compartiments intra- et extracellulaires [20], ainsi que plusieurs organes de la plante, tels que la tige, les feuilles et les racines [15]. À ce jour, aucune de ces stratégies n’est applicable à l’échelle industrielle [5, 17, 21], mais la production *in vitro* reste une voie particulièrement prometteuse.

Dans ce contexte, améliorer les rendements de production chez les cellules de *C. roseus* est essentiel. Une stratégie consiste à utiliser des éliciteurs, qui induisent un état de stress favorisant l’accumulation de métabolites secondaires tels que la VBL et la VCR, impliqués dans les mécanismes de défense de la plante. L’éliciteur le plus couramment employé est le

jasmonate de Méthyle (MeJA), une molécule naturellement produite par la plante en réponse à des signaux de stress, capable d'activer les voies de biosynthèse de ces alcaloïdes. De plus, l'emploi de combinaisons d'éliciteurs constitue une stratégie particulièrement efficace pour maximiser la production [9]. Cependant, ces approches ne sont pas encore suffisamment performantes pour inciter l'industrie à adopter la production *in vitro*. L'étude de nouvelles stratégies d'élicitation, facilement intégrables aux méthodes existantes, représente donc un enjeu scientifique et technologique majeur.

Depuis quelques années, le plasma froid émerge comme une méthode d'élicitation innovante. L'exposition de cellules à des gaz ionisés permet de générer des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS), induisant un stress oxydatif et modulant l'expression génétique [22]. L'utilisation biologique du plasma froid n'ayant commencé qu'au début du XXI^e siècle [23], son potentiel reste encore peu exploré et mal compris, en particulier en tant qu'éliciteur de cellules végétales. Les premiers travaux sur ce sujet n'ont été publiés qu'à partir de 2022 [24–27]. Bien que quelques études se soient intéressées à l'application du plasma froid sur les graines de *C. roseus* [28–31], aucune n'a évalué ses effets sur les cellules de la plante.

Ce projet de maîtrise s'intéresse donc à l'utilisation du plasma froid comme éliciteur chez une suspension cellulaire de *C. roseus*, que ce soit seul ou combiné à une méthode bien connue, le MeJA. Cette étude propose une première évaluation de l'efficacité de cette méthode pour produire de la VBL et de la VCR.

1.2 Objectifs de recherche

Le principal objectif de ce mémoire est de développer et d'évaluer un procédé d'élicitation par plasma froid d'argon pour stimuler la production d'alcaloïdes dans les cellules de *Catharanthus roseus*. Ce projet s'appuie sur l'hypothèse que le traitement par plasma froid d'argon stimule la production d'alcaloïdes chez les cellules de *C. roseus* sans induire de mortalité cellulaire. Il est également supposé que cet effet de stimulation est amplifié par l'ajout de MeJA en combinaison avec le plasma froid.

Pour atteindre cet objectif, les objectifs spécifiques suivants ont été définis :

1. Évaluer l'impact du plasma froid sur la viabilité et la consommation d'oxygène, en tant qu'indicateur de l'activité métabolique, des cellules de *C. roseus*.
2. Mesurer l'effet de l'élicitation par plasma froid sur la production d'alcaloïdes.
3. Comparer l'efficacité du plasma froid seul et en combinaison avec le MeJA pour stimuler la production d'alcaloïdes.
4. Analyser l'activité cytotoxique des extraits obtenus afin de vérifier la fonctionnalité

biologique des alcaloïdes produits.

1.3 Plan du mémoire

Ce mémoire est organisé en six chapitres. Le premier constitue l'introduction, suivie de quatre chapitres formant le corps du mémoire. Le chapitre 2 est consacré à une revue de littérature. Cette revue s'intéresse au rôle de *C. roseus* comme plante médicinale et aux alcaloïdes qu'elle produit, employés dans le traitement de divers cancers. Les enjeux liés à la culture de cellules *in vitro* et à la production de ces alcaloïdes anticancéreux à partir d'une suspension cellulaire y sont décrits, ainsi que les stratégies d'élicitation permettant de stimuler leur production. Enfin, l'utilisation de plasma froid comme nouvelle méthode d'élicitation pour stimuler la production de métabolites secondaires y est abordée. Le chapitre 3 décrit le matériel et les méthodes employés, incluant la lignée cellulaire, les conditions de culture, l'élicitation par plasma froid et par Jasmonate de méthyle, ainsi que les analyses pour évaluer la viabilité cellulaire, le taux de consommation d'oxygène, la production d'alcaloïdes et l'activité cytotoxique des extraits. Le chapitre 4 présente les résultats obtenus et discute de l'impact du plasma froid, seul ou combiné à MeJA, sur la viabilité cellulaire, la consommation d'oxygène, la production d'alcaloïdes et l'activité cytotoxique des extraits. Le chapitre 5 propose une discussion générale en synthétisant les résultats obtenus et en discutant de leurs implications pour l'élicitation de cellules de *C. roseus* par plasma froid et par MeJA. Enfin, le corps du mémoire est suivi d'un sixième chapitre composé des conclusions de ce travail et des recommandations pour la suite de ce projet.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre présente une revue de la littérature portant sur la production d’alcaloïdes anticancéreux par la plante *Catharanthus roseus*, ainsi que sur les méthodes de stimulation de cette production. Dans un premier temps, l’histoire et les propriétés médicinales de la plante sont présentées (section 2.1). Ensuite, les enjeux liés à la production de métabolites secondaires, tels que les alcaloïdes produits par *C. roseus*, dans des systèmes de culture végétale sont abordés (section 2.2). La troisième section porte sur les méthodes d’éllicitation pour stimuler cette production (section 2.3). Enfin, l’utilisation du plasma froid comme éliciteur chez *C. roseus* est abordée dans une quatrième section (section 2.4).

2.1 La plante *C. roseus* comme source d’alcaloïdes thérapeutiques

2.1.1 Histoire et usages traditionnels

Catharanthus roseus (L.) G Don, abrégé *C. roseus* et plus connue sous le nom de pervenue de Madagascar, est une plante de la famille des Apocynaceae (figure 2.1). Utilisée depuis l’Antiquité pour ses propriétés ornementales tant que médicinales [13], on retrouve des traces de son utilisation thérapeutique dans le folklore mésopotamien dès 2600 avant J.-C [15].



FIGURE 2.1 *Catharanthus roseus*. Photo : Joydeep, Wikimedia Commons, 24 août 2012. Licence CC BY-SA 3.0.

Originaire de l’île de Madagascar, dans l’océan Indien, cette plante s’est rapidement répandue. D’abord en Asie et en Afrique, on la retrouve aujourd’hui à l’état naturel sur tous les

continents [14].

C. roseus est utilisée traditionnellement dans de nombreux systèmes de médecine comme l'Ayurveda, le Siddha, l'Unani ou encore la médecine traditionnelle chinoise [13]. Toutes les parties de la plante (racines, feuilles, fleurs, tiges) sont ainsi exploitées, pour le traitement de très nombreux maux [15]. Les plus communs sont le traitement du cancer ou du diabète, mais la plante est également utilisée pour traiter l'asthme, réguler la pression sanguine, arrêter les saignements, réguler les menstruations, traiter les infections, les troubles gastriques, les problèmes de dos, la toux, l'infertilité, soulager la dépression, la fatigue, etc. [13–15].

Aujourd'hui, plusieurs études ont confirmé ses propriétés pharmacologiques, notamment ses effets anticancéreux, antihypertenseurs, antidiabétiques, antimicrobiens et antioxydants [13, 14]. Cependant, à l'exception de son activité anticancéreuse et antihypertensive, ces effets restent encore peu explorés et nécessitent des recherches approfondies avant d'envisager une application clinique [14]. Ainsi, l'utilisation clinique de *C. roseus* repose principalement sur ses alcaloïdes anticancéreux, tels que la VBL et la VCR, employés en chimiothérapie depuis les années 1960 [13].

2.1.2 Métabolites secondaires : des composés bioactifs d'origine végétale

Les propriétés médicinales de *C. roseus* sont dues aux métabolites secondaires qu'elle produit. Contrairement aux métabolites primaires (acides gras, glucides, acides aminés et acides nucléiques), les métabolites secondaires ne sont pas nécessaires aux processus vitaux d'une plante. Elles lui permettent d'interagir avec l'environnement et de répondre aux stress, c'est-à-dire à tous les facteurs qui modifient (positivement ou négativement) son fonctionnement, sa croissance ou sa reproduction. Ces stress peuvent être abiotiques (chaleur, UV, sécheresse, etc.) ou biotiques (infections microbiennes, champignons, herbivores). Ainsi, les métabolites secondaires permettent à la plante de se défendre contre les prédateurs ou les conditions environnementales extrêmes, mais elles ont aussi de nombreux autres rôles. Elles peuvent notamment attirer les insectes pollinisateurs ou, comme pour les phéromones animales, permettre une communication croisée avec d'autres plantes, etc. [32].

Il existe une très grande variété de métabolites secondaires, séparés en trois classes principales : les phénols, les terpénoïdes et les alcaloïdes. On estime que le nombre de métabolites secondaires végétaux connus dépasse aujourd'hui les 100 000 [32]. Cependant, un composé donné n'est souvent présent que dans un nombre très restreint d'espèces, voire uniquement dans quelques variétés d'une même espèce. La quantité produite est également très variable d'une espèce à l'autre, mais ne dépasse que très rarement 1 % du poids sec de la plante [33].

Longtemps négligés, les métabolites secondaires sont aujourd’hui massivement exploités commercialement comme produits pharmaceutiques, arômes, colorants, dans les aliments, les cosmétiques, ou encore les parfums [32].

2.1.3 Les alcaloïdes anticancéreux issus de *C. roseus*

C. roseus synthétise plus de 130 types de métabolites secondaires, parmi lesquels la VBL et la VCR sont les plus connues et les plus largement exploitées en raison de leurs propriétés anticancéreuses. Découvertes dans les années 1950 par Robert Noble et Charles Beer, ces molécules sont aujourd’hui couramment utilisées comme médicaments anticancéreux, parfois seules, mais le plus souvent en thérapie combinée [34]. Ainsi, la VBL comme la VCR figurent sur la liste des médicaments essentiels de l’OMS en 2023. Ces médicaments sont employés dans le traitement de nombreux types de cancers, notamment les lymphomes (dont le lymphome de Hodgkin et le lymphome de Burkitt), la leucémie aiguë lymphoblastique, les tumeurs germinales testiculaires et ovariennes, les sarcomes tels que le sarcome d’Ewing et le rhabdomyosarcome, ainsi que certaines tumeurs cérébrales de bas grade [35].

La VBL et la VCR sont des poisons mitotiques qui perturbent la dynamique des microtubules, bloquant la mitose et induisant la mort cellulaire. Plus précisément, la VBL se fixe sur des sites situés aux extrémités des microtubules, ce qui provoque leur raccourcissement en direction de l’extrémité d’assemblage, même à faible concentration. La VCR, efficace à des doses encore plus faibles, se lie à la sous-unité β de la tubuline, ce qui inhibe l’assemblage des hétérodimères de tubuline en microtubules. Le mécanisme exact reste cependant mal compris [36]. En parallèle, la VBL et la VCR influencent également d’autres fonctions cellulaires, notamment en inhibant la synthèse des protéines et des acides nucléiques, en modifiant la composition des lipides membranaires, et en affectant la signalisation cellulaire via l’adénosine monophosphate cyclique (AMPc) [36].

Ces alcaloïdes présentent une toxicité non négligeable et sont classés parmi les agents chimiothérapeutiques vésicants, c’est-à-dire susceptibles de provoquer des lésions graves des tissus en cas d’extravasation (lorsqu’ils s’échappent accidentellement de la veine). À forte dose, la VBL présente également une toxicité gastro-intestinale accrue et affecte la moelle osseuse. La VCR, quant à elle, peut provoquer des nausées, des diarrhées, une perte de cheveux et une myélosuppression, c’est-à-dire une diminution de l’activité de la moelle osseuse entraînant une baisse de la production des cellules sanguines. Elle entraîne aussi, et c’est son effet secondaire le plus grave, une neurotoxicité périphérique, affectant les nerfs situés en dehors du cerveau et de la moelle épinière. [36]. Des voies pour réduire la neurotoxicité ou mieux cibler la délivrance de ces médicaments ont été explorées, mais elles restent très limitées, et

le respect des doses recommandées demeure essentiel [8, 14].

Malgré ces effets secondaires, la VBL et la VCR restent des traitements privilégiés dans de nombreux cas de cancers. Cela s'explique par leur capacité à être associées efficacement à d'autres agents chimiothérapeutiques, notamment ceux ciblant spécifiquement l'ADN [16], ainsi que par leur efficacité, même à un stade avancé de la maladie [14] ou contre les tumeurs multirésistantes [15].

2.1.4 Enjeux liés à la production de Vinblastine et de Vincristine

La production de VBL et de VCR doit répondre à une demande mondiale très élevée [34]. À ce jour, *Catharanthus roseus* reste la seule source naturelle connue de ces deux molécules [5]. Toutefois, les rendements sont extrêmement faibles : il faut respectivement environ 500 kg et 2000 kg de feuilles pour obtenir seulement 1 g de VBL et de VCR [17]. Cette faible productivité engendre une forte pression économique et écologique, les prix atteignant environ un million de dollars par kilogramme pour la VBL, et jusqu'à 3,5 millions pour la VCR [19]. Ainsi, les médicaments commercialisés à partir de ces composés représentent chacun un marché de plus d'un milliard de dollars [17]. Par ailleurs, cette dépendance exclusive à la plante rend la production particulièrement vulnérable aux événements environnementaux imprévisibles tels que les catastrophes naturelles, les maladies végétales ou les pandémies [17].

Ce faible rendement s'explique par la complexité de la voie de biosynthèse de la VBL et de la VCR. En effet, cette voie implique de nombreuses étapes enzymatiques et fait intervenir des précurseurs produits dans différents organes de la plante, notamment les racines, les tiges et les feuilles [15], ainsi que des enzymes exprimées dans divers types cellulaires et tissus [17]. La voie de biosynthèse est visible sur la figure 2.2. La vindoline et la catharanthine, précurseurs clés dans cette voie, sont très peu présentes dans les parties aériennes de la plante, là où la VBL et la VCR sont synthétisées [34]. Par ailleurs, malgré de nombreuses études, la voie de biosynthèse complète de ces alcaloïdes n'est pas encore entièrement élucidée [5].

La recherche s'intéresse aujourd'hui à des méthodes alternatives de production de la VBL et de la VCR, notamment par la culture cellulaire ou par biotransformation, la synthèse chimique demeurant extrêmement complexe [15] et encore loin d'être applicable à l'échelle industrielle [5]. Toutefois, bien que prometteuses, ces approches ne sont pas encore suffisamment efficaces ou développées pour permettre une production commerciale viable [5, 17, 21].

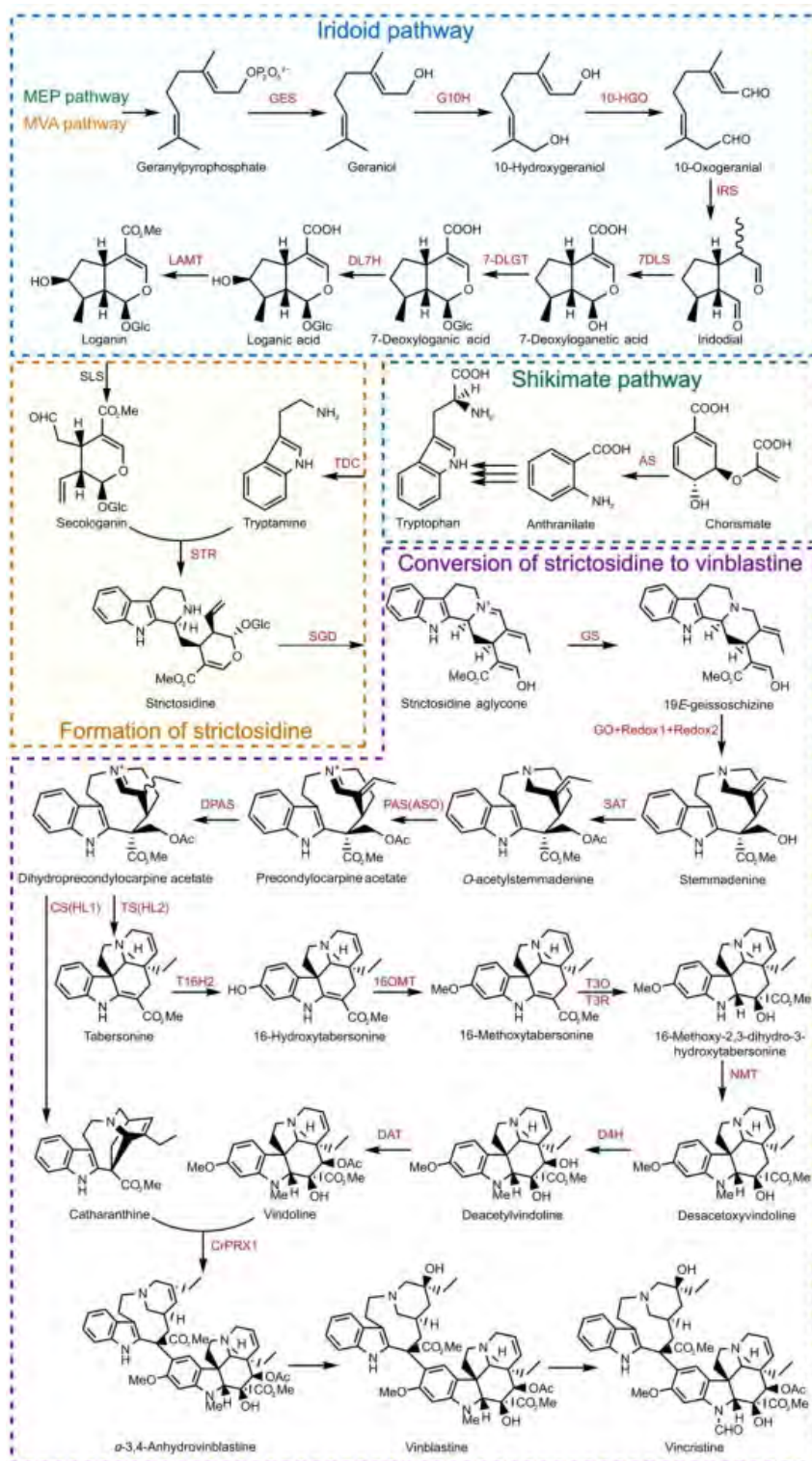


FIGURE 2.2 Voie métabolique de biosynthèse de la VBL et de la VCR dans *C. roseus*. Image reproduite de Guo et al. (2024) [11], sous licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

2.2 La culture *in vitro* de cellules végétales

2.2.1 Les principaux types de cultures végétales *in vitro*

Bien que la production de métabolites secondaires puisse être réalisée à partir de la plante entière ou par synthèse chimique, totale ou partielle, ces méthodes présentent plusieurs limites. D'un côté, le temps de croissance des plantes, l'impact écologique de leur culture et les faibles concentrations de molécules actives engendrent de nombreux problèmes. De l'autre, la complexité structurale des métabolites, les coûts associés à leur synthèse et l'introduction de sous-produits toxiques limitent l'approche chimique. Ces contraintes justifient de s'intéresser à une troisième voie : la culture de cellules végétales *in vitro* [1]. Pour beaucoup de métabolites secondaires, les cellules végétales sont biosynthétiquement totipotentes, c'est-à-dire qu'elles permettent de reproduire à l'identique les métabolites produits par la plante mère [2]. De plus, les cultures *in vitro* permettent dans de nombreux cas d'obtenir une production en métabolites secondaires plus élevée qu'en cultivant la plante entière en plein champ [32]. La culture de cellules végétales peut également être une excellente plateforme de biotransformation, permettant la synthèse de composés qui ne sont pas naturellement produits par la plante mère [2, 33].

On distingue plusieurs types de cultures de cellules végétales : les cals (culture sur milieu solide), les suspensions cellulaires (culture en milieu liquide), les cultures de racines chevelues, les cultures embryogéniques et les cultures de pousses [37]. Parmi celles-ci, les suspensions cellulaires et les cultures de racines chevelues sont les plus couramment utilisées [1].

Les cals sont des amas de cellules végétales dédifférenciées, obtenus à partir d'un explant, c'est-à-dire un fragment de tissu végétal prélevé sur différents organes de la plante (feuille, tige, racine, etc.). L'explant est placé sur un milieu de culture solide contenant des hormones de croissance, afin de permettre la prolifération et de maintenir la dédifférenciation des cellules végétales. Les suspensions cellulaires, obtenues à partir de cellules dédifférenciées cultivées sous forme de cals puis transférées en milieu liquide agité, constituent un système très fiable, productif et facilement manipulable [1, 2, 37]. Les cultures de racines chevelues, générées par infection avec la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, permettent une croissance rapide, sont faciles à maintenir en sous-cultures sur de longues périodes et présentent une grande stabilité génétique. Cependant, la production se faisant par des cellules différenciées, elle est généralement limitée aux métabolites synthétisés dans les racines de la plante [1, 37].

2.2.2 Optimisation des conditions de cultures

La production de métabolites secondaires présente cependant de nombreuses limites, parmi lesquelles un taux de croissance cellulaire lent, une forte sensibilité aux conditions environnementales, une faible teneur en métabolites produits, ou encore le fait que ceux-ci sont principalement accumulés dans la vacuole, à l'intérieur des cellules, et non sécrétés dans le milieu [33]. Ainsi, la production de métabolites secondaires à l'échelle industrielle à l'aide de cultures cellulaires rend nécessaire l'optimisation des conditions de culture afin de maximiser les rendements.

Pour cela, la première étape consiste à sélectionner la lignée cellulaire à cultiver, en choisissant soigneusement la plante mère et l'organe servant à générer les cals [1]. Cette sélection peut se faire par essai-erreur, en analysant la croissance des cellules et la production de métabolites secondaires [2]. Elle peut également s'appuyer sur des approches chimiques, en utilisant des analogues de substrats qui ne peuvent être utilisés que par des cellules dont la voie métabolique est très active [1]. Cette méthode est cependant limitée par une diminution de la capacité à produire les métabolites secondaires après un grand nombre de passages, en raison de l'instabilité génétique, en particulier pour les cultures en suspension cellulaire. Cette contrainte peut être atténuée par des techniques de triage par flux et l'utilisation de marqueurs sélectionnables [1].

L'optimisation du milieu est également un point clé, qui affecte fortement la croissance de la biomasse et la production de métabolites secondaires. Des milieux standards (Murashige & Skoog (MS), Schenk et Hildebrandt (SH), Gamborg B5 et Linsmaier et Skoog (LS)), développés entre 1962 et 1972, sont encore très couramment utilisés aujourd'hui [1]. La composition en nutriments, les niveaux de nitrate et de phosphate, ou encore la source de carbone choisie sont autant de paramètres ayant un impact significatif sur la production de métabolites secondaires [2].

D'autres paramètres liés aux conditions de culture peuvent également être ajustés en fonction des besoins, tels que le pH, la température, l'intensité lumineuse, la présence et la concentration de régulateurs de croissance (dont les plus courants sont le 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et la kinétine), ou encore la densité de l'inoculum [2]. Le type de culture utilisé a également un impact. Par exemple, il a été observé que des cellules cultivées sous forme de cals produisent deux à trois fois moins de métabolites que les mêmes cellules cultivées en suspension [9].

Ainsi, la sélection de la lignée cellulaire, l'adaptation du milieu et l'optimisation de l'environnement de culture peuvent permettre d'augmenter la production de métabolites secondaires

de 20 à 30 fois [1].

2.2.3 Stimulation de la production de métabolites secondaires

En général, la croissance de la biomasse et la production de métabolites secondaires sont deux processus inversement proportionnels. Ainsi, la biosynthèse de métabolites secondaires est souvent déclenchée après une phase de croissance cellulaire [1].

Une stratégie classique consiste à transférer les cellules dans un milieu dit « de production ». Les modifications typiques de la composition incluent la suppression des régulateurs de croissance, la réduction de la concentration en phosphate, l'augmentation de la concentration en saccharose ou encore la modification du rapport carbone/azote [1]. L'ajout de précurseurs métaboliques dans le milieu est également utilisé pour faciliter la biosynthèse des molécules d'intérêt [2].

D'autres stratégies ont également été développées pour stimuler la production de métabolites secondaires. En effet, comme elles sont naturellement produites comme moyens de défense, stimuler cette réponse défensive est une stratégie particulièrement efficace. On parle alors d'élicitation. Le terme « éliciteur » est plus ou moins large selon les auteurs, et peut inclure, selon certaines définitions, la modification du milieu de culture. En général, le terme « éliciteur » désigne tout agent, physique ou chimique, capable d'induire ou de stimuler une réaction de défense se traduisant par la production de métabolites secondaires [32].

On distingue deux grandes catégories d'éliciteurs : biotiques et abiotiques. Les éliciteurs biotiques sont d'origine biologique. Ils peuvent provenir de champignons, de bactéries, d'herbivores, de fragments de parois cellulaires végétales, ou encore de substances chimiques libérées par la plante en réponse à une attaque [3]. Des exemples courants d'éliciteurs biotiques sont présentés dans le tableau 2.1.

Les éliciteurs abiotiques, quant à eux, sont d'origine non biologique. Il peut s'agir de stimuli physiques ou chimiques, dont les plus courants sont présentés dans le tableau 2.2.

L'efficacité d'une stratégie d'élicitation dépend de nombreux paramètres, tels que la concentration de l'éliciteur, sa spécificité, la durée d'exposition, l'âge des cellules ou encore le stade de croissance de la culture au moment de l'élicitation [1, 4]. La stratégie de production la plus efficace est souvent la combinaison de plusieurs types d'éliciteurs (biotiques et/ou abiotiques) [1, 2].

Certaines de ces stratégies peuvent également être envisagées *in vivo*, bien que les recherches dans ce domaine soient encore limitées. Cela s'explique notamment par la complexité expérimentale que représente l'élicitation dans des systèmes entiers. L'étude des éliciteurs *in*

TABLEAU 2.1 Exemples d'éliciteurs biotiques d'origine biologique [1–4].

Éliciteur biotique	Exemples
Champignons	<i>Glomus mosseae</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Claviceps purpurea</i>
Bactéries (PGPR et autres)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Azospirillum brasilense</i>
Polysaccharides fongiques et microbiens	Chitosane, Chitine, Oligogalacturonides
Protéines fongiques ou microbiennes	Cryptogéin, Pectolyase, Elicitines
Fragments de parois cellulaires végétales	Pectine, Cellulose
Molécules de signalisation végétale (phytohormones)	Acide salicylique (SA), MeJA
Extraits biologiques	Extrait de levure

TABLEAU 2.2 Exemples d'éliciteurs abiotiques d'origine non biologique [1–4].

Éliciteur abiotique	Exemples
Température	Froid, chaleur
pH	Acidification ou alcalinisation du milieu
Champ électrique	Champs électriques pulsés
Lumière	Ultraviolet (UV) B (280 - 315 nm) et C (100 - 280 nm), lumière blanche
Métaux lourds / ions	Ag^+ , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+}
Salinité	NaCl, KCl
Sécheresse	Mannitol, polyéthylène glycol (PEG)

vitro reste donc essentielle pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action, même dans une perspective d'application *in vivo* [38]. Par ailleurs, l'efficacité d'un éliciteur peut varier considérablement d'une espèce végétale à l'autre. Il est donc nécessaire de mener des études approfondies, spécifiques à chaque éliciteur et à chaque espèce, avant de pouvoir conclure sur leur efficacité [39]. Enfin, notre compréhension limitée des voies de biosynthèse des métabolites secondaires, ainsi que des mécanismes d'action des éliciteurs pour de nombreuses espèces végétales, reste souvent un obstacle à la mise en œuvre efficace de ces stratégies [2, 34].

2.3 L'élicitation pour stimuler la production d'alcaloïdes d'une suspension cellulaire de *C. roseus*

2.3.1 Types d'éliciteurs utilisés chez les cellules de *C. roseus*

De très nombreuses méthodes d'élicitation ont été testées chez *C. roseus*. Les plus courantes sont répertoriées dans le tableau 2.3. Chaque méthode influence différemment la biosynthèse des divers alcaloïdes, selon sa nature et ses conditions d'application. Certaines favorisent particulièrement l'accumulation de précurseurs tels que la catharanthine ou la vindoline, sans nécessairement améliorer, voire en réduisant, la production de VBL et de VCR. D'autres, au contraire, permettent une augmentation de ces alcaloïdes anticancéreux sans effet notable sur la concentration de leurs précurseurs [9].

TABLEAU 2.3 Éliciteurs abiotiques et biotiques utilisés pour stimuler la production de métabolites secondaires chez *C. roseus* [5–9].

Lumière	UV B (280–315 nm), UV proche (300–400 nm), lumière LED bleue
Métaux lourds / ions	Cd, CaCl ₂ , sulfate de vanadyle, orthovanadate de sodium, CeO ₂ , CeCl ₃ , Y ₂ O ₃ , NdCl ₃ 2
Salinité	NaCl, KCl
Sécheresse	Sorbitol, mannitol
Champignons	<i>Aspergillus flavus</i> , homogénat de <i>Pythium aphanidermatum</i>
Bactéries (PGPR et autres)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Polysaccharides fongiques et microbiens	Alginate de sodium, κ -carraghénane, carraghénane irradiée, chitooligosaccharides
Protéines fongiques ou microbiennes	Pectinase
Fragments de parois cellulaires végétales	Dérivé de la paroi d' <i>Aspergillus niger</i>
Molécules de signalisation végétale (phytohormones)	MeJA, acide jasmonique, cytokinine, éthylène, SA
Molécules signal / stress oxydatif	oxyde nitrique (NO), H ₂ O ₂ , Sodium Nitroprusside

L'éliciteur le plus couramment utilisé chez *C. roseus* est le MeJA. Cette molécule est particulièrement efficace, car elle est naturellement synthétisée lorsque la plante est stressée, afin

d'activer des voies de signalisation impliquées dans les réponses de défense de la plante. Elle est également fréquemment utilisée dans des stratégies d'élicitation combinée, dont le but est d'amplifier l'effet de l'élicitation [9]. Cependant, combiner deux éliciteurs efficaces ne garantit pas nécessairement un effet synergique. Par exemple, l'utilisation conjointe du MeJA et de l'NO, une molécule signal également impliquée dans les réponses de défense, ne permet pas une stimulation efficace de la production d'alcaloïdes ; au contraire, une inhibition de l'effet du NO a été rapportée [6].

De plus, certaines molécules organiques, agissant comme précurseurs ou activateurs métaboliques, peuvent être utilisées pour stimuler la production des alcaloïdes de *C. roseus*. C'est notamment le cas du tryptophane, de la tryptamine, de l'acide succinique, du malate, de l'acide trans-cinnamique ou encore de l'acétyl-CoA [6, 40].

2.3.2 Mécanismes de réponse des cellules de *C. roseus* à l'élicitation

Lorsqu'elles sont exposées à des éliciteurs, les cellules de *C. roseus* déclenchent une cascade de réponses complexes. Les mécanismes d'action de ces éliciteurs ne sont pas encore entièrement élucidés, notamment pour ceux d'origine fongique ou issus de signaux végétaux. Néanmoins, il est possible d'en décrire les grandes étapes [6, 40] :

1. L'éliciteur se lie aux récepteurs situés sur la membrane plasmique ;
2. Cela entraîne une modification rapide des flux de Ca^{2+} , mais aussi de H^+ , K^+ et Cl^- vers le cytoplasme ;
3. Cette variation ionique est suivie par une acidification du cytoplasme, l'activation des nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) oxydases, la phosphorylation de protéines et l'activation d'une cascade de protéines kinases, incluant les kinases activées par un mitogène (MAPK), qui transfèrent le signal au noyau ;
4. Environ 2 à 5 minutes après la mise en contact avec l'éliciteur, la structure de la paroi cellulaire est temporairement, et pour une courte durée, modifiée. Il y a une réorganisation du cytosquelette, et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (comme le H_2O_2) ainsi que des espèces réactives de l'azote (RNS) (comme le NO) sont générées. Ces molécules agissent comme messagers secondaires, participant à la transmission du signal et à l'activation de la défense ;
5. Des messagers secondaires tels que le MeJA et l'SA sont synthétisés ;
6. L'expression des gènes codant pour des protéines de défense et des alcaloïdes comme la VBL et la VCR, est activée.

2.4 L'utilisation de plasma froid comme éliciteur de *C. roseus*

2.4.1 Le plasma froid : principes, applications et génération

Le plasma, aussi appelé « quatrième état de la matière », est un gaz quasi-neutre et ionisé, constitué d'atomes neutres et excités, d'électrons, d'ions et de radicaux. Connu depuis le XIX^e siècle, ce n'est qu'au début du XXI^e siècle que son utilisation en biologie a commencé à être étudiée [23]. Ses applications en médecine et en biologie sont aujourd'hui nombreuses, les plus courantes étant [41, 42] :

- stérilisation de matériel médical ;
- cicatrisation de plaies ;
- traitement du cancer ;
- traitement de semences végétales.

De nombreuses autres applications sont également possibles. Par exemple, le plasma froid a été utilisé pour faciliter la transfection génétique de cellules mammifères [43, 44]. En augmentant temporairement la perméabilité membranaire et en stimulant l'endocytose (processus par lequel les cellules absorbent des substances externes), il permet une introduction plus efficace du matériel génétique dans les cellules. Par son effet transitoire, cette méthode permet d'augmenter considérablement l'efficacité de la transfection locale.

Chez les plantes, le traitement au plasma peut induire de nombreuses réponses biologiques. En stimulant la production de régulateurs de croissance, il favorise la germination et la croissance des plantules. Il renforce également leur résistance à divers stress biotiques et abiotiques, notamment par l'activation de voies de signalisation systémiques régulant l'expression de gènes de réponse au stress et en activant les mécanismes de défense antioxydants. Ces traitements influencent directement la biosynthèse de métabolites secondaires, d'autant plus que la génération de plasma s'accompagne d'un rayonnement UV connu comme un éliciteur puissant chez de nombreuses espèces végétales [42]. Ce traitement, très prometteur, présente également le grand avantage de ne pas recourir à des produits chimiques potentiellement nocifs pour l'environnement, faisant du plasma une alternative durable aux méthodes agricoles traditionnelles [45].

Contrairement aux plasmas chauds, dont le Soleil est un parfait exemple et qui peuvent atteindre des millions de degrés, le plasma utilisé pour des applications biologiques est dit « froid », avec des températures de gaz inférieures à 40 °C. Ce plasma peut être généré en laboratoire par accélération des électrons d'un gaz (pur ou en mélange) au moyen de champs électriques, afin d'obtenir une ionisation par impact électronique [41]. De nombreux gaz ont été utilisés, dont l'oxygène, l'azote, l'hélium, l'argon ou encore l'air. Le choix du gaz influence

la présence et la quantité de certaines espèces réactives (comme le NO ou le H_2O_2), et donc les effets biologiques obtenus. Par exemple, l'argon favorise la production de H_2O_2 , tandis que l'air induit davantage la production de NO [42]. Les caractéristiques du plasma généré en laboratoire dépendent également de nombreux autres paramètres, tels que l'énergie appliquée, la pression ou encore la configuration de l'électrode. Pour les applications biologiques, seuls les plasmas générés dans des conditions de pression atmosphérique peuvent être utilisés [23], et les effets obtenus dépendent fortement du type de plasma et de la durée du traitement [45].

On distingue deux grands types de plasma fréquemment utilisés pour des applications biologiques : la décharge à barrière diélectrique (DBD) et le plasma jet. Dans la DBD, deux systèmes existent : le DBD de volume ou le DBD de surface (aussi appelé SBD). Dans le premier, le plasma est généré entre une électrode à haute tension isolée par un matériau diélectrique et le tissu traité, qui joue le rôle d'électrode de décharge. Dans le deuxième cas, le tissu n'est pas directement exposé au champ électrique permettant de générer le plasma, car l'électrode à haute tension en est isolée. Dans ce cas, seules les espèces réactives interagissent avec la cible. La DBD permet ainsi de traiter de grandes surfaces et utilise, dans la grande majorité des cas, de l'air comme gaz source. Le plasma jet, quant à lui, est produit à l'intérieur d'un dispositif tubulaire dans lequel circule le gaz de travail. Les électrodes sont placées à l'intérieur ou autour de ce tube et peuvent avoir différentes configurations (à broches, annulaires, à plaques, etc.). Le plasma, transporté par le jet de gaz (souvent des gaz nobles comme l'hélium ou l'argon) sortant du tube, peut être appliqué en contact direct avec la cible [41]. La méthode du plasma jet permet de traiter des échantillons à distance, sans que la surface fasse partie du circuit électrique, contrairement au DBD, ce qui offre plus de flexibilité [23]. Même si beaucoup moins fréquent, un troisième type de plasma est parfois utilisé : le plasma à décharge corona. Ce type de plasma est très proche de la DBD, mais ne nécessite pas de matériau diélectrique isolant, ce qui le rend moins stable [46].

2.4.2 Effets biologiques du plasma froid

Les effets biologiques du plasma sont majoritairement dus aux RONS générés, qui impactent les processus cellulaires en modulant la signalisation redox, c'est-à-dire les voies de communication intracellulaires régulées par des équilibres oxydo/réducteur [41]. En effet, les RONS jouent un rôle essentiel dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose des cellules (c'est-à-dire la mort cellulaire programmée) et peuvent fonctionner comme molécules de signalisation [45]. Lorsque ces espèces très réactives contenues dans le jet gazeux de plasma entrent en contact avec les tissus, plusieurs phénomènes complexes se produisent : le transport de ces espèces dans le tissu, mais aussi de nombreuses réactions chimiques entre les RONS et

les composés du tissu. Cependant, ces processus restent encore mal compris et font l'objet de nombreuses recherches [41].

Les effets des RONS sur les mécanismes cellulaires peuvent rapidement entraîner un stress oxydatif et devenir toxiques. Ces composés actifs n'étant générés uniquement durant l'application du plasma, deux effets distincts peuvent être ainsi obtenus selon la durée et l'intensité du traitement [41] :

- Stimulation de la prolifération cellulaire pour une intensité et une durée de traitement faibles ;
- L'apoptose cellulaire pour une intensité et une durée de traitement fortes.

Cependant, il est important de noter que certains RONS, dits « de longue durée » (comme le H_2O_2) ou certaines espèces réactives secondaires, formées à partir d'espèces réactives et d'espèces neutres, peuvent encore affecter les cellules longtemps après l'exposition au plasma. Ils ont également une capacité à se diffuser et donc à influencer des cellules loin du point d'application du plasma, et ce même si les RONS ne sont générés que localement [23].

2.4.3 Applications du plasma froid aux plantes

Le traitement au plasma a été majoritairement étudié sur les graines végétales, et plus rarement sur les cellules. De nombreuses études ont montré que, chez diverses espèces, les RONS générées par le plasma, telles que les nitrates, l'ozone ou le H_2O_2 , peuvent améliorer la germination, stimuler la croissance des semis, renforcer les défenses des plantes et favoriser la biosynthèse des métabolites secondaires [22].

Les mécanismes d'action des RONS lors du traitement des graines ne sont pas encore complètement élucidés. En particulier, leur absorption, leur stockage avant l'imbibition (c'est-à-dire la reprise de l'activité métabolique déclenchant la germination), ainsi que leur influence prolongée via la régulation génétique nécessitent encore des investigations approfondies. Toutefois, il est établi que le traitement par plasma froid perturbe l'équilibre rédox, modulant ainsi les réactions métaboliques, les cascades de signalisation telles que la MAPK et la régulation hormonale impliquant l'auxine, la cytokinine, l'éthylène, SA et le MeJA. On observe également une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, peroxydase), contribuant à une meilleure résistance aux stress abiotiques [22].

Si le traitement direct des graines ou des cellules végétales a démontré une grande efficacité, une approche indirecte consistant à appliquer le plasma uniquement sur le milieu de culture avant d'y placer les cellules ou les graines présente aussi de nombreux avantages. En effet, le plasma modifie alors les propriétés physico-chimiques du milieu, notamment le pH et le potentiel rédox. Le traitement indirect permet ainsi de limiter les effets néfastes du

plasma, comme le stress oxydatif, tout en conservant certains effets positifs, même s'ils sont généralement plus modérés [22, 47].

Le plasma froid constitue également un outil prometteur pour l'extraction de molécules bio-actives stockées à l'intérieur des cellules végétales. En modifiant la structure des parois cellulaires, qui deviennent plus poreuse, notamment par l'oxydation des polysaccharides pariétaux et par l'augmentation de leur hydrophilie, il facilite la libération de ces composés dans le milieu, améliorant ainsi l'efficacité de l'extraction [48].

2.4.4 Le plasma froid comme éliciteur chez les cellules végétales

Peu d'études ont été réalisées sur l'utilisation du plasma froid sur des cultures végétales *in vitro* [24], comme résumé dans le tableau 2.4.

TABLEAU 2.4 Études sur l'effet du plasma froid sur des cals végétaux.

Références	Cellules végétales	Type de plasma	Temps de traitement
Darigh et al., 2023 [24]	Cals de cannabis	Plasma à décharge corona	60, 120 et 180 s
Jevremovic et al., 2025 [25]	Cals d'iris jaune (<i>Iris reichenbachii</i>)	Jet de plasma d'hélium	10, 30 et 60 s
Živković et al., 2022 [26]	Cals d'iris nain barbu endémique des Balkans (<i>Iris reichenbachii</i> Heuff.)	Jet de plasma d'hélium	-
Tardast et al., 2023 [27]	Cals de <i>Datura innoxia</i>	Plasma à décharge corona d'air ambiant	60, 120, 180 et 300 s

Chacune de ces études a mis en évidence un effet significatif du plasma froid sur la production de métabolites secondaires et a montré sa capacité à déclencher efficacement leur synthèse.

Ces travaux ont également révélé des modifications épigénétiques, une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes, ainsi qu'une régulation transcriptionnelle accrue de certains gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires chez les cellules traitées [24, 25, 27]. Il est cependant important de noter que la durée du traitement influence fortement les résultats obtenus.

De plus, l'effet du plasma froid peut varier selon le type de métabolite au sein d'une même cellule. Par exemple, si le plasma a considérablement augmenté la production de cannabidiol (CBD), il a en revanche diminué le taux de cannabichromène (CBC) [24].

Une étude a également évalué l'impact à long terme du plasma froid, jusqu'à un an après traitement. Elle a mis en évidence des changements morphologiques durables et une production accrue de certains métabolites secondaires persistants, en partie attribuables à une activité mitotique accrue des cellules traitées [25].

2.4.5 Le plasma froid comme éliciteur chez *C. roseus*

Seulement quatre études, répertoriées dans le tableau 2.5, se sont intéressées à l'utilisation de plasma froid chez *C. roseus* depuis 2019, toutes sur les graines de la plante.

TABLEAU 2.5 Études sur l'effet du plasma froid sur des graines de *C. roseus*

Références	Type de plasma	Temps de traitement	Autres éliciteurs / précurseurs
Noormohammadi et al., 2019 [28]	Plasma jet d'hélium à 2 L/min	40, 50 et 60 s	-
Mohammadzadeh-shahir et al., 2019 [29]	Jet de plasma d'hélium	50 s	MeJA (100 μ M) et Putrescine (100 ppm)
Ghasempour et al., 2020 [30]	Plasma DBD d'argon à 2 L/min	30, 60 et 90 s	-
Marzban et al., 2022 [31]	Jet de plasma d'hélium	-	Acide jasmonique, MeJA, Spermine et Putrescine

Les résultats de ces travaux mettent en évidence une forte variabilité des effets du plasma froid selon les paramètres expérimentaux (type de plasma, gaz utilisé, durée d'exposition, combinaison avec d'autres éliciteurs, etc.). Cette variabilité se manifeste à tous les niveaux : caractères morphologiques, activité enzymatique antioxydante, composition génétique et production de métabolites secondaires.

Ainsi, Noormohammadi et al. [28] rapportent une stimulation de la croissance des feuilles et des tiges après traitement, tandis que Mohammadzadeh-Shahir et al. [29] observent une diminution de ces paramètres avec le plasma seul. L'étude de Ghasempour et al. [30] illustre particulièrement cette dépendance aux conditions : les traitements de 30 et 60 s par plasma DBD à l'argon améliorent significativement la croissance racinaire (en moyenne +41,4 %), alors qu'un traitement de 90 s entraîne un net ralentissement du développement des racines et de la plante.

De manière similaire, l'induction des enzymes antioxydantes impliquées dans le système de

défense de la plante (catalase, peroxydase) varie selon les études, les temps de traitement et les combinaisons d'éliciteurs. Si l'activation de la catalase semble dépendre davantage du temps de traitement, celle de la peroxydase est particulièrement influencée par la combinaison du plasma avec d'autres types d'éliciteurs [28–30].

Les effets sur le contenu génétique confirment cette sensibilité aux conditions. Si certains traitements au plasma seul entraînent des variations détectables par des marqueurs SRAP ou ISSR, ces modifications sont souvent peu marquées pour le plasma seul [28, 31]. Celles observées avec des combinaisons entre le plasma et d'autres éliciteurs semblent quant à elles plus marquées. Marzban et al. observent ainsi le degré de modification génétique le plus élevé pour le traitement combinant plasma froid et MeJA [31].

Sur les quatre études, seulement deux mesurent la production d'alcaloïdes. Ghasempour et al. [30] observent une augmentation de la concentration d'alcaloïdes pour tous les temps de traitement testés (dont l'intensité dépend de la durée du traitement). Au contraire, Mohammadzadeh-Shahir et al. [29] mesurent une diminution de la production d'alcaloïdes avec le traitement par plasma. Cette tendance est cependant inversée avec l'ajout de putrescine.

En pratique, cette variabilité implique que l'optimisation des paramètres de traitement est essentielle pour chaque type de plasma et de gaz. En effet, si ces études ont démontré le fort potentiel du plasma froid en tant qu'éliciteur chez *C. roseus*, de mauvais réglages peuvent rapidement inverser cette tendance. Il est également essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents, en particulier la relation entre stress oxydatif, régulation épigénétique et activation des voies de biosynthèse, afin de prédire et de contrôler les réponses de *C. roseus* à ce type de stimulus physique.

CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Culture cellulaire de *catharanthus roseus*

3.1.1 Lignée cellulaire

La lignée cellulaire CRA de *Catharanthus roseus* (rpc00014) a été fournie par RIKEN BRC dans le cadre du National BioResource Project of the MEXT, Japon.

3.1.2 Conditions de culture

Les cellules ont été cultivées dans un milieu MS supplémenté de 20 g L^{-1} de glucose et de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. La composition détaillée du milieu MS est présentée en annexe A. Le milieu a été ajusté à un pH de 5,7 puis autoclavé durant 15 min à 121°C .

Le passage cellulaire des cultures en suspension a été réalisé tous les 7 jours en ajoutant environ 20 mg de suspension à 50 mL de milieu MS frais, préparé un maximum de 4 jours avant le passage. Les cultures, placées dans des Erlenmeyers de 250 mL, ont été agitées à 220 rpm et maintenues à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ dans l'obscurité.

3.1.3 Échantillonnage de cellules végétales

Les cellules de *C. roseus* forment des agrégats dont la taille peut atteindre plusieurs mm. Afin de prélever des échantillons, les embouts de pipettes ont été modifiés à l'aide d'une pince, puis stérilisés par autoclave. Les embouts des micropipettes de 1 mL et de 200 µL ont été coupés à 2 cm du bord. Avant chaque prélèvement, les cultures étaient homogénéisées par mouvements circulaires lorsqu'elles étaient en flasque, ou par pipetage doux lorsqu'elles étaient cultivées en plaques de 24 puits.

3.2 Élicitation des cellules

3.2.1 Préparation des cellules avant traitement

Un Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu MS frais et environ 35 mg de suspension cellulaire a été préparé lors du passage cellulaire, puis conservé dans les mêmes conditions d'incubation pendant 4 jours. Immédiatement avant le traitement par plasma froid d'argon, environ 70 % du surnageant a été retiré après décantation et remplacé par du milieu MS

frais supplémenté de 10 mL L^{-1} de penicillin-streptomycin (Pen-Strep) (Cat. P4333, Sigma-Aldrich, Canada).

Pour chaque condition de traitement, une plaque de 24 puits (Costar 3337) a été remplie avec 1 mL par puits de suspension cellulaire homogénéisée par de légers mouvements circulaires.

3.2.2 Application du plasma froid d'argon

Le traitement a été réalisé à l'aide d'un jet de plasma froid atmosphérique conçu par Jean-Baptiste Billeau [49]. La source de plasma était alimentée en argon pur à un débit de 2 SLM. Le gaz était ionisé à l'aide d'un générateur haute tension, réglé à 20 % de puissance (tension de 2,33 kV et courant de 58,25 mA [50]), avec un rapport cyclique de 40 %, correspondant à la fraction de temps durant laquelle la tension est appliquée au cours d'un cycle. La fréquence du générateur était ajustée de manière à produire un jet stable, allongé et visiblement brillant. La source était utilisée après un temps de stabilisation de 20 min, afin d'assurer un régime permanent.

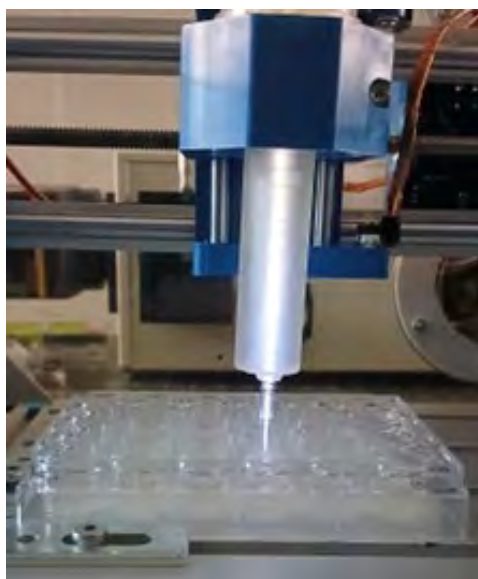


FIGURE 3.1 Jet de plasma froid d'argon appliqué à des cellules de *C. roseus* dans une plaque de 24 puits.

Le traitement était appliqué dans des plaques de 24 puits, avec une distance de 30 mm entre la sortie de la buse plasma et le fond du puits. Cette distance a permis d'assurer que le jet de plasma froid s'arrête au plus proche des cellules, afin d'assurer un traitement efficace tout en limitant le risque de mort cellulaire dû à un stress oxydatif trop important, une charge thermique trop élevée ou une contrainte de cisaillement due à l'agitation gazeuse.

Dans un premier temps, l'impact du plasma sur la viabilité cellulaire a été évalué pour des durées de traitement variant de 60 à 150 s. Pour ces mesures, le jet était fixe au centre du puits traité. Pour chaque durée de traitement, 12 puits, répartis aléatoirement dans les plaques, ont été traités.

Dans un deuxième temps, l'impact du plasma, seul ou en combinaison avec MeJA, sur la viabilité cellulaire, le taux de consommation d'oxygène et la production d'alcaloïdes a été évalué pour des durées de traitement comprises entre 30 et 90 s. Pendant l'exposition, le jet suivait un mouvement circulaire à une vitesse de 5 s par tour, avec un rayon $r_{\text{plasma}} = \frac{1}{2}r_{\text{puits}}$, où r_{plasma} est le rayon du cercle effectué par la source de plasma, et r_{puits} le rayon du puits traité, afin d'avoir un traitement plus homogène. Tous les puits d'une même plaque ont été exposés au plasma pendant la même durée, afin de limiter les effets de bord liés à un traitement différé. Un aperçu du dispositif est présenté en figure 3.1.

Les traitements étaient réalisés en conditions non stériles ; des conditions aseptiques étaient assurées par la présence de Pen-Strep dans le milieu.

Les cellules contrôle ont été placées hors de l'incubateur pendant toute la durée des traitements, dans la même pièce que la source de plasma, afin d'être soumises aux mêmes conditions environnementales (température, humidité, exposition à l'air ambiant). L'exposition des cellules contrôle au flux d'argon non ionisé n'a pas été réalisée systématiquement, car une expérience préliminaire n'a montré aucun effet du gaz seul sur la viabilité cellulaire, et un contrôle pour chaque durée de traitement aurait fortement limité le nombre d'expériences possibles.

3.2.3 Élicitation par Jasmonate de Méthyle

Immédiatement après le traitement par plasma froid, 2 μL de MeJA (Cat. 392707, Sigma-Aldrich, Canada), dilué dans de l'éthanol à une concentration de 50 mM, ont été ajoutés dans 12 des 24 puits de chaque plaque, afin d'atteindre une concentration finale de 100 μM . Cette concentration a été choisie car elle est considérée comme optimale pour induire la production de métabolites secondaires chez *C. roseus* [51]. Le MeJA a été homogénéisé par pipetage doux avec un embout modifié, comme décrit dans la section 3.1.3.

Après traitement, les plaques ont été replacées en incubation, agitées à 220 rpm et maintenues à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ dans l'obscurité durant 6 jours.

3.2.4 Campagnes expérimentales

Trois campagnes expérimentales ont été réalisées. La première visait à évaluer l'impact du plasma froid sur la viabilité cellulaire. Quatre durées de traitement ont été testées : 60, 90, 120 et 150 s. Dans ce cas, seule la viabilité cellulaire au cours des sept jours suivant le traitement a été mesurée. Ces premières données ont permis de sélectionner les durées de traitement retenues pour la suite du projet. Ces durées de traitement ont été choisies car elles correspondent aux durées habituellement utilisées pour le traitement de cellules végétales par plasma froid [24, 25, 27].

Dans un deuxième temps, la répétabilité de la méthode et l'effet de la combinaison avec le MeJA ont été évalués. Trois durées de traitement ont été testées : 30, 60 et 90 s, avec ou sans ajout de MeJA. Ces temps de traitement courts ont été sélectionnés afin que le traitement de volumes plus importants, prévus dans la suite du projet, ne demande pas une augmentation du temps de traitement irréaliste (sur plusieurs jours). Chaque expérience a été réalisée en triplicata, et un intervalle minimal d'une semaine a été respecté entre deux expériences, afin d'éviter l'utilisation d'une même sous-culture. Pour cette série, la viabilité cellulaire, le taux de consommation spécifique d'oxygène et la quantification chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC)-spectrométrie de masse tandem (MS/MS) ont été mesurés. Chaque semaine, trois plaques de 24 puits ont été préparées à partir de la même suspension cellulaire issue d'une flasque unique : une plaque contrôle et deux plaques traitées par plasma froid avec des durées différentes. Cette organisation était nécessaire en raison de la quantité limitée de suspension disponible (100 mL, comme décrit dans la sous-section 3.2.1)

Enfin, une évaluation de l'activité cytotoxique a été réalisée. Le traitement plasma a été appliqué sur une même sous-culture pour trois durées de traitement : 30, 60 et 90 s, afin de limiter la variabilité biologique. Pour cette expérience, la viabilité cellulaire, la quantification UPLC-MS/MS et un test de cytotoxicité ont été effectués.

3.3 Analyses de viabilité et d'activité métabolique

3.3.1 Suivi de la viabilité cellulaire

La lecture de la viabilité a été réalisée à deux moments : lors de la préparation des plaques de 24 puits pour le traitement par plasma froid (section 3.2.1), et six jours après le traitement, juste avant l'extraction des alcaloïdes (section 3.4). Quatre échantillons de 200 μ L de cellules homogénéisées ont été prélevés. Juste avant l'observation au microscope, 200 μ L de solution de bleu de trypan à 0,4 % (Cat. T8154, Sigma-Aldrich, Canada) ont été ajoutés à chaque échantillon, puis homogénéisés par vortex. Pour chaque échantillon, 20 μ L de ce mélange ont

été déposés directement sur la grille d'un hémocytomètre, puis recouverts d'une lamelle de verre.

Pour chaque échantillon, 4 images couleur, des 4 carrés situés dans les angles de la chambre de comptage, ont été acquises avec un microscope optique à champ clair équipé d'un objectif $5\times$ et d'un Optovar $1,6\times$, en utilisant le logiciel Zen (Zeiss). Un exemple typique des images obtenues est présenté à la figure 3.2. Le nombre de cellules viables (non colorées par le bleu, apparaissant jaunes) et le nombre total de cellules (viables + colorées en bleu) ont été comptés manuellement. La viabilité cellulaire a été calculée selon la formule 3.1 :

$$\% \text{ de viabilite} = \frac{\text{nombre de cellules viables}}{\text{nombre total de cellules}} \times 100 \quad (3.1)$$

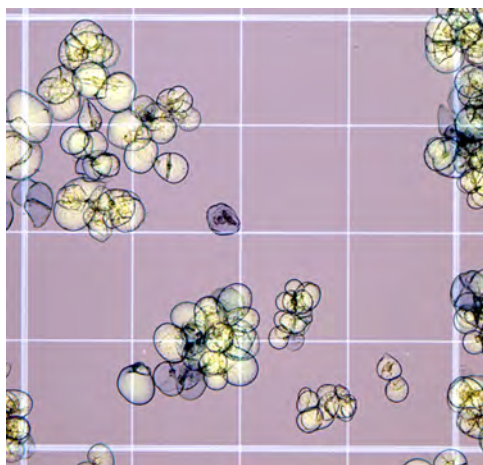


FIGURE 3.2 Suivi de la viabilité cellulaire par coloration au bleu de trypan et observation au microscope optique à champ clair.

Pour limiter les erreurs dues aux agrégats cellulaires, qui ne peuvent être dissociés sans tuer les cellules, les comptages ont toujours été réalisés par la même personne.

La précision de la méthode a été évaluée à partir de 16 mesures répétées sur un même échantillon. Pour un échantillon de viabilité moyenne de 85 %, l'écart-type observé était de 4,8 %. En tenant compte de cette variabilité, la précision attendue sur la moyenne d'un échantillon mesuré en quadruplicat est d'environ $\pm 2,4$ %, avec un intervalle de confiance à 95 % sur cette estimation de [1, 8; 3, 7].

Les valeurs de viabilité ont été normalisées par rapport à la viabilité mesurée avant traitement pour chaque condition, afin de permettre la comparaison directe de l'impact des différents traitements, indépendamment des variations initiales entre échantillons. L'homogénéité des valeurs de viabilité avant traitement a été vérifiée avant normalisation, avec un écart maxi-

mal inférieur à 10 %, afin de s'assurer que la normalisation n'a pas masqué de variabilité significative entre conditions.

3.3.2 Mesure du taux de consommation d'oxygène

Le taux de consommation d'oxygène a été mesuré à l'aide du dispositif Resipher (Lucid Scientific), conçu pour effectuer un suivi non-invasif de la respiration cellulaire en temps réel. La mesure a été réalisée dans des plaques de 96 puits (Nunc 243656), dont 32 étaient équipés d'une sonde à oxygène. Ces sondes effectuent des mouvements verticaux à l'intérieur des puits afin de mesurer le gradient d'oxygène dissous dans le milieu, à partir duquel est calculé le taux de consommation d'oxygène. Le système a été ajusté pour que les capteurs opèrent au-dessus de la couche de cellules de *C. roseus* sédimentées, sans perturber leur positionnement.

Immédiatement après l'élicitation des cellules par traitement au plasma froid (section 3.2.2) ou par ajout de MeJA (section 3.2.3), trois puits ont été remplis pour chaque condition avec 50 μ L de milieu MS frais et 50 μ L de suspension cellulaire homogénéisée. Ces puits ont été répartis aléatoirement parmi les 32 puits munis d'une sonde. Les autres puits ont été remplis avec 100 μ L de milieu MS, afin de limiter les effets de bord liés à l'évaporation.

La plaque de 96 puits, couverte par le module de détection remplaçant le couvercle, a été incubée sans agitation à 27 ± 1 °C dans l'obscurité pendant 6 jours. Les données de consommation d'oxygène ont été acquises automatiquement toutes les 15 min.

3.3.3 Mesure de la concentration cellulaire

La consommation d'oxygène a été normalisée en fonction de la concentration cellulaire, mesurée par fluorescence après coloration au Hoechst 33258, se liant spécifiquement à l'ADN. La méthode utilisée suit le protocole décrit par Lamboursain et Jolicoeur [52].

Immédiatement après l'arrêt de la mesure de consommation d'oxygène, les cellules de chaque puits ont été transférées dans un tube Eppendorf. Le milieu a été remplacé par 200 μ L de solution de fixation [méthanol :acide acétique, 3 :1 (v/v)], à l'aide d'une pipette munie d'un embout non modifié. Pour chaque tube, trois aliquotes de 50 μ L ont été prélevées après homogénéisation, puis neutralisées avec 2 μ L de NaOH 50 % (Cat. 380215000, Thermo Fisher, Canada).

La coloration a été réalisée en ajoutant 200 μ L d'une solution de travail contenant 1 M de NaCl (Cat. AM9760G, Thermo Fisher, Canada) et 75 μ g mL⁻¹ de Hoechst 33258 (Cat. H3569, Thermo Fisher, Canada) dans un tampon Tris 1 M à pH 7,5 (Cat. 50-751-7651, Fisher Scientific, Canada). Le niveau de fluorescence a été mesuré dans les 10 min suivant la coloration,

en transférant 50 μL de chaque échantillon, en quadruplicat, dans une plaque de 96 puits en polystyrène noir (CulturPlate 96F, Cat. 6055660, PerkinElmer, États-Unis). L'excitation a été réalisée à 360 nm et l'émission mesurée à 465 nm à l'aide du lecteur de microplaques Tecan Infinite M200 (ID # TE-580).

La courbe d'étalonnage a été construite à partir de standards allant de $1,0 \times 10^6$ à $8,0 \times 10^6$ cells/mL, obtenus par dilutions successives d'une suspension cellulaire dont la concentration avait été déterminée par comptage microscopique après dissociation enzymatique. Le comptage a été effectué à l'aide d'un microscope optique à champ clair, équipé d'un objectif $5\times$ et d'un Optovar $1,6\times$. La dissociation enzymatique a été réalisée avec un mélange de cellulase (10 U/mL, Cat. C2730, Sigma-Aldrich, Canada), d'hémicellulase (0,03 U/mL, Cat. H2125, Sigma-Aldrich, Canada) et de pectinase (0,2 U/mL, Cat. AAJ63408MD, Thermo Scientific, Canada), en solution dans un tampon citrate (Cat. AAJ63408MD, Thermo Scientific, Canada) supplémenté avec 60 g L^{-1} de sucrose.

3.3.4 Calcul de la consommation spécifique en oxygène

Le taux de consommation d'oxygène (r_{O_2}) mesuré a été exprimé en $\text{fmol mm}^{-2} \text{s}^{-1}$. Afin d'estimer la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) par cellule, la surface du puits et le nombre de cellules présentes ont été pris en compte.

La consommation spécifique d'oxygène a été exprimée en $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$, selon la formule 3.2 :

$$q_{\text{O}_2} = \frac{r_{\text{O}_2} \times A \times 3600}{C_{\text{cell}} \times V_{\text{cell}}} \quad (3.2)$$

où :

- r_{O_2} est le taux de consommation d'oxygène mesuré à l'aide du dispositif Resipher ($\text{fmol mm}^{-2} \text{s}^{-1}$);
- A est la surface du fond du puits (mm^2), définie par $A = \pi \left(\frac{6.1}{2}\right)^2 \approx 29.2 \text{ mm}^2$;
- 3600 est le facteur de conversion des secondes en heures;
- C_{cell} est la concentration en cellules dans le puits (cell/mL).
- V_{cell} est le volume de suspension cellulaire dans le puits (mL), ici $V_{\text{cell}} = 0,1 \text{ mL}$.

3.3.5 Analyse statistique

Les différences de consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) entre conditions expérimentales ont été analysées par ANOVA classique à un facteur. L'hypothèse d'homogénéité des variances a été vérifiée au préalable par le test de Levene. Chaque réplicat correspond aux mesures

obtenues après 48 h, afin de s'assurer que le gradient d'oxygène était stabilisé dans chaque puits et que les mesures reflétaient fidèlement la consommation d'oxygène. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative. Les analyses ont été réalisées avec Python 3.12.4 (package `statsmodels`).

3.4 Extraction des métabolites

L'extraction des alcaloïdes a été réalisée à partir du milieu extracellulaire à l'aide de billes XAD-7 (Cat. XAD7, Sigma-Aldrich, Canada), et à partir des cellules par lyse grâce à du méthanol acidifié (0,5 % HCl). Les billes XAD-7 ont été choisies pour leur grande capacité d'adsorption et leur sélectivité supérieure pour les alcaloïdes, comparativement aux billes XAD-2 et XAD-4, qui présentent une adsorption plus marquée pour les hormones et nutriments présents dans le milieu [53, 54]. La préparation et l'extraction des alcaloïdes ont été réalisées en suivant les recommandations de Wong et al. [53].

Les billes XAD-7 ont été préalablement lavées pendant 24 h dans du méthanol acidifié (0,5 % HCl), puis rincées trois fois à l'eau déminéralisée pendant deux heures, avant d'être stérilisées par autoclavage à 121 °C pendant 15 min. Immédiatement après l'élicitation des cellules, par traitement au plasma froid (section 3.2.2) et par ajout de MeJA (section 3.2.3), ainsi que la préparation des mesures de consommation d'oxygène, environ 50 mg (environ 0,05 mL, soit 5 % du volume de suspension cellulaire) de billes ont été ajoutées à chaque puits à l'aide d'une spatule stérile. Cette quantité permet d'assurer que les billes ne sont pas saturées et qu'elles n'affectent pas la viabilité des cellules.

Six jours après l'élicitation, les billes ont été séparées des cellules, puis transférées individuellement dans des bouteilles en verre borosilicaté de 100 mL (PYREX 1395-100) afin de limiter les interactions entre l'extrait et le contenant. Le délai de 6 jours a été choisi afin de maximiser la production d'alcaloïdes, dont les niveaux spécifiques atteignent généralement un pic au 5^{ème} ou 6^{ème} jour post-élicitation [55], tout en restant inférieur à la durée de culture habituelle (7 jours) afin de limiter la mortalité cellulaire liée à l'épuisement des nutriments.

Le milieu a été retiré à l'aide d'une pipette munie d'un embout non modifié, puis remplacé par 15 mL de méthanol acidifié (0,5 % HCl (v/v)). Les échantillons ont été mis sous agitation à 250 rpm pendant 8 h. L'extrait méthanolique a ensuite été filtré sur membrane de 0,22 µm et transféré dans une nouvelle bouteille en verre. Une deuxième extraction a été effectuée selon les mêmes conditions afin d'assurer une récupération maximale des alcaloïdes ; les deux extraits ont été combinés.

Le méthanol acidifié a ensuite été entièrement évaporé sous un flux d'azote, à température

et pression ambiantes. Le résidu sec a été ressuspendu dans 1 mL de méthanol pour analyse par UPLC-MS/MS (section 3.5) ou dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour le test de cytotoxicité (section 3.6).

3.5 Quantification des métabolites

3.5.1 Quantification par chromatographie ultra haute performance et spectrométrie de masse

La quantification de la VBL, de la tabersonine (TAB) et de la tryptamine (TRM) produites a été réalisée par UPLC-MS/MS. Ces trois alcaloïdes se trouvent respectivement en début, milieu et fin de la voie de biosynthèse de la VBL par les cellules de *C. roseus*.

L'analyse UPLC a été effectuée à l'aide d'une colonne Poroshell 120 Aq-C18 ($2,1 \times 50$ mm, $2,7 \mu\text{m}$, Cat. 699775-742, Agilent, Canada) à une température de 45°C , sur un système Agilent Technologies 6460 Triple Quadrupole LC/MS (modèle G6460A).

Les échantillons, préparés selon la méthode décrite en section 3.4 et initialement dissout dans du méthanol, ont été dilués avec de l'eau déminéralisée pour obtenir une solution à 50 % de méthanol. Ils ont été filtrés avant d'être injectés à un volume de 1 μL .

La phase mobile était composée de deux solvants :

- Solvant A : acide acétique (Cat. 338826, Sigma-Aldrich, Canada) 25 m M contenant 0,3 % d'acide formique (Cat. 06440, Sigma-Aldrich, Canada).
- Solvant B : méthanol (Cat. 80907, J.T Baker, Canada) contenant 25 m M d'acide acétique et 0,3 % d'acide formique.

Le débit de la phase mobile était de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. L'élution s'est faite selon un gradient linéaire : de 90 % de solvant A et 10 % de solvant B à $t = 0$ min, jusqu'à 20 % de solvant A et 80 % de solvant B à $t = 10$ min.

La détection par spectrométrie de masse a été réalisée en mode électrospray ionisation positive (ESI+) avec acquisition en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) sur un spectromètre triple quadrupole Agilent 6460. La température de la source était de 350°C , le débit de gaz auxiliaire de 7 L min^{-1} et la tension capillaire de 3500 V. Les paramètres de la source ont été optimisés pour chaque composé. Les quantifications ont été effectuées à partir de courbes d'étalonnage externes obtenues avec des standards purs : VBL (Cat. V1377, Sigma-Aldrich, Canada), TAB (Sigma, Cat. PHL80541, Sigma-Aldrich, Canada) et TRM (Sigma, Cat. 76706, Sigma-Aldrich, Canada).

Chaque mesure de concentration par UPLC-MS/MS a été réalisée en duplicata. Les concen-

trations en métabolites ainsi obtenues ont été normalisées par la concentration des extraits contrôle, afin de permettre la comparaison directe de l'impact des différents traitements, indépendamment des variations initiales entre échantillons ou des fluctuations potentielles liées au procédé d'extraction.

3.5.2 Mesure de la masse sèche cellulaire

La quantification des alcaloïdes a été normalisée en fonction de la masse sèche des cellules traitées. Lors de la préparation des plaques de 24 puits pour le traitement par plasma froid (section 3.2.1), quatre échantillons de 1 mL ont été prélevés après homogénéisation. Les échantillons ont été filtrés sous vide à l'aide de filtres en microfibre de verre GF/D (diamètre : 47 mm ; Whatman), puis abondamment rincés à l'eau déminéralisée. Chaque filtre a ensuite été placé dans un plat en aluminium jetable, puis séché à 70 °C pendant 24 h. La coupelle a été pesée afin de déterminer la biomasse sèche.

3.5.3 Calcul des taux de production spécifiques

Chaque échantillon quantifié par UPLC-MS/MS a été obtenu à partir de 12 puits de 1 mL de culture cellulaire. L'extrait sec correspondant a été dissous dans 1 mL de méthanol, auquel a été ajouté 1 mL d'eau déminéralisée.

Le taux de production spécifique (q) a été exprimé en $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$, selon la formule 3.3 :

$$q = \frac{C_{\text{UPLC}} \times V_{\text{dil}}}{m_{\text{dw}}} \quad (3.3)$$

où :

- C_{UPLC} la concentration en molécule d'intérêt mesurée par UPLC-MS/MS dans l'échantillon dilué ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ;
- V_{dil} le volume total du mélange après dilution (mL, ici 2 mL) ;
- m_{dw} la masse sèche totale de cellules provenant des 12 puits (mg).

3.6 Évaluation de l'activité cytotoxique des extraits

3.6.1 Culture de cellules de cornée ARPE-19

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur des cellules épithéliales rétinienne humaines normales immortalisées (ARPE-19). Bien que cette lignée ne soit pas tumorale, elle permet de fournir une première estimation de la cytotoxicité des alcaloïdes produits et a montré sa

sensibilité dans différents tests de cytotoxicité [56].

La lignée de cellules ARPE-19 a été obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC)(CRL-2302). Les cellules ont été cultivées dans du milieu OSE (Cat. 316-030-CL, Wisent, Canada), supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) (Cat. 080-150, Wisent, Canada), 550 μL de gentamicine (50 mg mL^{-1} , Cat. 450-135-XL, Wisent, Canada) et 1,2 mL d'amphotéricine B ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$, Cat. 450-105-QL, Wisent, Canada).

Les cultures ont été maintenues à $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sous atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 , dans des plaques à 6 puits (Costar, 3335). Le milieu de culture a été renouvelé deux fois par semaine. Le passage cellulaire a été réalisé à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (trypsine 0,05 %, 0,53 mM EDTA ; Cat. 325-542-EL, Wisent, Canada).

3.6.2 Test de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en suivant les recommandations du constructeur [57] et de Zandi et al. [58]. Pour évaluer la cytotoxicité des extraits, les cellules ARPE-19 ont été placées dans des plaques à 96 puits (Costar, 3300), avec 1×10^4 cellules par puits, dans 100 μL de milieu de culture. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 24h à 37°C , sous une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO_2 .

Le milieu a été remplacé par un nouveau milieu contenant 1 % de DMSO, dans lequel étaient dissout soit de la vinblastine standard (Cat. V1377, Sigma-Aldrich, Canada), à des concentrations comprises entre $1 \times 10^{-5} \mu\text{g mL}^{-1}$ à $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, soit les extraits préparés selon la méthode décrite en section 3.4. L'incubation a été poursuivie pendant 24 à 48 h, en fonction des concentrations des extraits testés.

La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide d'un test MTT (Cell Proliferation Kit I, Cat. 11465007001, Roche, Sigma-Aldrich, Canada). À l'issue de l'incubation, 10 μL de réactif MTT (concentration finale : $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) ont été ajoutés à chaque puits, suivis 4 h plus tard par 100 μL de solution de solubilisation. Après une nuit d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 570 nm, avec une longueur d'onde de référence à 750 nm.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Contrôle de la viabilité cellulaire lors des traitements expérimentaux

4.1.1 Le plasma froid, un éliciteur sans impact sur la viabilité cellulaire

Dans un premier temps, l'impact du plasma froid sur la viabilité cellulaire des suspensions a été évalué pour différentes durées de traitement (60, 90, 120 et 150 s) et à plusieurs temps après traitement (0, 24, 72 et 168 h), afin d'observer les tendances générales et d'identifier d'éventuelles limites de viabilité. La figure 4.1 présente l'évolution de la viabilité cellulaire après traitement, normalisée par rapport à la valeur mesurée au temps 0 pour chacune de ces conditions. Les barres d'erreur représentent la précision attendue de 2,4 % pour un échantillon mesuré en quadruplicata, telle que décrite à la sous-section 3.3.1. Les valeurs d'écart-type observées étaient globalement conformes à la précision attendue, avec seulement quelques cas isolés légèrement supérieurs. Le détail des moyennes et écarts-types est présenté en annexe B au tableau B.1. Pour tous les temps de traitements testés, aucune chute significative de la viabilité n'a été observée après 7 jours.

Ces mesures ont été réalisées avec un jet de plasma fixe, au centre des puits traités. Les durées de traitement étaient réparties aléatoirement dans la plaque de 96 puits, telles que décrit à la sous-section 3.2.2. Il est donc possible que des effets de bord liés à un traitement différé aient été présents, avec par exemple, les puits adjacents ayant pu être exposés à certains effets du plasma. De plus, le traitement à un point fixe pourrait avoir engendré une légère inhomogénéité au sein d'un même puits, malgré l'agitation provoquée par le flux de gaz.

Néanmoins, cette première étude préliminaire permet de conclure que, malgré des durées de traitement prolongées, jusqu'à 150 s, le plasma froid n'a pas d'effet nuisible significatif sur la viabilité cellulaire, au moins pendant sept jours post-traitement.

Ces résultats ont servi de base pour sélectionner les durées de traitement utilisées dans les expériences suivantes. Puisqu'aucune des durées testées, même prolongées, n'impacte la survie cellulaire, ce paramètre n'a pas représenté un facteur limitant. Les durées les plus courtes (30, 60 et 90 s) ont donc été choisies. Dans le contexte d'une augmentation d'échelle, considérée comme la prochaine étape de ce projet, cela permettra d'éviter des durées de traitement excessivement longues.

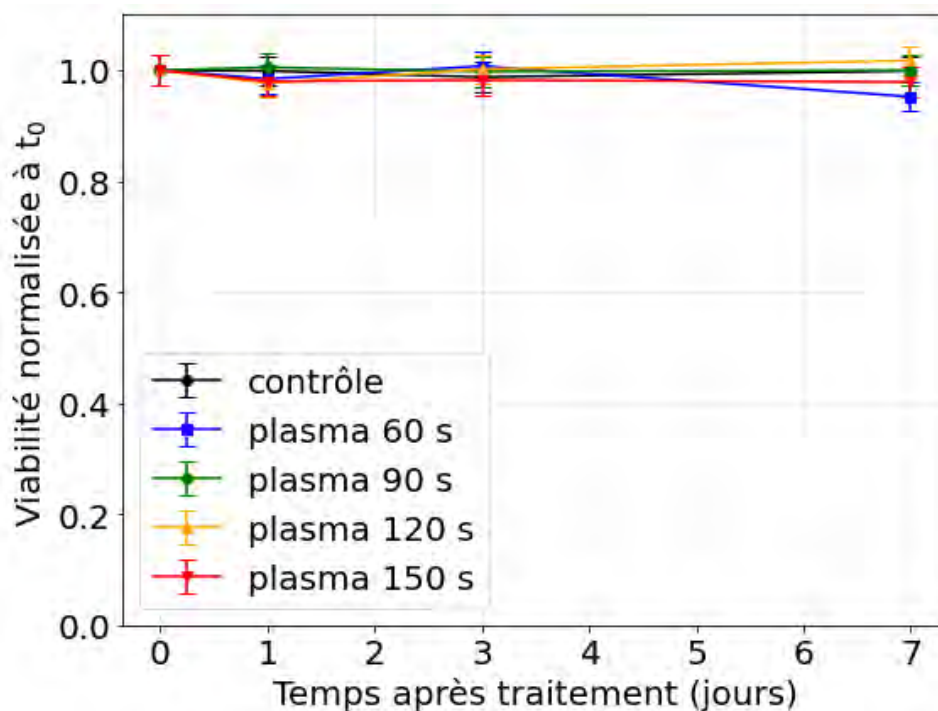


FIGURE 4.1 Évolution de la viabilité cellulaire normalisée (par rapport à la valeur mesurée avant traitement, au temps 0) au cours du temps après traitement. Les courbes correspondent aux cellules contrôle et aux cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 60, 90, 120 et 150 s. Chaque point représente la moyenne issue du comptage d'un seul échantillon mesuré en quadruplicata. Les barres d'erreur indiquent la précision attendue de 2,4 %, tel que décrite à la sous-section 3.3.1.

4.1.2 L'extraction sur billes XAD-7, une méthode sans effet sur la viabilité cellulaire

L'impact de la présence de billes XAD-7 dans la culture en suspension sur la cellulaire a été évalué chez des cellules contrôle et des cellules traitées par plasma froid pendant 120 s. Les billes ont été placées dans les cultures immédiatement après le traitement par plasma froid, tel que décrit à la section 3.4. Les mesures ont été effectuées immédiatement avant le traitement (temps 0), puis après 72 et 168 h. La figure 4.2 présente l'évolution de la viabilité cellulaire normalisée par rapport à la valeur mesurée au temps 0 pour chacune de ces conditions au cours du temps après traitement. Les barres d'erreur représentent la précision attendue de 2,4 % pour un échantillon mesuré en quadruplicata, telle que décrite à la sous-section 3.3.1. Les valeurs d'écart-type observées étaient globalement conformes à cette précision, sans dépassement de la limite attendue. Le détail des moyennes et écarts-types est présenté en annexe B au tableau B.2a. Pour les cellules contrôle comme pour les cellules

traitées par plasma pendant 120 s, aucune différence significative de viabilité n'a été observée après 7 jours, en présence ou en absence de billes XAD-7.

Cette étude confirme que la présence d'environ 50 mg de billes XAD-7 par puits n'influence pas la viabilité cellulaire. Cette méthode d'extraction n'est donc pas néfaste pour la viabilité, au moins pendant 7 jours de contact avec les billes.

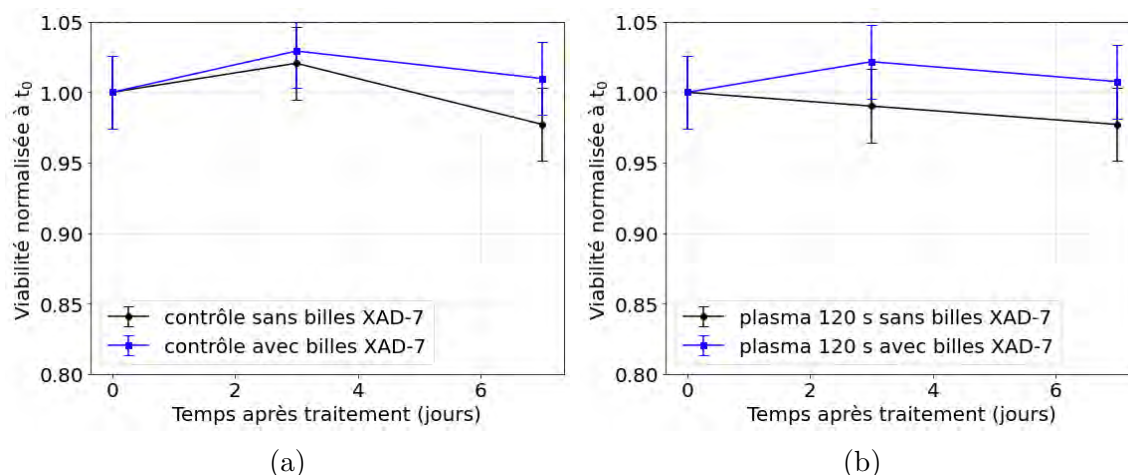


FIGURE 4.2 Évolution de la viabilité cellulaire normalisée (par rapport à la valeur mesurée avant traitement, au temps 0) au cours du temps après traitement, en présence ou en absence de billes XAD-7, pour les cellules contrôle (a) et les cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 120 s (b). Chaque point représente la moyenne issue du comptage d'un seul échantillon mesuré en quadruplicate. Les barres d'erreur indiquent la précision attendue de 2,4 %, tel que décrite à la sous-section 3.3.1.

4.1.3 Le Jasmonate de Méthyle, un éliciteur à l'impact modéré sur la viabilité cellulaire à long terme

Trois temps de traitement (30, 60 et 90 s) ont été testés en triplicat. Pour chaque temps, du MeJA a été ajouté dans la moitié des puits immédiatement après traitement par plasma froid, tel que décrit dans la sous-section 3.2.3. La viabilité cellulaire a été mesurée avant traitement (temps 0) et après 144 h. La figure 4.3 illustre l'évolution de la viabilité cellulaire au cours du temps après traitement, normalisée par rapport à la valeur initiale. Chaque courbe représente la moyenne des réplicats (5 pour la condition contrôle et 3 par condition de traitement), avec un écart-type représenté en transparence. Le détail des moyennes et écarts-types est présenté en annexe B (tableau B.3a).

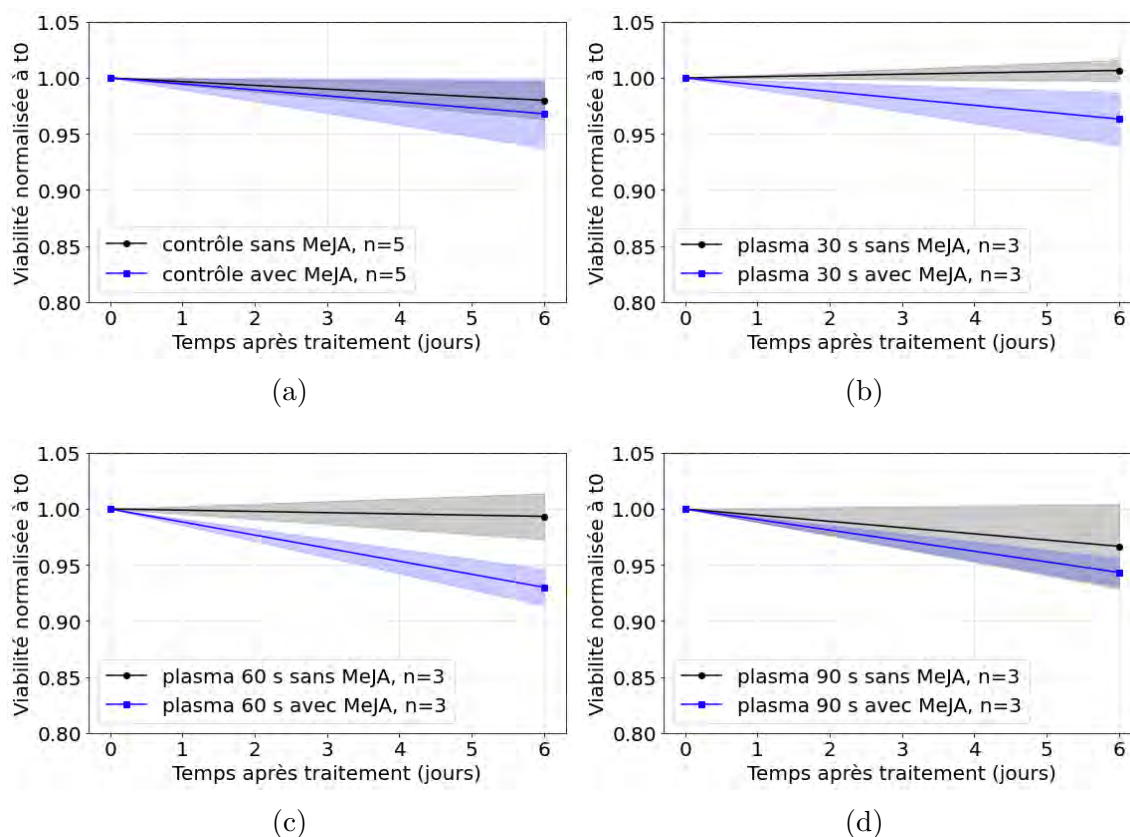


FIGURE 4.3 Évolution de la viabilité cellulaire normalisée (par rapport à la valeur mesurée avant traitement, au temps 0) au cours du temps après traitement, en présence ou en absence de MeJA, pour les cellules contrôle (a) et les cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 30 s (b), 60 s (c) et 90 s (d). Chaque point correspond à la moyenne issue du comptage de cinq échantillons indépendants pour la condition contrôle (a) et de trois échantillons indépendants pour les conditions traitées (b–d), chaque échantillon étant compté en quadruplicate, tel que décrit à la sous-section 3.3.1. L'écart-type est représenté en transparence.

On observe que l'effet du MeJA sur la viabilité cellulaire dépend de son association avec le plasma froid. Le MeJA seul n'induit pas de baisse significative de viabilité. En revanche, lorsqu'il est combiné au traitement par plasma froid, on constate une diminution de la viabilité après sept jours, restant toutefois inférieure à -5%. Ces résultats suggèrent que, individuellement, le plasma froid et le MeJA génèrent un stress cellulaire insuffisant pour affecter la viabilité, mais leur combinaison provoque un stress plus marqué, entraînant une diminution de la viabilité.

Cette observation est cohérente avec la littérature montrant que le MeJA peut activer des réponses de défense sans provoquer de cytotoxicité majeure [51], tandis que le plasma froid est connu pour induire un stress oxydatif tout en augmentant la biomasse des cellules traitées

[24–27]. Le couplage des deux traitements pourrait ainsi amplifier les signaux de stress, et s’approcher du seuil létal pour les cellules. D’un point de vue expérimental, cette faible baisse de viabilité est un résultat favorable : elle indique que les cellules restent majoritairement viables et peuvent continuer à produire des métabolites secondaires.

En résumé, le traitement combiné MeJA et plasma froid apparaît comme un moyen de stimuler un stress cellulaire contrôlé, capable de moduler la physiologie des cellules sans compromettre leur survie, ce qui justifie son utilisation dans les expériences suivantes.

4.2 Impact du plasma froid sur le taux de consommation spécifique d’oxygène

Le taux de consommation spécifique d’oxygène (q_{O_2}) a été évalué pour trois durées de traitement (30, 60 et 90 s), avec ou sans MeJA, en triplicat, afin d’évaluer de manière indirecte l’activité métabolique des cellules et l’impact du plasma froid seul ou en combinaison avec MeJA sur la respiration cellulaire (sous-section 3.3.4). Lors d’une expérience, le taux de consommation d’oxygène de chaque condition était mesuré en triplicat. Ainsi, les résultats obtenus proviennent de 9 mesures pour les cellules traitées et 15 pour les cellules contrôle. En raison d’un problème technique (choc sur la plaque de 96 puits contenant les cellules colorées, entraînant un débordement), seules huit mesures ont été exploitables pour les traitements plasma 60 s et 90 s en présence de MeJA.

Les courbes représentant la moyenne de ces mesures, avec l’écart type en transparence, sont visibles sur la figure 4.4. Les courbes individuelles sont visibles en annexe C dans la figure C.2 et les courbes obtenues pour toutes les conditions mesurées sur une même sous-culture sont présentées en annexe C dans la figure C.1.

Sur ces mesures, deux points clés peuvent être observés. Premièrement, une augmentation du q_{O_2} avec le temps pour toutes les conditions est visible durant les 80 premières heures. Cela montre que le traitement n’impacte pas la croissance cellulaire.

Deuxièmement, on observe que les traitements par plasma froid de 60 s et 90 s en présence de MeJA présentent des q_{O_2} plus élevés que les autres conditions. À l’inverse, les traitements plasma de 30 s, avec ou sans MeJA, présentent les q_{O_2} les plus faibles. Cependant, le test ANOVA ne montre pas de différence statistiquement significative entre les conditions ($p = 0,70 > 0,05$). Cette absence de significativité s’explique par la présence de deux puits, l’un pour le traitement de 60 s et l’autre pour celui de 90 s avec MeJA, dont les mesures sont significativement supérieures aux autres (figure C.2). Lorsque ces deux puits sont retirés de l’analyse, cette tendance disparaît, comme présenté à la figure 4.5.

Cette mesure présente certaines limites, principalement liées à l’utilisation d’un dispositif

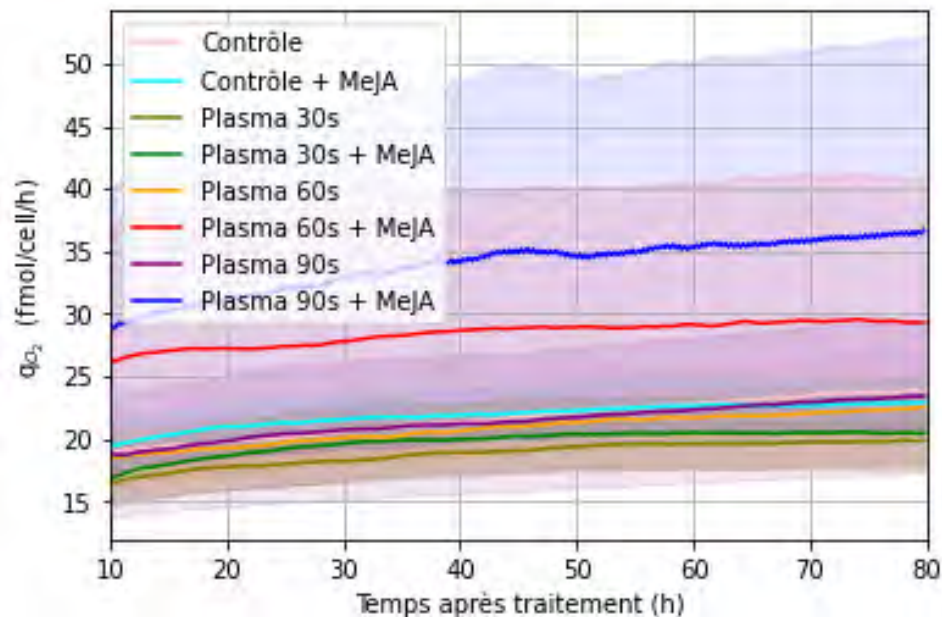


FIGURE 4.4 Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement, des cellules après traitement par plasma froid d'argon (30, 60 et 90 s), en présence ou en absence de MeJA. Les courbes représentent la moyenne des puits pour chaque condition sur toutes les sous-cultures, l'écart-type étant indiqué en transparence. Les cellules contrôle sont incluses pour comparaison.

conçu pour évaluer le taux de consommation d'oxygène des cellules adhérentes. Les expériences ont donc dû être réalisées sur un nombre très restreint de cellules, amplifiant l'influence de chaque lecture de concentration sur les résultats finaux. Par ailleurs, cette méthode de lecture de concentration est adaptée uniquement aux lignées cellulaires stables [52], une condition qui pourrait être compromise par le traitement au plasma froid, rendant l'interprétation des mesures plus délicate.

Cette limitation pourrait expliquer que les valeurs de q_{O_2} obtenues soient plus faibles que celles rapportées dans la littérature, dont la limite inférieure est de 0,2 mmol/gdw/h [59]. Les cellules traitées pèsent environ $2,8 \times 10^{-10}$ gdw/cell, selon une estimation basée sur des mesures de concentration sur des échantillons de masse sèche connue. Ainsi, des q_{O_2} compris entre 15 et 40 fmol cell⁻¹ h⁻¹ correspondent à 0,05 à 0,14 mmol/gdw/h.

Deux biais principaux peuvent expliquer ces faibles valeurs. Premièrement, le dispositif Resipher n'est pas adapté à une couche cellulaire épaisse et ne fournit qu'une consommation surfacique. Si la couche cellulaire est trop épaisse, le flux d'oxygène n'est plus uniforme, faussant ainsi la mesure.

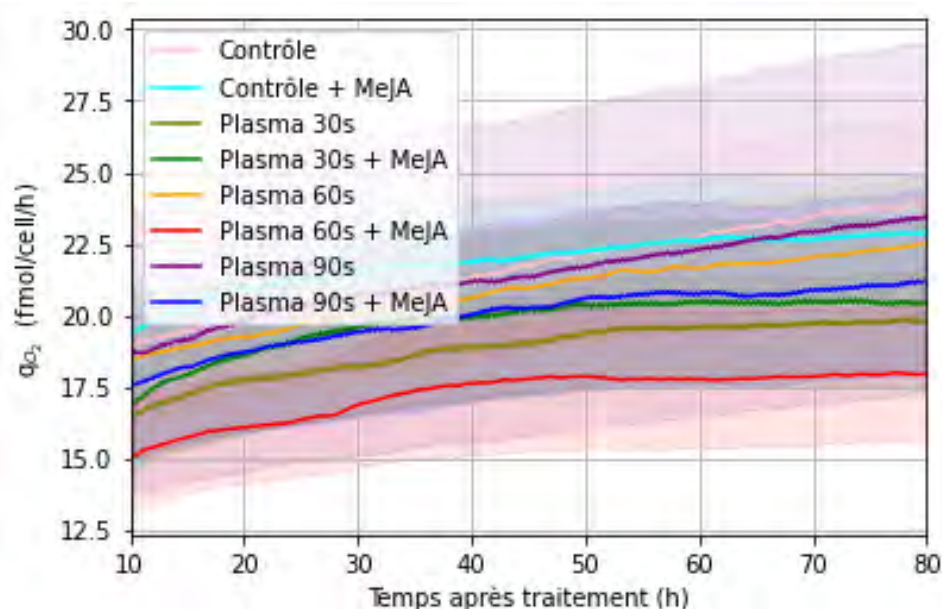


FIGURE 4.5 Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement, des cellules après traitement par plasma froid d'argon (30, 60 et 90 s), en présence ou en absence de MeJA, sans les deux puits présentant des mesures aberrantes (un pour 60 s et MeJA et un pour 90 s et MeJA). Les courbes représentent la moyenne des puits pour chaque condition sur toutes les sous-cultures, l'écart-type étant indiqué en transparence. Les cellules contrôle sont incluses pour comparaison.

De plus, le dispositif repose sur la mesure du gradient d'oxygène dans les puits, empêchant l'agitation de la plaque, ce qui peut affecter la viabilité cellulaire. Cela se traduit par une légère diminution du taux de consommation d'oxygène après 4 à 5 jours. Ainsi, la concentration cellulaire dans les puits peut être sous-estimée en raison de la mort cellulaire liée au manque d'agitation. Le milieu de culture étant retiré avant la lecture de concentration, tout ADN solubilisé provenant de la lyse cellulaire a également été éliminé [52]. De ce fait, seule la concentration en cellules vivantes en fin de culture a été évaluée.

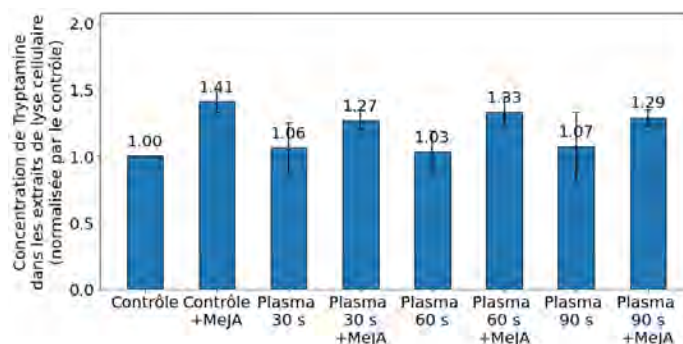
Dans le cadre de ce projet, la mesure de q_{O_2} suggère que les traitements par plasma froid seul ou par MeJA seul n'ont pas d'impact sur le taux de consommation spécifique d'oxygène, mais un impact apparaît lorsque ces deux traitements sont couplés. Cependant, en raison des biais méthodologiques identifiés et de la variabilité des réponses cellulaires, cette observation doit être interprétée avec prudence. L'augmentation du q_{O_2} pourrait indiquer une augmentation de l'activité métabolique et potentiellement une production d'alcaloïdes. Ainsi, ces résultats suggèrent que la combinaison d'un traitement au plasma froid et au MeJA induit un effet métabolique plus marqué que chacun de ces traitements pris individuellement.

4.3 Effet du plasma froid sur la production d'alcaloïdes détectés par UPLC-MS/MS

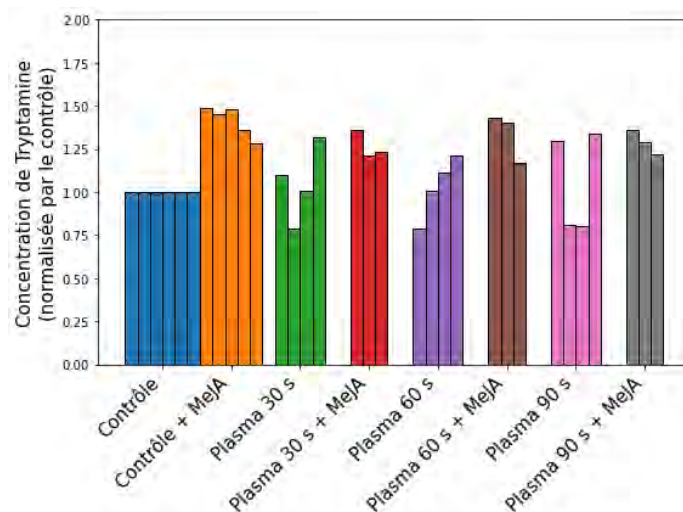
Les analyses par UPLC-MS/MS ont été effectuées sur l'ensemble des échantillons : ceux des séries en triplicat (30, 60 et 90 s, avec ou sans MeJA) ainsi que ceux destinés au test de cytotoxicité (30, 60 et 90 s, sans MeJA). Les concentrations de VBL, de TRM et de TAB ont été mesurées après extraction par billes XAD-7 ou lyse cellulaire. Aucun composé n'a été détecté dans les échantillons issus des billes XAD-7, et seule la TRM a été détectée après lyse cellulaire. Les concentrations de TRM, normalisées par le contrôle, sont présentées à la figure 4.6. Les moyennes et écarts-types calculés à partir des réplicats des différentes sous-cultures traitées sont représentés, ainsi que les valeurs individuelles. Les conditions incluaient 6 réplicats pour les contrôles, 4 pour les traitements par plasma seul et 3 pour les traitements combinés plasma et MeJA. Le détail des moyennes et écarts-types pour chaque échantillon (dont la concentration a été mesurée en duplicata) est présenté en annexe D et au tableau D.1.

Les concentrations de TRM mesurées se situent entre $0,08 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$ et $0,19 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$ (tableau D.1), ce qui est en accord avec la littérature. En effet, les concentrations courantes rapportées pour des cellules élicitées se situent entre $0,5 \mu\text{mol}/\text{mg}_{\text{dw}}$ et $5 \mu\text{mol}/\text{mg}_{\text{dw}}$, soit $0,08 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$ à $0,8 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$ (avec $M_{\text{tryptamine}} = 160 \mu\text{g} \mu\text{mol}^{-1}$) [60].

Ces résultats suggèrent que la TRM était principalement intracellulaire, et que l'extraction par lyse cellulaire a permis d'en récupérer la majorité. Les traces de TRM présentes dans les échantillons issus des extractions par billes XAD-7 étaient insuffisantes pour une mesure par UPLC-MS/MS. Cela peut s'expliquer pour deux raisons. Premièrement, la TRM est principalement restée intracellulaire, ce qui s'explique par son rôle de précurseur : comme elle n'intervient pas directement dans la défense de la plante, il n'y a pas de raison physiologique pour qu'elle soit sécrétée hors des cellules. Deuxièmement, les billes XAD-7 l'ont mal adsorbée en raison d'une affinité plus faible que pour les autres alcaloïdes [53].



(a)



(b)

FIGURE 4.6 Concentration de tryptamine normalisée par rapport aux cellules contrôle pour les cellules non traitées et celles exposées au plasma froid d'argon pendant 30, 60 et 90 s, en présence ou absence de MeJA. Les concentrations des cellules contrôle (avec et sans MeJA) proviennent de cinq expériences indépendantes, tandis que celles des cellules traitées proviennent de trois expériences indépendantes. Les moyennes et écarts-types sont représentés en (a), et les valeurs individuelles de chaque expérience sont tracées en (b).

La VBL et la TAB n'ont pas pu être quantifiées. Cela peut s'expliquer par des concentrations trop faibles. Cela pourrait être causé par la méthode d'extraction utilisée et les quantités de cellules traitées. En effet, seule 12 mL de culture ont été traitées par condition. De plus, la méthode d'extraction nécessitait un temps d'évaporation du solvant dans lequel les échantillons étaient dissous relativement long (6 à 12 h). Il n'est donc pas possible de déterminer quels traitements conduisent à la production la plus élevée d'alcaloïdes anticancéreux. En effet, chaque éliciteur influence différemment les différents alcaloïdes. Ainsi, une augmentation de la production de précurseur ne signifie pas nécessairement une augmentation de la

production de VBL [9]. Cependant, plusieurs observations sur les résultats obtenus pour la TRM peuvent être faites.

Premièrement, l'ajout de MeJA a systématiquement permis d'augmenter significativement la production de TRM (pour les cellules contrôle et pour tous les temps de plasma testés). Le plasma, pour tous les temps de traitement, a entraîné une légère augmentation de la quantité de TRM synthétisée. L'augmentation de la production est maximale pour les cellules contrôle avec MeJA. Ces résultats suggèrent que le MeJA stimule la production de précurseur, tandis que le plasma favorise l'utilisation de la TRM dans la suite de la voie de biosynthèse menant à la production de VBL.

Deuxièmement, on peut remarquer que les écarts-types les plus grands dans la production de TRM sont systématiquement observés pour les traitements par plasma froid seul. En effet, les erreurs sur les mesures sont respectivement de 18, 15 et 24 % pour les cellules traitées par plasma froid 30, 60 et 90 s, alors qu'elles ne dépassent pas 9 % pour les autres traitements. Cela suggère une inhomogénéité dans les traitements par plasma froid, probablement liée à des variations biologiques entre sous-cultures ou à une sensibilité variable des cellules au plasma. Cette inhomogénéité est lissée par l'ajout de MeJA pour la tryptamine, mais pourrait rester visible pour d'autres alcaloïdes. Cette inhomogénéité renforce l'idée que les variabilité de q_{O_2} observées ne sont pas uniquement dues à des biais de mesure, mais bien au traitement appliqué.

Ainsi, bien que VBL et la TAB n'aient pas été quantifiées, l'analyse de la TRM permet d'identifier les conditions qui modulent le précurseur et de formuler des hypothèses sur la production d'alcaloïdes anticancéreux.

4.4 Effet du plasma froid sur l'activité cytotoxique des alcaloïdes produits

Trois temps de plasma (30, 60 et 90 s) ont été appliqués sur les cellules d'une même sous-culture, afin d'évaluer l'activité cytotoxique des métabolites secondaires produits. Six jours après traitement, les métabolites ont été extraits par billes XAD-7 ou par lyse cellulaire (section 3.4) et testés sur des cellules ARPE-19 (sous-section 3.6.2).

La courbe d'étalonnage a été réalisée à partir de VBL standard. Les résultats obtenus après 24 h d'exposition pour les extraits issus des billes XAD-7 sont présentés à la figure 4.7a. La zone linéaire du test s'arrête à une concentration de $1,6 \times 10^{-2} \mu\text{g mL}^{-1}$. Les extraits provenant des cellules traitées durant 30 et 60 s dépassent légèrement cette limite, avec une concentration maximale mesurée à $2,6 \times 10^{-2} \mu\text{g mL}^{-1}$ pour le traitement de 30 s. Aucun effet cytotoxique n'a été observé pour l'extrait issu des cellules contrôle, contrairement aux

trois échantillons traités par plasma froid. L'effet cytotoxique le plus marqué correspond au traitement de 30 s, et le moins marqué à celui de 90 s.

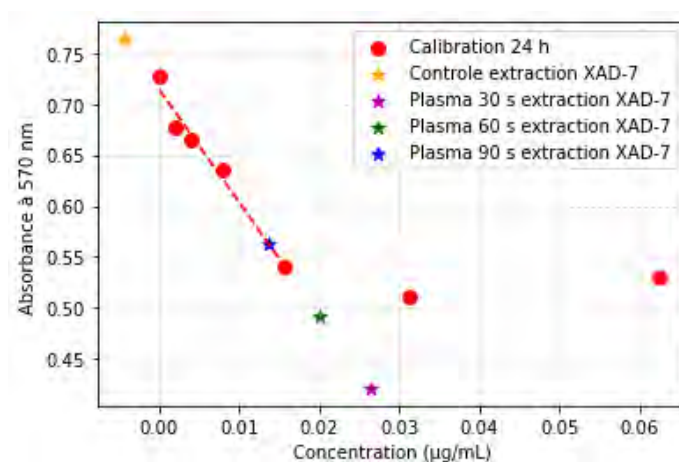
La même analyse a été réalisée avec un temps d'exposition réduit à 12 h. Les résultats sont présentés à la figure 4.7b. La tendance observée après 24 h s'en trouve confirmée : les extraits des cellules contrôle n'induisent pas de cytotoxicité observable, tandis que ceux issus des cellules traitées par plasma froid en présentent tous, avec un maximum pour 30 s et un minimum pour 90 s. Toutefois, l'intensité de l'effet est inférieure à celle observée à 24 h, en particulier pour les traitements de 60 et 90 s, où l'écart entre chaque traitement apparaît moins marqué.

Enfin, l'expérience a été renouvelée avec un temps d'exposition de 48 h, et les résultats sont présentés à la figure 4.7c. Là encore, aucun effet cytotoxique significatif n'est observé pour les extraits des cellules contrôle, contrairement aux extraits issus des cellules traitées par plasma froid. L'intensité de l'effet cytotoxique est plus marqué que celle observée à 24 h. On observe également que les effets cytotoxiques mesurés pour chaque temps de traitement sont plus proches les uns des autres. De plus, si l'effet cytotoxique minimal est toujours obtenu pour 90 s, l'effet maximal est cette fois observé pour 60 s, et non 30 s comme pour les temps d'exposition de 12 et 24 h.

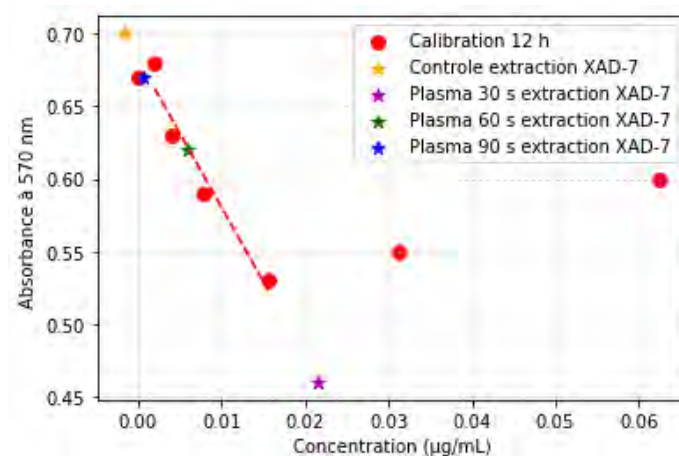
Un quatrième test de cytotoxicité a été réalisé avec les extraits issus de la lyse cellulaire. Les résultats obtenus après 48 h d'exposition sont présentés à la figure 4.8. Malgré ce temps prolongé, aucun extrait n'a induit de cytotoxicité marquée. Il n'est donc pas possible de dégager de tendance, les valeurs restant en dessous du seuil de linéarité du test. Une exposition de 72 h ou une diminution des concentrations utilisées dans la courbe de calibration n'ont pas permis d'obtenir une relation linéaire.

Tout d'abord, il est important de noter que ce test a comparé des extraits non purifiés avec une courbe de calibration composée uniquement de standards de VBL. D'autres alcaloïdes produits par *C. roseus*, tels que la VCR, la catharantine ou la tabersonine, présentent également des effets cytotoxiques. De plus, ces composés peuvent agir en synergie, ce qui accroît la cytotoxicité globale [13].

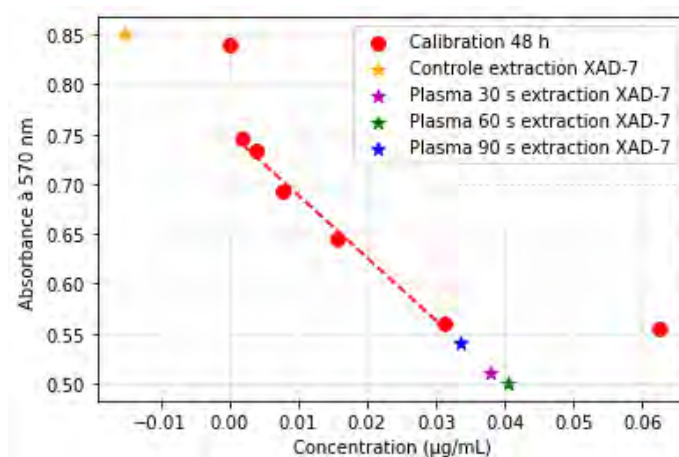
Cet effet synergique est confirmé par les mesures UPLC-MS/MS. Les échantillons utilisés pour les tests de cytotoxicité ont été dilués 100 fois dans le milieu de culture (section 3.4). Ainsi, une concentration d'environ $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ de VBL, mesurée lors du test de cytotoxicité, correspondrait à $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ dans l'échantillon analysé par UPLC-MS/MS, dilué à 50 % dans l'eau. Cependant, de telles concentrations auraient été détectables par UPLC-MS/MS, dont la limite de détection est inférieure à $0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$, dernière concentration utilisée dans la courbe de calibration. Or, pour nos échantillons, la VBL n'est pas détectée.



(a)



(b)



(c)

FIGURE 4.7 Mesure de l'absorbance à 570 nm des cellules ARPE-19 après 24 h (a), après 12 h (b) et après 48 h de contact avec les extraits obtenus à partir des billes XAD-7 des cellules contrôle et des cellules traitées par plasma froid d'argon (30 s, 60 s et 90 s) lors du test MTT. La courbe d'étalonnage est tracée en pointillés.

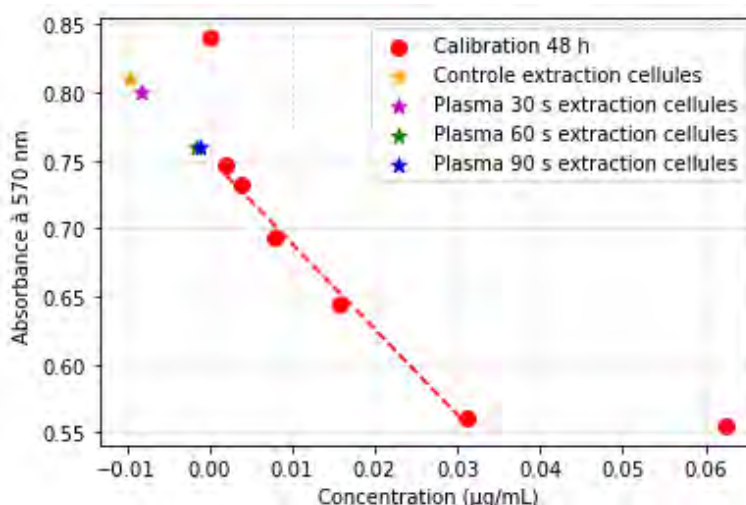


FIGURE 4.8 Mesure de l'absorbance à 570 nm des cellules ARPE-19 après 48 h de contact avec les extraits obtenus à partir de la lyse cellulaire des cellules contrôle et des cellules traitées par plasma froid d'argon (30 s, 60 s et 90 s) lors du test MTT. La courbe d'étalonnage est tracée en pointillés.

Ainsi, le test présenté ici ne permet pas de déterminer la concentration exacte des composés dans les échantillons, mais d'évaluer l'évolution relative de la cytotoxicité entre les extraits. Ce test vise à confirmer la production de composés cytotoxiques par les cellules et à comparer leurs niveaux entre traitements.

Les résultats montrent que les extraits issus des billes XAD-7 induisent un effet cytotoxique significatif sur les cellules ARPE-19. Cet effet est particulièrement marqué après un traitement de 30 s et tend à diminuer pour des temps d'exposition au plasma plus longs (60 s et 90 s). Ainsi, bien que tous les temps de traitement testés augmentent significativement la production d'alcaloïdes anticancéreux, l'intensité de cette augmentation dépend de la durée du traitement. Cette observation rejoint les résultats rapportés par Ghasempour et al. sur les graines de *C. roseus* [30]. L'absence d'effet cytotoxique pour les extraits issus des cellules contrôle confirme que l'activité observée provient du traitement par plasma froid d'argon, et non d'un artefact lié au protocole d'extraction ou au test de cytotoxicité. Ces résultats suggèrent que, si les mesures du taux de consommation spécifique d'oxygène peuvent révéler un état de stress élevé (lors des traitements combinés plasma et MeJA), elles ne reflètent pas fidèlement la production accrue d'alcaloïdes. En effet, aucun des traitements par plasma froid seul n'avait engendré d'augmentation du q_{O_2} (section 4.2).

La comparaison entre les trois durées d'exposition aux extraits (12, 24 et 48 h) révèle une cinétique d'action lente des métabolites anticancéreux, limitant l'amplitude de l'effet cytotoxique

mesuré et rendant difficile la conclusion sur les différences à long terme entre les extraits. Après 48 h, aucun plateau de cytotoxicité n'est atteint, ce qui ne peut pas s'expliquer par la cinétique de la VBL, sinon le même décalage apparaîtrait sur la courbe d'étalonnage. Cette observation pourrait résulter de la cinétique d'action d'autres composés anticancéreux présents, tels que la VCR, non incluse dans la courbe d'étalonnage, ou encore d'interactions entre les alcaloïdes présents dans les extraits, pouvant moduler l'effet cytotoxique observé. Les billes XAD-7 permettent en effet d'extraire l'ensemble des composés hydrophobes du milieu [53]. La cinétique observée pourrait également être liée au délai de mise en place de la mort cellulaire programmée. L'utilisation de lignées cancéreuses, en remplacement des ARPE-19 pour le test de cytotoxicité, permettrait de réduire le biais lié à la cinétique lente observée et d'améliorer la résolution du test, du fait de leur prolifération rapide et de leur sensibilité accrue aux agents anticancéreux. Malgré ces limites, une tendance nette apparaît, suggérant que le traitement par plasma froid de 90 s est le moins performant pour stimuler la production de métabolites anticancéreux.

À l'inverse, les extraits issus de la lyse cellulaire n'ont montré aucun effet cytotoxique significatif, même après une exposition prolongée de 48 h. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette observation. Premièrement, les extraits de lyse, n'ayant subi aucune étape de purification, contiennent de nombreux composés susceptibles d'interférer avec la mesure de cytotoxicité. Deuxièmement, les alcaloïdes anticancéreux pourraient être principalement sécrétés dans le milieu. Cela peut être dû à l'effet combiné du plasma froid, pouvant fragiliser la paroi cellulaire, et à la présence des billes XAD-7 dans le milieu de culture tout au long de l'expérience, lesquelles favorisent la libération des alcaloïdes dans le milieu. Cependant, cette hypothèse ne peut pas expliquer à elle seule l'absence d'effet cytotoxique de ces extraits, car les métabolites secondaires sont majoritairement stockés à l'intérieur des cellules, dans la vacuole [33]. De plus, la littérature rapporte que, même si les billes XAD-7 favorisent la libération des métabolites dans le milieu, au moins la moitié des métabolites produits restent intracellulaires [53]. La quantification de la TRM obtenue par UPLC-MS/MS indique également que certains alcaloïdes produits restent majoritairement intracellulaires. En effet, les concentrations de TRM sont nettement plus élevées dans les échantillons issus de la lyse cellulaire (section 4.3).

Dans l'ensemble, ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle le plasma froid d'argon induit la production accrue de métabolites secondaires à activité cytotoxique chez *C. roseus*, dont les quantités dépendent des conditions de traitement.

De plus, l'effet cytotoxique mesuré équivaut à celui de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ à $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ de VBL standard après 48 h. Un niveau de cytotoxicité aussi marqué ne pourrait s'expliquer par le

seul effet, même synergique, de la catharantine, de la tabersonine, de l'ajmalicine et de la lochnericine, dont les cytotoxicités sont beaucoup moins élevées que celles de la VBL et de la VCR [13]. De plus, la tabersonine n'était présente qu'en très faible quantité, non détectable par UPLC-MS/MS. Ainsi, ce test permet de mettre en évidence, de manière indirecte, l'augmentation de la production de VBL et/ou de VCR après le traitement par plasma froid, et ce pour tous les temps d'exposition.

Cependant, ces résultats ne permettent pas de quantifier précisément cette production, et les effets synergiques entre les composés peuvent influencer les observations. Pour rendre ce test plus robuste, la réalisation de réplicats, l'ajout d'une étape de purification en amont et l'utilisation de cellules cancéreuses pour réaliser le test apparaissent nécessaires.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet avait pour but de réaliser une première évaluation du potentiel du plasma froid comme éliciteur chez les cellules de *Catharanthus roseus*. Ce chapitre met en perspective les résultats obtenus. La capacité du plasma à induire un stress cellulaire contrôlé (section 5.1) et à stimuler une production accrue d’alcaloïdes anticancéreux (section 5.2) y est discutée. Enfin, son potentiel dans les stratégies d’élicitation combinées est abordé (section 5.3).

5.1 Le plasma froid, un éliciteur non cytotoxique mais capable d’induire un stress contrôlé

Une contribution majeure de ce travail est la démonstration que le plasma froid, même appliqué pendant des durées relativement longues (jusqu’à 150 s), ne compromet pas la viabilité cellulaire sur une période d’au moins sept jours. De plus, aucun des traitements de 30, 60 ou 90 s n’a ralenti la croissance cellulaire post-traitement, comme l’indiquent les mesures de consommation spécifique d’oxygène (q_{O_2}). Ces observations rejoignent des travaux récents montrant que les plasmas non thermiques génèrent un stress oxydatif modéré, principalement via la production de RONS, sans induire de cytotoxicité directe [25, 27]. Le maintien de la croissance après exposition suggère que le plasma froid peut être envisagé comme un outil d’élicitation à long terme. Certaines études rapportent même que des effets persistants peuvent être observés plusieurs mois après l’exposition [25].

Par ailleurs, nos résultats montrent que le plasma froid induit un stress métabolique modéré, imperceptible lorsqu’il est appliqué seul mais amplifié en présence d’une autre source de stress, telle que le MeJA. L’impact métabolique global est alors supérieur à celui généré par chacun des éliciteurs individuellement, ce qui laisse envisager un effet synergique.

Ces observations confirment que le plasma froid constitue un outil efficace pour générer un stress contrôlé, modulant l’activité métabolique et stimulant la production de métabolites secondaires défensifs, sans compromettre directement la viabilité.

5.2 Une production accrue d’alcaloïdes anticancéreux stimulée par le plasma froid

Les mesures de q_{O_2} apportent des indices sur l’impact du plasma et du MeJA sur l’activité métabolique. Bien que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs en raison de la variabilité, une tendance se dessine : le q_{O_2} semble rester stable après plasma ou MeJA

seuls, mais tend à augmenter lorsqu'ils sont combinés. Cette hypothèse est cohérente avec les fluctuations observées dans la production de TRM, précurseur essentiel de la voie de biosynthèse des alcaloïdes anticancéreux de *C. roseus*. Si cette stimulation est confirmée, elle pourrait refléter une production accrue de métabolites secondaires.

Cependant, la méthode utilisée pour mesurer le q_{O_2} présente plusieurs limites. Le dispositif, conçu initialement pour des cellules adhérentes et non agitées, a probablement affecté la précision des mesures.

De plus, le faible volume de culture par condition a limité la biomasse disponible pour les analyses métaboliques. Cette contrainte explique probablement pourquoi seuls certains précurseurs (TRM) ont pu être détectés par UPLC-MS/MS, alors que les alcaloïdes d'intérêt majeur (VBL et VCR) sont restés sous le seuil de détection. Des volumes plus importants et des techniques analytiques plus sensibles pourraient lever cette limite.

Pour contourner ce frein analytique, des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur des cellules humaines (ARPE-19). Les extraits de cellules traitées par plasma froid ont induit une cytotoxicité significative, contrairement aux extraits contrôles qui n'ont montré aucun effet. Bien que cette approche ne permette pas de quantifier précisément les alcaloïdes responsables, elle fournit une preuve indirecte que le traitement au plasma froid augmente la production de métabolites anticancéreux.

L'intensité de l'effet cytotoxique observé suggère que, parmi ces métabolites, la VCR et la VBL pourraient jouer un rôle majeur. Ces résultats indiquent donc une augmentation probable de leur production par les cellules de *C. roseus* après traitement au plasma froid.

Par ailleurs, l'effet cytotoxique des métabolites secondaires extraits variait selon la durée d'exposition des cellules de *C. roseus* au plasma, avec un maximum à 30 s et un minimum à 90 s, ce qui suggère l'existence d'un temps optimal d'éllicitation. Ce résultat rejoint des observations antérieures soulignant l'influence critique du temps d'exposition sur les modifications épigénétiques et la production de métabolites secondaires [24, 25, 27, 29, 30].

En résumé, même si la quantification directe de la VBL et de la VCR n'a pas été possible, les résultats obtenus lors du test de cytotoxicité suggèrent que le plasma froid stimule significativement leur production chez *C. roseus*. Ces observations ouvrent la voie à des investigations futures visant à optimiser les conditions d'éllicitation et à confirmer la production accrue des alcaloïdes par des techniques analytiques plus sensibles.

5.3 Le plasma froid comme outil clé dans les stratégies d'élicitation combinée

Les tests de cytotoxicité n'ont été réalisés que sur les extraits issus de cellules traitées par plasma froid seul, et les mesures par UPLC-MS/MS n'ayant pas permis de quantifier la VBL, l'impact d'une élicitation combinée, plasma froid et MeJA, sur la production d'alcaloïdes n'a donc pas pu être évalué directement.

Néanmoins, plusieurs indices suggèrent un effet synergique entre les deux éliciteurs. Leur combinaison a en effet entraîné des effets sur la viabilité et sur le q_{O_2} qui n'apparaissent pas lorsqu'ils sont appliqués séparément. L'ajout de MeJA a accentué l'effet du plasma, entraînant une légère baisse de viabilité interprétée comme la conséquence d'un stress combiné. Ce résultat est intéressant car la littérature rapporte fréquemment que les combinaisons d'éliciteurs sont plus efficaces pour stimuler la biosynthèse d'alcaloïdes [1, 2]. Le fait que la baisse de viabilité reste modérée (inférieure à 5 %) et que la croissance cellulaire ne soit pas affectée suggère que les cellules demeurent actives et potentiellement plus productrices de métabolites.

Au-delà de cette efficacité suggérée, l'avantage du plasma froid réside dans son mode d'action : il ne nécessite aucun ajout chimique direct. Bien que les RONS générés par le plasma froid puissent interagir avec certains métabolites et limiter l'efficacité de certaines méthodes de purification en raison de nouvelles interactions d'oxydo-réduction, les méthodes d'extraction usuelles basées sur la lyse cellulaire devraient être peu affectées, bien que cette hypothèse mérite d'être validée expérimentalement.

Ainsi, il apparaît comme un outil prometteur à combiner avec d'autres éliciteurs pour stimuler efficacement et durablement la production de métabolites secondaires.

CHAPITRE 6 CONCLUSION

6.1 Synthèse des travaux

L'objectif de ce mémoire était d'explorer le potentiel du plasma froid d'argon comme outil novateur d'élicitation des cellules en suspension de *Catharanthus roseus* pour la production de molécules à haute valeur ajoutée : la vinblastine et la vincristine.

Les travaux réalisés ont permis de démontrer la capacité du plasma froid à stimuler la production d'agents cytotoxiques, sans compromettre la viabilité ou la croissance cellulaire. Ainsi, le plasma froid apparaît comme un outil d'élicitation prometteur, compatible avec des cultures de longue durée.

Sur le plan métabolique, les résultats ont montré que le MeJA stimule la production de TRM, un précurseur de la VBL et de la VCR, alors que le plasma semble plutôt favoriser son utilisation vers les étapes suivantes de la voie de biosynthèse. Les travaux réalisés suggèrent un effet synergique de l'utilisation couplée du plasma froid d'argon et du MeJA, dont la combinaison permet d'induire un stress cellulaire supérieur à celui des deux traitements pris individuellement.

En résumé, ce travail a montré que le plasma froid d'argon constitue un éliciteur original et prometteur pour stimuler la production de métabolites secondaires chez les cellules de *C. roseus*. Bien qu'il n'ait pas été possible de quantifier directement les alcaloïdes anticancéreux, les résultats de cytotoxicité et l'analyse des précurseurs suggèrent une stimulation de la production de ces alcaloïdes. Ces résultats, bien que préliminaires, posent les bases d'une stratégie d'élicitation innovante qui pourrait, à terme, contribuer au développement de procédés plus durables et économiques pour la production d'alcaloïdes à haute valeur ajoutée. Il paraît particulièrement prometteur pour une application industrielle, car il permet une élicitation sans ajout de composé chimique, et donc sans alourdir le processus de purification.

6.2 Limitations

Plusieurs limites méthodologiques doivent cependant être soulignées. Tout d'abord, l'activité métabolique a été évaluée au travers du taux de consommation spécifique d'oxygène. Or, les mesures ont été réalisées avec un dispositif initialement conçu pour des cellules adhérentes, ce qui a pu introduire des biais. De plus, étant effectuées sur de très faibles quantités de cellules, il n'était pas possible de mesurer leur masse sèche comme cela se fait habituellement, et une

estimation de leur concentration a dû être réalisée. La lecture de la concentration des cellules végétales étant relativement difficile, les imprécisions de lecture ont également pu fausser certaines mesures.

Les analyses par UPLC-MS/MS, quant à elles, ont été restreintes par le faible volume de culture traité et par la sensibilité des méthodes, ce qui a limité la détection à la tryptamine et n'a pas permis de quantifier la vinblastine ou la tabersonine. Cela pourrait également être dû à la méthode d'extraction. En effet, après extraction, les échantillons ont été concentrés par évaporation du solvant, le méthanol acidifié. Or, cette évaporation a été réalisée à pression et température ambiantes, avec des temps d'évaporation relativement longs (6 à 12 h).

Enfin, les tests de cytotoxicité reposaient sur des extraits complexes, sans séparation des alcaloïdes individuels, ce qui empêche d'attribuer précisément les effets observés à une molécule donnée. De plus, ces essais ont été réalisés sur des cellules non cancéreuses, ce qui peut limiter l'interprétation des effets observés, d'autant plus qu'ils n'ont pas été réalisés en réplicat, limitant la robustesse statistique des conclusions.

6.3 Améliorations futures

Ces travaux ouvrent la voie à plusieurs axes d'amélioration, tant sur le plan expérimental que pour des applications à plus grande échelle.

Tout d'abord, une optimisation de la méthodologie serait nécessaire. Les volumes utilisés dans cette étude conduite en plaque multi-puits étaient très faibles. Cela a causé des variations dans les mesures et empêché la détection de la TAB et de la VBL par UPLC-MS/MS.

De plus, la faible quantité de cellules traitées a obligé l'utilisation d'un appareil non adapté aux cellules en suspension pour effectuer la mesure du taux de consommation spécifique d'oxygène. Cette mesure a été réalisée dans une plaque de 96 puits, avec un volume de cellules par puits important, dont la limite décantée a pu varier par rapport à la position basse de la sonde à oxygène dissous, ce qui a pu entraîner des variations dans les mesures entre les puits.

Il sera donc pertinent d'augmenter les volumes traités en milieu agité. Pour cela, les extraits obtenus sur différentes semaines pour le même traitement pourront être combinés. Des traitements en boîtes de Pétri sont également envisageables, avec des mouvements de la source de plasma afin que toutes les cellules soient traitées de manière homogène. Enfin, des traitements en bioréacteurs pourront être menés, en vérifiant que l'agitation des cellules sous une source de plasma fixe permet d'obtenir un traitement homogène.

L'ajout d'une étape de purification avant les tests de cytotoxicité améliorerait la précision

des résultats en isolant les alcaloïdes d'intérêt des autres composés présents dans les extraits. De plus, ces tests devront être réalisés de manière plus systématique afin d'assurer la fonctionnalité biologique des alcaloïdes produits lors des traitements par plasma froid et avec ajout de MeJA. La réalisation de ces tests sur des lignées cellulaires cancéreuses permettra également d'obtenir des résultats plus marqués et plus faciles à interpréter.

L'optimisation des conditions de traitement constitue également une piste importante. Dans cette étude, le plasma a été généré par de l'argon pur. L'utilisation d'autres types de gaz ou de mélanges de gaz permettrait d'introduire différents types de RONS et d'optimiser la réponse obtenue en ciblant plus spécifiquement les mécanismes de production d'alcaloïdes chez *C. roseus*. L'ajout d'un faible pourcentage d'oxygène ou d'azote dans l'argon permettrait d'augmenter et de contrôler la quantité de RONS produite. Enfin, cette étude suggère une forte efficacité des stratégies d'élicitation couplées. Ainsi, une étude combinant différentes méthodes d'éliciteurs pourrait améliorer encore les résultats obtenus.

À plus long terme, l'analyse des modifications épigénétiques engendrées par le traitement par plasma froid permettrait une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et contribuerait à l'optimisation de cette approche.

D'un point de vue industriel, plusieurs défis majeurs restent à relever pour une application du plasma froid : l'optimisation de la méthode à de grands volumes, le contrôle précis des paramètres de culture (pH, température, agitation), l'application du traitement de manière stérile, ainsi que l'homogénéité et la reproductibilité du traitement. Surmonter ces défis permettrait de garantir une production régulière et de qualité des alcaloïdes, facilitant leur extraction et purification à grande échelle.

RÉFÉRENCES

- [1] M. Ochoa-Villarreal *et al.*, “Plant cell culture strategies for the production of natural products,” *BMB Rep*, vol. 49, n°. 3, p. 149–158, mars 2016. [En ligne]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4915229/>
- [2] R. Vijayakumar et S. S. S. Raja, *Secondary Metabolites : Sources and Applications*. BoD – Books on Demand, sept. 2018, google-Books-ID : xS6RDwAAQBAJ.
- [3] M. Thakur *et al.*, “Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation,” *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, vol. 12, p. 1–12, mars 2019. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786118303577>
- [4] K. Jalota *et al.*, “Eco-friendly approaches to phytochemical production : elicitation and beyond,” *Nat. Prod. Bioprospect.*, vol. 14, n°. 1, p. 5, janv. 2024. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s13659-023-00419-7>
- [5] J. Zhu *et al.*, “Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*,” *Pharmacogn Rev*, vol. 9, n°. 17, p. 24–28, 2015. [En ligne]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4441158/>
- [6] S. Acharjee, R. Kumar et N. Kumar, “Role of plant biotechnology in enhancement of alkaloid production from cell culture system of *Catharanthus roseus* : A medicinal plant with potent anti-tumor properties,” *Industrial Crops and Products*, vol. 176, p. 114298, févr. 2022. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669021010633>
- [7] A. Das *et al.*, “Biotechnological advancements in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 104, n°. 11, p. 4811–4835, juin 2020. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10592-1>
- [8] K. C. Mendonce *et al.*, “Pharmacological potential of bioactive compounds in *Catharanthus roseus* extract : A comprehensive review,” *Toxicology Reports*, vol. 14, p. 101998, juin 2025. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750025001167>
- [9] S. Goswami *et al.*, “Pharmacological significance of *Catharanthus roseus* in cancer management : A review,” *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, vol. 11, p. 100444, juin 2024. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667142524000873>

- [10] T. Murashige et F. Skoog, “A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures,” *Physiologia Plantarum*, vol. 15, n°. 3, p. 473–497, 1962, _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. [En ligne]. Disponible : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [11] M. Guo *et al.*, “Strategies on biosynthesis and production of bioactive compounds in medicinal plants,” *Chinese Herbal Medicines*, vol. 16, n°. 1, p. 13–26, janv. 2024. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674638423000734>
- [12] Organisation mondiale de la Santé, “Cancer : une charge toujours plus lourde dans le monde et des besoins en services croissants,” févr. 2024. [En ligne]. Disponible : <https://www.who.int/fr/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
- [13] S. Kumar, B. Singh et R. Singh, “*Catharanthus roseus* (L.) G. Don : A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 284, p. 114647, févr. 2022. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887412100876X>
- [14] P. Sharma *et al.*, “A review on phytochemical constituents and pharmacological properties of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don,” *Journal of Medicinal Plants Studies*, vol. 12, n°. 3, p. 131–156, mai 2024, publisher : AkiNik Publications. [En ligne]. Disponible : <http://dx.doi.org/10.22271/plants.2024.v12.i3b.1675>
- [15] D. Suddhasuchi et S. A., “Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) : Diverse medicinal and therapeutic benefits to humankind,” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 6, n°. 5, p. 1695–1701, 2017.
- [16] U. T. Nisat *et al.*, “Phytochemical, Ethnopharmacological, and Medicinal Importance of *Catharanthus roseus* (Apocyanaceae) : A Mini-review,” vol. 7, n°. 2, p. 87–101, 2024.
- [17] J. Zhang *et al.*, “A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine,” *Nature*, vol. 609, n°. 7926, p. 341–347, sept. 2022, publisher : Nature Publishing Group. [En ligne]. Disponible : <https://www.nature.com/articles/s41586-022-05157-3>
- [18] “Base de Données Publique des Médicaments,” août 2025. [En ligne]. Disponible : <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/>
- [19] S. B. Christensen, “Natural Products That Changed Society,” *Biomedicines*, vol. 9, n°. 5, p. 472, avr. 2021. [En ligne]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8146924/>

- [20] H. Ishikawa *et al.*, “Total Synthesis of Vinblastine, Vincristine, Related Natural Products, and Key Structural Analogues,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, n^o. 13, p. 4904–4916, avr. 2009, publisher : American Chemical Society. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1021/ja809842b>
- [21] G. Srivastava *et al.*, “Exploring the potential of two *Pseudomonas* species to produce vincristine from vinblastine via biotransformation,” *Sci Rep*, vol. 14, n^o. 1, p. 19652, août 2024, publisher : Nature Publishing Group. [En ligne]. Disponible : <https://www.nature.com/articles/s41598-024-70571-8>
- [22] R. A. Priatama *et al.*, “Current Advancements in the Molecular Mechanism of Plasma Treatment for Seed Germination and Plant Growth,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n^o. 9, p. 4609, janv. 2022, number : 9 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [En ligne]. Disponible : <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/4609>
- [23] J. Moszczyńska, K. Roszek et M. Wiśniewski, “Non-Thermal Plasma Application in Medicine—Focus on Reactive Species Involvement,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, n^o. 16, p. 12667, janv. 2023, number : 16 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [En ligne]. Disponible : <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/16/12667>
- [24] F. Darigh *et al.*, “Non-thermal plasma improved callogenesis performance and elicited the production of cannabinoids by modifying DNA methylome, expression of WRKY1 and ERF1B transcription factors, and expression of genes that contributed to the biosynthesis of cannabinoids,” *Protoplasma*, vol. 260, n^o. 1, p. 159–170, janv. 2023. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01769-8>
- [25] S. Jevremović *et al.*, “Cold Plasma Treatment Alters the Morphology, Oxidative Stress Response and Specialized Metabolite Content in Yellow Iris (*I. reichenbachii*) Callus,” *Horticulturae*, vol. 11, n^o. 7, p. 781, juill. 2025, number : 7 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [En ligne]. Disponible : <https://www.mdpi.com/2311-7524/11/7/781>
- [26] S. Živković *et al.*, “Long term effects in dwarf bearded iris (*Iris reichenbachii* Heuff.) calli metabolism induced by plasma treatment,” *Book of Abstracts : 9th Central European Symposium on Plasma Chemistry (CESPC-9) joint with COST Action CA19110 Plasma Applications for Smart and Sustainable Agriculture (PlAgri); 2022 Sep 4-9; Vysoké Tatry, Slovakia*, p. 137, 2022, accepted : 2022-12-25T15 :16 :28Z ISBN : 9788081471155 Publisher : Bratislava : FMFI UK. [En ligne]. Disponible : <https://radar.ibiss.bg.ac.rs/handle/123456789/5268>

- [27] Z. Tardast *et al.*, “Corona discharge plasma stimulated production of atropine in callus of *Datura innoxia* by DNA hypomethylation and gene regulation : a novel technology for plant cell and tissue culture,” *Protoplasma*, vol. 260, n^o. 6, p. 1515–1525, nov. 2023. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s00709-023-01863-5>
- [28] Z. Noormohammadi *et al.*, “Induced genetic and morphological changes in *Catharanthus roseus* L. by cold atmospheric plasma,” vol. 6, n^o. 3, p. 302–310, janv. 2019, publisher : NOVA BIOLOGICA REPERTA. [En ligne]. Disponible : <https://www.sid.ir/paper/250445/fa>
- [29] M. Mohammadzadeh-Shahir *et al.*, “The potential use of methyl jasmonate, putrescine and cold atmospheric plasma on genetic variability and seedling growth improvement in medicinal plant *Catharanthus roseus* L. cultivar,” *Industrial Crops and Products*, vol. 140, p. 111601, nov. 2019. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669019306119>
- [30] M. Ghasempour *et al.*, “Seed priming with cold plasma improved seedling performance, secondary metabolism, and expression of deacetylindoline O-acetyltransferase gene in *Catharanthus roseus*,” *Contributions to Plasma Physics*, vol. 60, n^o. 4, p. e201900159, 2020, _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ctpp.201900159>. [En ligne]. Disponible : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ctpp.201900159>
- [31] M. Marzban *et al.*, “Induced genetic and chemical changes in medicinally important plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don : cold plasma and phytohormones,” *Mol Biol Rep*, vol. 49, n^o. 1, p. 31–38, janv. 2022. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06789-w>
- [32] M. Narayani et S. Srivastava, “Elicitation : a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production,” *Phytochem Rev*, vol. 16, n^o. 6, p. 1227–1252, déc. 2017. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>
- [33] I. Smetanska, “Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures,” dans *Food Biotechnology*, U. Stahl, U. E. Donalies et E. Nevoigt, édit. Berlin, Heidelberg : Springer, 2008, p. 187–228. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/10_2008_103
- [34] A. Banyal *et al.*, “Vinca alkaloids as a potential cancer therapeutics : recent update and future challenges,” *3 Biotech*, vol. 13, n^o. 6, p. 211, mai 2023. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03636-6>
- [35] “WHO Model Lists of Essential Medicines.” [En ligne]. Disponible : <https://www.who.int/groups/expert-committee-on-selection-and-use-of-essential-medicines/essential-medicines-lists>

- [36] A. Paul, K. Acharya et N. Chakraborty, “Biosynthesis, extraction, detection and pharmacological attributes of vinblastine and vincristine, two important chemotherapeutic alkaloids of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don : A review,” *South African Journal of Botany*, vol. 161, p. 365–376, oct. 2023. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629923004854>
- [37] R. Su *et al.*, “A Review on Bioreactor Technology Assisted Plant Suspension Culture,” *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, vol. 5, n°. 3, p. 1–13, 2019.
- [38] W. Kandoudi et É. Németh-Zámboiné, “Stimulating secondary compound accumulation by elicitation : Is it a realistic tool in medicinal plants in vivo?” *Phytochem Rev*, vol. 21, n°. 6, p. 2007–2025, déc. 2022. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09822-3>
- [39] R. Bhaskar *et al.*, “Biotic elicitors : a boon for the in-vitro production of plant secondary metabolites,” *Plant Cell Tiss Organ Cult*, vol. 149, n°. 1, p. 7–24, mai 2022. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02131-1>
- [40] Z. H. Siddiqui *et al.*, “In vitro Production of Secondary Metabolites Using Elicitor in *Catharanthus roseus* : A Case Study,” dans *Crop Improvement : New Approaches and Modern Techniques*, K. R. Hakeem, P. Ahmad et M. Ozturk, édit. Boston, MA : Springer US, 2013, p. 401–419. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1_14
- [41] T. V. Woedtke *et al.*, “Plasma Medicine : A Field of Applied Redox Biology,” *In Vivo*, vol. 33, n°. 4, p. 1011–1026, juill. 2019, publisher : International Institute of Anticancer Research Section : Reviews. [En ligne]. Disponible : <https://iv.iijournals.org/content/33/4/1011>
- [42] J. Karimi *et al.*, “Effect of cold plasma on plant physiological and biochemical processes : A review,” *Biologia*, vol. 79, n°. 12, p. 3475–3487, déc. 2024. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s11756-024-01794-3>
- [43] M. Jinno *et al.*, “Synergistic effect of electrical and chemical factors on endocytosis in micro-discharge plasma gene transfection,” *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 26, n°. 6, p. 065016, mai 2017, publisher : IOP Publishing. [En ligne]. Disponible : <https://dx.doi.org/10.1088/1361-6595/aa70de>
- [44] M. Leduc *et al.*, “Cell permeabilization using a non-thermal plasma,” *New J. Phys.*, vol. 11, n°. 11, p. 115021, nov. 2009. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115021>
- [45] R. Zhou *et al.*, “Effects of Atmospheric-Pressure N₂, He, Air, and O₂ Microplasmas on Mung Bean Seed Germination and Seedling Growth,” dans *Scientific Reports*, vol. 6,

- sept. 2016, p. 32603, publisher : Nature Publishing Group. [En ligne]. Disponible : <https://www.nature.com/articles/srep32603>
- [46] J.-S. Chang, P. Lawless et T. Yamamoto, “Corona discharge processes,” *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 19, n°. 6, p. 1152–1166, déc. 1991. [En ligne]. Disponible : <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/125038>
- [47] H. Wang *et al.*, “A comprehensive review of effects of electrolyzed water and plasma-activated water on growth, chemical compositions, microbiological safety and postharvest quality of sprouts,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 129, p. 449–462, nov. 2022. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224422004265>
- [48] J. Xi *et al.*, “Cold plasma pretreatment technology for enhancing the extraction of bioactive ingredients from plant materials : A review,” *Industrial Crops and Products*, vol. 209, p. 117963, mars 2024. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669023017284>
- [49] J.-B. Billeau *et al.*, “Coherent homodyne detection for amplified cross-beam electric-field induced second harmonic,” *Appl. Opt., AO*, vol. 63, n°. 19, p. 5203–5207, juill. 2024, publisher : Optica Publishing Group. [En ligne]. Disponible : <https://opg.optica.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-63-19-5203>
- [50] J. Letellier-Bao, “Establishing a Two-Regime Plasma Jet for Interdisciplinary Studies of Plasma Treatment of Chronic Wounds and Fibrosis,” Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal, août 2024. [En ligne]. Disponible : <https://publications.polymtl.ca/59160/>
- [51] C. W. Lee-Parsons, S. Ertürk et J. Tengtrakool, “Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation,” *Biotechnology Letters*, vol. 26, n°. 20, p. 1595–1599, oct. 2004. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000045825.37395.94>
- [52] L. Lamboursain et M. Jolicoeur, “Determination of cell concentration in a plant cell suspension using a fluorescence microplate reader,” *Plant Cell Rep*, vol. 23, n°. 10, p. 665–672, mars 2005. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0899-3>
- [53] P. L. Wong, A. J. Royce et C. W. T. Lee-Parsons, “Improved ajmalicine production and recovery from *Catharanthus roseus* suspensions with increased product removal rates,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 21, n°. 3, p. 253–258, nov. 2004. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X04002013>
- [54] S. Hisiger et M. Jolicoeur, “Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC,” *Phytochem Rev*, vol. 6, n°. 2, p. 207–234, juill. 2007. [En ligne]. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9036-y>

- [55] J. Berlin, C. Mollenschott et F. DiCosmo, “Comparison of Various Strategies Designed to Optimize Indole Alkaloid Accumulation of a Cell Suspension Culture of *Catharanthus roseus*,” *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 42, n°. 9-10, p. 1101–1108, oct. 1987, publisher : De Gruyter. [En ligne]. Disponible : <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/znc-1987-9-1017/html>
- [56] C. R. Oliveira *et al.*, “Human Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells as a Model for Drug Screening and Pre-Clinical Assays Compared to ARPE-19 Cell Line,” *Int J Stem Cells*, vol. 14, n°. 1, p. 74–84, déc. 2020, publisher : Korean Society for Stem Cell Research. [En ligne]. Disponible : <https://synapse.koreamed.org/articles/1159044>
- [57] “MTT cell proliferation assay Roche.” [En ligne]. Disponible : <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/product/roche/11465007001#product-documentation>
- [58] M. Zandi, “Cytotoxicity of Taxol in Combination with Vincristine and Vinblastine Against A375 Cell Line,” *Gene, Cell and Tissue*, Research Article 8, avr. 2021, iSSN : 2345-6841 Issue : 4 Journal Abbreviation : Gene Cell Tissue Publication Title : Gene, Cell and Tissue Volume : 8. [En ligne]. Disponible : <https://brieflands.com/articles/gct-114359#abstract>
- [59] J. Archambault, “Large-scale (20 l) culture of surface-immobilized *Catharanthus roseus* cells,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 13, n°. 11, p. 882–892, nov. 1991. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014102299190104I>
- [60] A. Contin *et al.*, “The inoculum size triggers tryptamine or secologanin biosynthesis in a *Catharanthus roseus* cell culture,” *Plant Science*, vol. 139, n°. 2, p. 205–211, déc. 1998. [En ligne]. Disponible : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945298001885>

ANNEXE A COMPOSITION DU MILIEU MS

TABLEAU A.1 Composition du milieu MS (en mg/L) [10]

Composé	Concentration (mg/L)
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,3
Acide nicotinique	0,5
Pyridoxine·HCl	0,5
Thiamine·HCl	0,1
Glycine	2
Myo-inositol	100

ANNEXE B SUIVI DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE APRÈS TRAITEMENT PAR PLASMA FROID D'ARGON

TABLEAU B.1 Moyennes (a) et écarts-types (b) de la viabilité cellulaire (en %) pour les cellules contrôle et les cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 60, 90, 120 et 150 s, correspondant aux données présentées à la figure 4.1.

(a)

Moyenne (%)					
Jours	Contrôle	60 s	90 s	120 s	150 s
0	90,4	90,4	90,4	90,4	90,4
1	90,3	89,0	90,9	88,3	88,6
3	89,3	91,1	90,2	90,6	88,8
7	90,3	86,1	90,4	92,0	88,5

(b)

Écart-type (%)					
Jours	Contrôle	60 s	90 s	120 s	150 s
0	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
1	3,1	3,2	1,5	3,3	1,9
3	3,0	1,3	4,9	1,9	4,2
7	2,2	3,2	1,0	1,6	0,5

TABLEAU B.2 Moyennes (a) et écarts-types (b) de la viabilité cellulaire (en %) pour les cellules contrôle et les cellules traitées par plasma froid d'argon (120 s), avec ou sans présence de billes XAD-7, correspondant aux données présentées à la figure 4.2.

(a)

Moyenne (%)				
Jours	Contrôle		25 mm, 120 s	
	Avec billes	Sans billes	Avec billes	Sans billes
0	92,1	92,1	92,1	92,1
3	94,8	94,0	94,1	91,2
7	93,0	90,0	92,8	90,0

(b)

Écart-type (%)				
Jours	Contrôle		25 mm, 120 s	
	Avec billes	Sans billes	Avec billes	Sans billes
0	2,6	2,6	2,6	2,6
3	0,0	0,1	0,7	1,8
7	1,3	0,9	0,5	0,2

TABLEAU B.3 Moyennes (a) et écarts-types (b) de la viabilité cellulaire (en %) pour les cellules contrôle et les cellules traitées par plasma froid d'argon 30, 60 et 90 s, avec ou sans MeJA, correspondant aux données présentées à la figure 4.3.

(a)

Moyenne (%)										
Jours	Sans MeJA					Avec MeJA				
Mesure	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Jours	Contrôle									
0	88,8	90,9	89,2	95,0	93,0	88,8	90,9	89,2	95,0	93,0
6	88,2	89,2	89,0	93,1	88,5	88,7	87,7	87,4	92,6	84,5
Jours	Plasma 30 s									
0	88,8	90,9	93,0	-	-	88,8	90,9	93,0	-	-
6	90,6	91,2	93,0	-	-	86,9	84,8	90,7	-	-
Jours	Plasma 60 s									
0	90,9	89,2	95,0	-	-	90,9	89,2	95,0	-	-
6	89,7	91,4	92,3	-	-	83,1	84,8	88,7	-	-
Jours	Plasma 90 s									
0	88,8	95,0	93,0	-	-	88,8	95,0	93,0	-	-
6	90,4	89,5	87,9	-	-	83,7	88,7	89,0	-	-

(b)

Écart-type (%)										
Jours	Sans MeJA					Avec MeJA				
Mesure	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Jours	Contrôle									
0	2,7	2,8	2,3	1,6	3,8	2,7	2,8	2,3	1,6	3,8
6	0,4	2,0	3,9	2,5	3,0	1,6	3,8	0,3	0,4	4,2
Jours	Plasma 30 s									
0	2,7	2,8	3,8	-	-	2,7	2,8	3,8	-	-
6	4,2	1,4	2,4	-	-	3,7	4,7	1,4	-	-
Jours	Plasma 60 s									
0	2,8	2,3	1,6	-	-	2,8	2,3	1,6	-	-
6	4,7	1,9	1,9	-	-	4,6	2,1	2,9	-	-
Jours	Plasma 90 s									
0	2,7	1,6	3,8	-	-	2,7	1,6	3,8	-	-
6	3,4	3,2	3,8	-	-	5,5	1,3	2,9	-	-

ANNEXE C ÉVOLUTION DE LA CONSOMMATION SPÉCIFIQUE D'OXYGÈNE (q_{O_2}) AU COURS DU TEMPS APRÈS TRAITEMENT

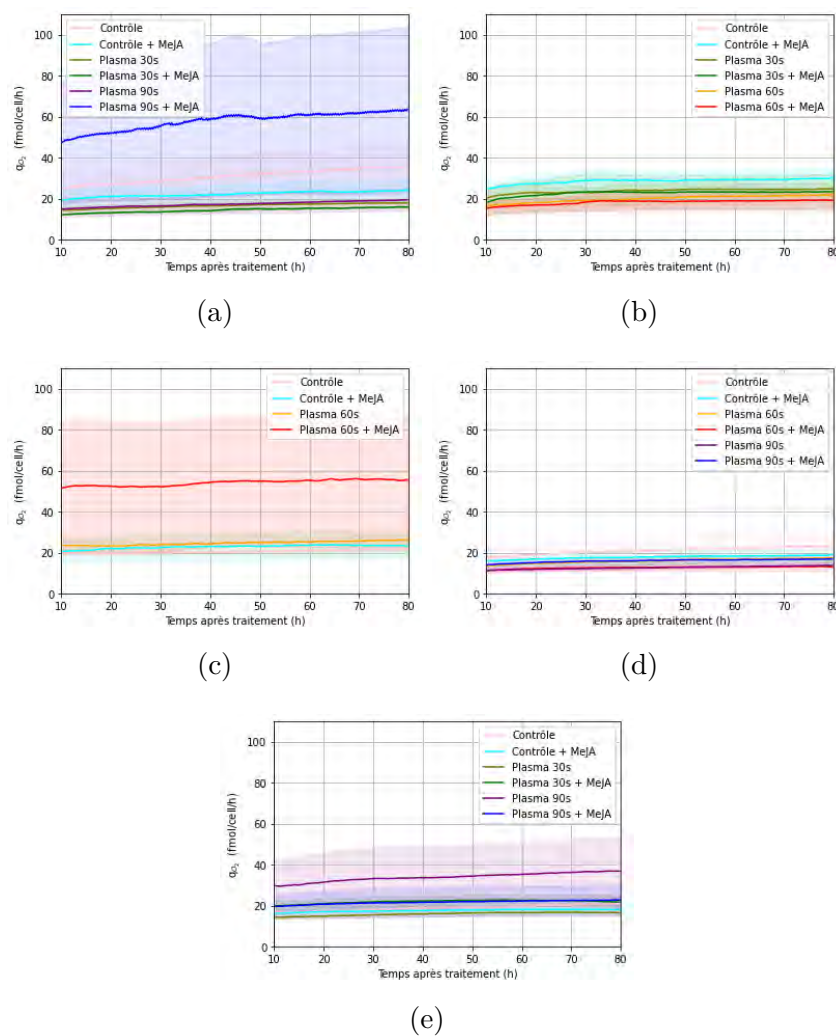


FIGURE C.1 Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement, en présence ou en absence de MeJA, pour les cellules contrôle et les cellules traitées par plasma froid d'argon pendant 30 s, 60 s et 90 s. Chaque mesure correspond à la moyenne des triplicats de mesure de consommation d'oxygène réalisé pour chaque condition, et l'écart-type est représenté en transparence. Les sous-figures (a) à (e) correspondent aux mesures réalisées sur différentes sous-cultures.

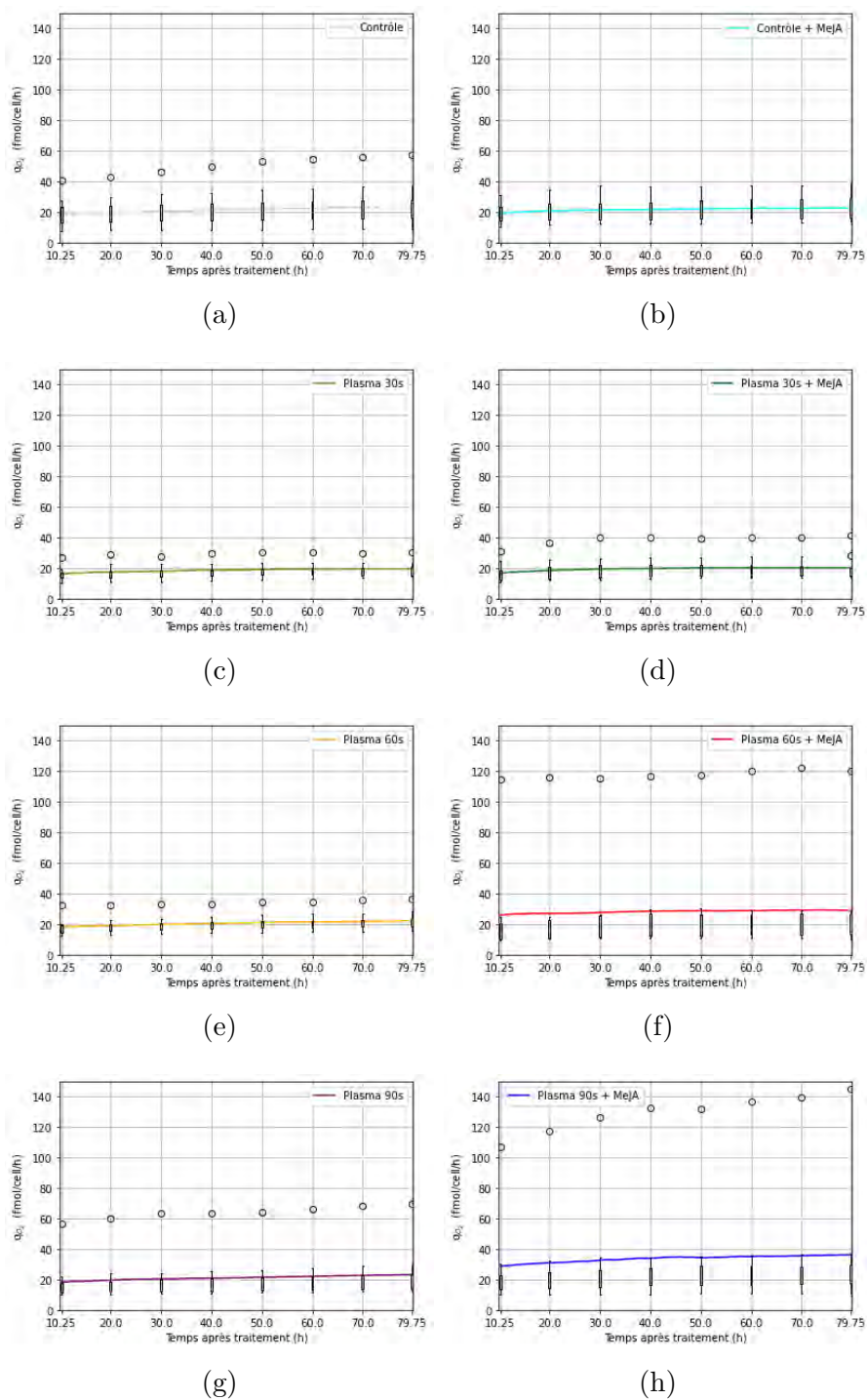


FIGURE C.2 Évolution de la consommation spécifique d'oxygène (q_{O_2}) au cours du temps après traitement, pour les cellules contrôle (sans MeJA (a) et avec MeJA (b)), les cellules traitées par plasma froid 30s (sans MeJA (c) et avec MeJA (d)), 60s (sans MeJA (e) et avec MeJA (f)) et 90s (sans MeJA (g) et avec MeJA (h)). Chaque courbe représente la moyenne des puits pour chaque condition sur toutes les sous-cultures. Les boîtes représentent la médiane, le premier et le troisième quartile. Les mesures situées en dehors de cette plage sont représentées par des ronds.

ANNEXE D CONCENTRATION EN TRYPTAMINE APRÈS TRAITEMENT DES EXTRAITS ISSUES DE LA LYSE CELLULAIRE

TABLEAU D.1 Moyennes (a) et écarts-types (b) des concentrations en tryptamine (en $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$) mesurées par UPLC dans les cellules contrôle et traitées par plasma froid pendant 30, 60 et 90 s, avec ou sans MeJA, correspondant à la figure 4.6.

(a)

Moyenne ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$)								
Mesure	Contrôle	Contrôle + MeJA	30 s	30 s + MeJA	60 s	60 s + MeJA	90 s	90 s + MeJA
1	0,256	0,382	0,283	0,349	—	—	0,334	0,347
2	0,102	0,148	0,081	0,123	0,080	0,146	—	—
3	0,087	0,128	—	—	0,088	0,122	—	—
4	0,207	0,281	—	—	0,230	0,242	0,168	0,267
5	0,223	0,285	0,225	0,275	—	—	0,179	0,271
6	0,032	—	0,043	—	0,039	—	0,043	—

(b)

Écart-type ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{dw}}$)								
Mesure	Contrôle	Contrôle + MeJA	30 s	30 s + MeJA	60 s	60 s + MeJA	90 s	90 s + MeJA
1	0,002	0,002	0,000	0,015	—	—	0,001	0,002
2	0,005	0,005	0,003	0,004	0,001	0,009	—	—
3	0,002	0,011	—	—	0,003	0,003	—	—
4	0,007	0,004	—	—	0,002	0,001	0,001	0,003
5	0,007	0,004	0,006	0,010	—	—	0,003	0,004
6	0,001	—	0,001	—	0,002	—	0,000	—