

**Titre:** Développement d'un bioréacteur à perfusion pour les cellules végétales en suspension  
Title:

**Auteur:** Caroline De Dobbeleer  
Author:

**Date:** 2004

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** De Dobbeleer, C. (2004). Développement d'un bioréacteur à perfusion pour les cellules végétales en suspension [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/7360/>  
Citation:

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

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/7360/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Mario Jolicoeur, & Robert Legros  
Advisors:

**Programme:** Unspecified  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN BIORÉACTEUR À PERFUSION POUR LES  
CELLULES VÉGÉTALES EN SUSPENSION

CAROLINE DE DOBBELEER

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)

DÉCEMBRE 2004



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-494-01302-8*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-494-01302-8*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉVELOPPEMENT D'UN BIORÉACTEUR À PERFUSION POUR LES  
CELLULES VÉGÉTALES EN SUSPENSION

présenté par: DE DOBBELEER Caroline

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

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

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. LEGROS Robert, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement le professeur Mario Jolicoeur, mon directeur de recherche pour m'avoir acceptée dans son équipe de laboratoire et encouragée tout au long de mon travail. Sans la proposition de ce projet de maîtrise, je n'aurais probablement pas eu l'occasion de faire la découverte du domaine si passionnant du vivant. Merci à mon codirecteur de recherche, le professeur Robert Legros, pour son appui et ses judicieux conseils.

Un merci spécial à Audrey Fazzi, pour toutes les analyses effectuées sur HPLC en tant qu'associée de recherche mais surtout amie. Je tiens à remercier Maya, Mathieu, Jingkui pour les discussions scientifiques enrichissantes et leurs aides précieuses. Merci aux collègues de bureau, pour les excellents moments passés ensemble. La tasse de café va me manquer.

Je voudrais également remercier les techniciens de l'École Polytechnique, et plus particulièrement Carol Painchaud sans qui la conception du bioréacteur n'aurait pas été possible. Merci également à Cédric Ginard, pour toute la fabrication des pièces

en verre. Merci à Chantal Bénard pour son efficacité et sa rapidité concernant mon dossier académique.

Aussi, je voudrais exprimer ma profonde gratitude au professeur Michel Perrier et au professeur Denis Dochain qui m'ont ouvert la porte du Québec et lancée dans cette grande aventure.

Je remercie également ma famille pour leurs conseils et leurs nombreux encouragements constants tout au long de mes études.

Un tout grand merci à Christophe pour son aide précieuse, son soutien moral et ses nuits blanches passées à Polytechnique en ma compagnie. Ensemble, nous avons réalisé notre rêve de vivre deux années au Québec.

## RÉSUMÉ

Un bioréacteur à perfusion permettant l'alimentation et l'extraction en continu de divers métabolites a été développé et validé pour les cellules de plantes. Un milieu de culture libre de cellules a ainsi été recirculé dans une colonne de résines afin d'adsorber les métabolites secondaires en continu. L'objectif était une mise à l'échelle en bioréacteur du système développé par Klvana *et al.* (2004) en flacons agités. Les cellules en suspension d'*Eschscholtzia californica* (le pavot de Californie) ont été utilisées à titre de système modèle pour la production d'alcaloïdes benzophénanthridines. Basé sur la sédimentation, le système développé était composé de quatre colonnes de séparation milieu/cellules montées à l'intérieur d'un bioréacteur de 3-L afin de séparer les cellules et les agrégats du milieu de culture tout en imposant un faible cisaillement aux cellules. Le milieu de culture a été recirculé par une boucle externe contenant trois colonnes de résines XAD-7, utilisées à tour de rôle.

L'étude a été divisée en deux grandes étapes. Premièrement, une étude hydrodynamique a été réalisée afin de concevoir des colonnes de sédimentation permettant une séparation stable entre les cellules et le milieu de culture. Les conditions opératoires comme le débit de recirculation, l'effet du bullage et de l'agitation sur la séparation milieu/cellules ont été étudiés. L'hydrodynamique des colonnes a également été étudiée dans un bioréacteur de 3-L. Deuxièmement, une culture en bioréacteur à perfusion a été

réalisée avec recirculation externe du milieu, par une colonne de résines XAD-7, pour extraire les métabolites secondaires en continu et ainsi valider le système. Cette méthode d'extraction a été comparée avec les méthodes classiques utilisées : un bioréacteur sans phase d'extraction et deux bioréacteurs contenant des résines en suspension dans le milieu.

L'étude hydrodynamique a démontré que la vitesse de pompage du milieu devait nécessairement égaler la vitesse de sédimentation des cellules afin de maintenir un front stable de séparation cellule /milieu au sein des colonnes de sédimentation. Par conséquent, la vitesse de sédimentation variant durant la culture, le débit de perfusion devait ainsi être variable avec le temps. La géométrie optimale des colonnes de décanation pour la configuration du bioréacteur a consisté en un cylindre de 41 mm de diamètre et de 165 mm de hauteur, pourvu d'une croix en entrée afin de réduire les perturbations engendrées par l'agitateur. Quatre colonnes de sédimentation ont été installées sur le couvercle du bioréacteur pour le pompage du milieu. L'agitation et la position du diffuseur de gaz ont été optimisées afin de maintenir un front de séparation stable, et éviter un cisaillement important des cellules, tout en maintenant une oxygénation suffisante aux cellules. Une agitation anti-horaire (pompage vers le bas) a ainsi été fixée à 40 rpm. La distance entre l'agitateur et la section d'entrée des colonnes de sédimentation était de 1 cm. Le bullage, fixé entre la surface du liquide et l'entrée des colonnes de séparation a assuré un coefficient de transfert global en oxygène ( $K_{La}$ ) de  $8.2 \text{ h}^{-1}$ .

Une culture en bioréacteur à perfusion a été réalisée afin de valider le système d'extraction en continu muni des colonnes de séparation. Les débris cellulaires présents dans le milieu de sortie des colonnes du bioréacteur ont été retenus par un module supplémentaire de séparation extérieur au bioréacteur, basé sur la décantation et la flottation. Un anti-mousse a été injecté en même temps que l'éliciteur dans la culture afin de minimiser la formation de mousse, favorisée par le bullage près de la surface. De plus, une trappe à mousse a été ajoutée au montage du bioréacteur pour récupérer les cellules entraînées avec la mousse et éviter tout colmatage du filtre des gaz de sortie. Le liquide a été recirculé par une boucle externe au bioréacteur à un taux variant de  $20.4 \text{ d}^{-1}$  jusqu'à un minimum de  $5 \text{ d}^{-1}$  en fin de culture. La séparation du système global a montré une efficacité totale au cours des 10 jours de culture, et ce même avec des densités cellulaires importantes de 50 % SCV (volume sédimenté des cellules).

Les taux de croissance avant et après élicitation étaient similaires et également comparables aux taux de croissance observés dans des cultures témoins élicitées, avec ou sans résines adsorbantes. Au niveau du glucose, nitrate et phosphate, les rendements ont été similaires quel que soit le type d'extraction utilisé. Par conséquent, la croissance et la nutrition cellulaires dans le bioréacteur avec recirculation ne semblent pas avoir été affectées par l'action des colonnes et du bullage de surface. L'influence d'une recirculation externe sur le métabolisme secondaire des cellules de plantes a été également étudiée. La concentration en alcaloïdes totaux à la fin de la culture à perfusion était de  $2.1 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$ , ce qui est une valeur du même ordre de grandeur que les concentra-

tions obtenues dans la littérature. Ce résultat a démontré qu'une mise à l'échelle des travaux réalisés par Klvana *et al.* (2004) donne des niveaux de production comparables. Cependant, les taux de production d'alcaloïdes obtenus avec le système de recirculation étaient inférieurs d'un ordre de grandeur aux taux de production obtenus avec des résines libres dans le milieu. En effet, en présence de résines en suspension, des concentrations en métabolites secondaires de  $28.4 \pm 8.8 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$  ont été mesurées. Plusieurs hypothèses ont été énoncées pour expliquer le faible niveau de production obtenu en mode perfusion. En effet, la conception des colonnes d'extraction a favorisé des temps de contact courts entre le milieu et les résines. De plus, l'obligation d'ajouter un anti-mousse aurait possiblement affecté la productivité cellulaire de même que la capacité d'adsorption des résines. La distribution des flux métaboliques au niveau des métabolites secondaires a varié en fonction des conditions d'opérations. Ainsi, la voie de biosynthèse de la chelilutine a été favorisée en mode perfusé par rapport à la voie de la macarpine avec des résines libres. Ce travail de maîtrise a donc permis de mettre à l'échelle une approche d'extraction de métabolites en continu, sans contact direct cellule/phase extractive, ce qui permet de simplifier significativement les phases de séparation et de purification des molécules produites. De plus, les taux de recirculation élevés du bioréacteur perfusé offrent une capacité d'extraction importante.

## ABSTRACT

A perfusion bioreactor allowing continuous feeding and extraction of various metabolites has been developed and validated for plant cell cultures. A cell free culture medium has been recirculated through an external resin extraction column to adsorb secondary metabolites. The objective was to adapt the flask system developed by Klvana *et al.* (2004) to bioreactor. Cell suspensions of *Eschscholtzia californica* (california poppy) have been used as model system for continuous production of benzophenanthridin alkaloids. Based on sedimentation, the system I developed was composed of four cell/medium separation columns mounted inside a 3-L bioreactor in order to separate cells and aggregates from the culture medium while imposing low shear stress on the cells. The culture medium was recirculated through an external circulation loop containing three XAD-7 resin columns, used one after the other. The columns were filled with for adsorption of alkaloids.

The study has been divided in two steps. Firstly, a hydrodynamical study has been performed in order to design sedimentation columns allowing efficient separation between the cells and the medium, the latter being recirculated. The operating conditions such as the recirculation flow rate, the effects of sparging and the agitation have been studied. The hydrodynamic of the columns has also been studied inside a 3-L bioreactor. Secondly, a cell culture in a perfusion bioreactor has been performed with ex-

ternal recirculation of the medium, through a XAD-7 resin column, in order to extract the secondary metabolites in a continuous fashion. This extraction method has been compared with the current classic culture methods that are one bioreactor working without resins and two bioreactors with resins in suspension in the medium.

The hydrodynamic studies showed that the pumping rate of the medium necessarily needs to be equal to the cell sedimentation rate in order to maintain a stable cell/medium separation front inside the sedimentation columns. Since, the sedimentation rate was observed to change during culture, the perfusion flow rate needed to be adjusted with time. The optimal sedimentation column geometry for the bioreactor configuration consisted in a cylinder of 41 mm of diameter and 165 mm of height, with a cross on the inlet section to reduce agitation-induced instabilities. A total of four sedimentation columns were installed on top of the bioreactor to pump medium. The agitation and the sparger position were optimized to get a stable separation front and avoid excessive shear stress on the cells, while maintaining sufficient oxygenation. The counterclockwise agitation (downward pumping) was set to 40 rpm. The distance between agitator and wet end of the columns was determined to be of 1 cm. The sparger was set between the surface and the inlet surface of the sedimentation columns to ensure a global oxygen transfer ( $K_La$ ) of  $8.2 \text{ h}^{-1}$ .

A perfused bioreactor culture has been performed in order to validate the continuous extraction system with separation columns. The cell debris found in the me-

dium have been retained by an additional external separation module based on sedimentation and floating. Anti-foam was injected at the same time as the elicitor in the culture in order to minimize foam formation, favored by sparging near the surface. A foam trap has also been added to the bioreactor to retain the cells taken away with the foam and to avoid any clogging of the output gas filter. The liquid was recirculated by an external loop with a rate varying from 20.4 d<sup>-1</sup> to 5 d<sup>-1</sup> at the end of the culture. The efficiency of the separation process was good during the 10 days of culture, even when reaching high cell densities of 50 % SCV (sedimented cell volume).

The growth rates were similar before and after elicitation and they were also close to those observed in elicited control cultures, in the presence or absence of resins. The yields for glucose, nitrate and phosphate were similar for all extraction methods. Consequently, cell growth and nutrition in the bioreactor do not seem affected by the action of the columns and the surface sparging. The influence of external recirculation on secondary metabolites production has also been studied. The total alkaloids concentration at end of the perfusion culture was of 2.1  $\mu\text{mole.gDW}^{-1}$ , which is consistent with previously published values. This demonstrates that a scale up of the system developed by Klvana *et al.* (2004) gives comparable production rates. However, the alkaloids production rate with the recirculation system was decreased by one order of magnitude as compared to the one obtained with the free resins in the medium. Indeed, in the case of suspended resins, secondary metabolites concentrations of  $28.4 \pm 8.8$   $\mu\text{mole.gDW}^{-1}$  have been measured. Many assumptions have been made to explain the

low level of production of the perfusion bioreactor. First of all, the extraction column design favored small contact times between medium and resins, which may be a caveat. Evenmore, the need to add antifoam may have affected cell productivity and resin adsorption capacity. The metabolic flux distribution of secondary metabolites varied with the operating conditions. That is the biosynthesis pathway of chelilutine has been favored during the perfusion mode as opposed to the macarpine pathway when using free resins. Therefore, this work has allowed to scale up secondary metabolites continuous extraction method, with no direct cell/extraction phase contact. This process greatly simplifies the separation and purification phases of the produced molecules. Furthermore, the high recirculation rates gave a high extraction capacity.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	IV
<b>RÉSUMÉ</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	XIV
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	XVIII
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	XIX
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	XXI
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	XXII
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	5
1.1 L'INTÉRÊT PHARMACEUTIQUE DES CELLULES DE PLANTES....	5
1.2 LE MÉTABOLISME DES PLANTES .....	7
1.3 LES MÉTHODES DE PRODUCTION .....	11
1.4 LES SYSTÈMES DE CULTURE DE CELLULES DE PLANTES .....	14
1.4.1 La culture en suspension en flacons agités .....	15
1.4.2 La culture en suspension en bioréacteurs.....	15

## **1.5 STRATÉGIES D'AUGMENTATION DES TAUX DE**

<b>PRODUCTION .....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Optimisation de la croissance.....	22
1.5.2 Température .....	23
1.5.3 PH.....	23
1.5.4 Milieu de culture .....	24
1.5.5 Élicitation .....	25
1.5.6 Réacteur continu.....	28
1.5.7 Extraction des métabolites secondaires pendant la culture .....	30
1.5.8 Mode perfusé.....	33

## **CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE.....37**

<b>2.1 CULTURE D'<i>ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA</i> EN FLACONS .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2 DESCRIPTION DU PROTOCOLE PL-CULT-005 : CULTURE</b>	
<b>D'<i>ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA</i> ÉLICITÉE EN SUSPENSION, EN</b>	
<b>BIORÉACTEUR DE 3-L .....</b>	<b>39</b>
2.2.1 Principes.....	39
2.2.2 Description du bioréacteur .....	43
2.2.3 Stérilisation .....	48
2.2.4 Inoculation.....	48
2.2.5 Mise en fonctionnement.....	49
2.2.6 Échantillonnage.....	49
2.2.7 Élicitation .....	50

<b>2.3</b>	<b>BIORÉACTEUR PERFUSÉ .....</b>	<b>51</b>
2.3.1	Vitesse de sédimentation des cellules de plantes .....	51
2.3.2	Configuration du dispositif de sédimentation .....	52
2.3.3	Configuration des colonnes d'extraction .....	54
2.3.4	Détermination du $K_La$ du bioréacteur perfusé.....	55
2.3.5	Culture dans le bioréacteur perfusé.....	55
<b>2.4</b>	<b>PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DE CHITINE.....</b>	<b>61</b>
<b>2.5</b>	<b>DESCRIPTION DU PROTOCOLE PL-CULT-006 : INJECTION DE RÉSINES XAD-7 DANS UNE SUSPENSION D'<i>ESCHSCHOLTZIA</i> <i>CALIFORNICA</i> ÉLICITÉE EN BIORÉACTEUR DE 3-L .....</b>	<b>61</b>
<b>2.6</b>	<b>ANALYSES .....</b>	<b>63</b>
 <b>CHAPITRE 3: RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>ÉTUDE DE LA SEPARATION MILIEU/CELLULES DE PLANTES ...</b>	<b>68</b>
3.1.1	Relation entre la vitesse de sédimentation et le SCV de la suspension .	68
3.1.2	Conception du dispositif de séparation .....	70
3.1.3	Modifications de conception du bioréacteur .....	73
<b>3.2</b>	<b>VALIDATION DU SYSTEME PERFUSÉ.....</b>	<b>80</b>
3.2.1	Étude de la croissance et de la nutrition cellulaire.....	80
3.2.2	Effet de la perfusion sur la production des métabolites secondaires ....	83

<b>CHAPITRE 4: DISCUSSION, CONCLUSION ET</b>	
<b>RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>89</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>96</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>111</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 2.1</b>	Conditions opératoires d'un bioréacteur d' <i>Eschscholtzia californica</i> ...	42
<b>Tableau 3.1</b>	Comparaison des dispositifs de séparation .....	72
<b>Tableau 3.2</b>	Influence des conditions opératoires sur la stabilité du FRONT .....	75
<b>Tableau 3.3</b>	La vitesse de sédimentation et le débit de pompage en fonction du temps et du SCV en bioréacteur.....	79
<b>Tableau 3.4</b>	Paramètres de croissance de <i>E. californica</i> .....	81
<b>Tableau A.1</b>	Composition du milieu de culture .....	113
<b>Tableau A.2</b>	Paramètres opératoires de culture .....	129
<b>Tableau A.3</b>	Tableau de prise de données lors d'une culture .....	133
<b>Tableau A.4</b>	Tableau de prise de données lors de l'injection des résines.....	139
<b>Tableau A.5</b>	Tableau complet de prise de données lors des échantillons.....	141

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b>	Structure chimique de la vincristine et du paclitaxel .....	10
<b>Figure 1.2</b>	Synthèse de la macarpine, sanguinarine, et chelirubine.....	12
<b>Figure 1.3</b>	Cellules d' <i>Eschscholtzia californica</i> sous microscope électronique (10X) .....	17
<b>Figure 2.1</b>	Montage du biorÉacteur.....	44
<b>Figure 2.2</b>	Différentes configurations pour le dispositif de séparation cellules/milieu .....	53
<b>Figure 2.3</b>	Bioréacteur connecté au système de perfusion .....	56
<b>Figure 2.4</b>	Photographies du système perfusé (A) et du bioréacteur de 3-L pourvu de quatre colonnes de sédimentation (B).....	57
<b>Figure 2.5</b>	Photographie du module de rétention des particules provenant des colonnes de sédimentation du bioréacteur .....	60
<b>Figure 3.1</b>	Étude de la vitesse de sédimentation.....	69
<b>Figure 3.2</b>	Influence du débit d'air sur le KLa. ....	77
<b>Figure 3.3</b>	Indice de croissance cellulaire (A) et rapport FW/DW (B) au cours du temps pour différentes conditions opératoires de culture .....	82
<b>Figure 3.4</b>	Production d'alcaloïdes intracellulaires au cours du temps pour différentes cultures .....	85

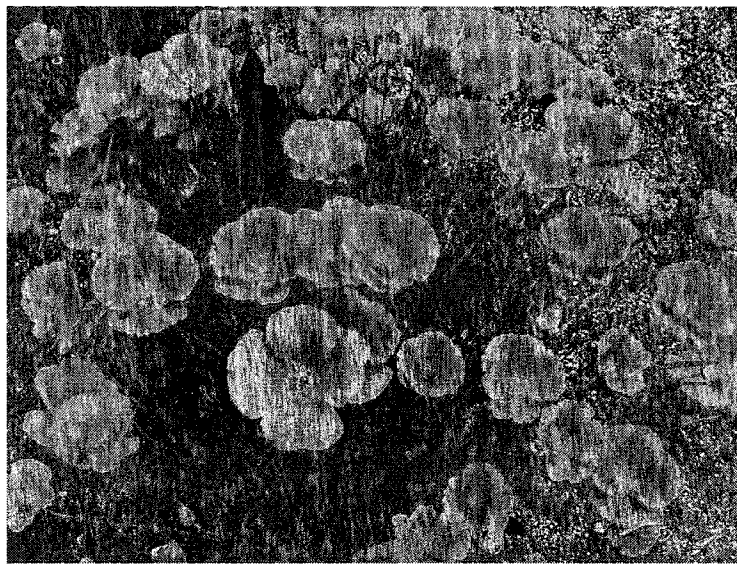
<b>Figure 3.5</b>	Production d’alcaloïdes adsorbés par les résines au cours du temps pour différentes cultures.....	86
<b>Figure 3.6</b>	Voies métaboliques d’ <i>Eschscholtzia californica</i> menant aux alcaloïdes benzophénanthridines .....	88
<b>Figure A.1</b>	Montage du bioréacteur.....	123
<b>Figure A.2</b>	Photographie du montage.....	124
<b>Figure A.3</b>	Production d’alcaloïdes intracellulaires au cours du temps pour la deuxième culture en mode perfusé.....	144
<b>Figure A.4</b>	Nutriments et sucres extracellulaires au cours du temps pour différentes conditions opératoires de culture. ....	149
<b>Figure A.5</b>	Nutriments et sucres intracellulaires au cours du temps pour différentes conditions opératoires de culture. ....	154

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

DO	Oxygène dissous	$\text{mgO}_2.\text{mL}^{-1}$
DW	Matière sèche	$\text{g.L}^{-1}$
FDA	Food and Drug Administration	
FW	Matière humide	$\text{g.L}^{-1}$
GUS	$\beta$ -glucuronidase	
I.D.	Diamètre interne	mm
$K_{La}$	Coefficient de transfert global en $\text{O}_2$	$\text{h}^{-1}$
OUR	Taux de consommation en oxygène	$\text{mMO}_2.\text{gDW}^{-1}$
PCV	Volume centrifugé des cellules	$\% (\text{v.v}^{-1})$
PDA	Photo Diode Array	
SCV	Volume sédimenté des cellules	$\% (\text{v.v}^{-1})$
SD	Déviati on standard	$\%$
$T_m$	Temps de mélange	s
$\mu$	Taux spécifique de croissance	$\text{d}^{-1}$
$V_0$	Volume initial de sédimentation	mL
$V_{\text{sed}}$	Volume final de sédimentation	mL
$Y_{X/\text{glucose}}$	Rendement cellulaire sur le glucose	$\text{gDW.g}^{-1}\text{glucose}$
$Y_{X/\text{NO}_3}$	Rendement cellulaire sur le nitrate	$\text{gDW.g}^{-1}\text{mNO}_3$

## LISTE DES ANNEXES

Annexe A	Composition du milieu de culture .....	112
Annexe B	Protocole de laboratoire PL-CULT-005.....	115
Annexe C	Protocole de laboratoire PL-CULT-006.....	134
Annexe D	Tableau complet de prise de données lors des échantillons.....	140
Annexe E	Résultat de la deuxième culture en mode perfusé.....	142
Annexe F	Nutriments et sucres extracellulaires au cours du temps pour différentes conditions opératoires de cultures.....	145
Annexe G	Nutriments et sucres intracellulaires au cours du temps pour différentes conditions opératoires de cultures.....	150
Données brutes et fichiers sur CD-ROM		



*Eschscholtzia californica*

## INTRODUCTION

### *Problématique*

Les métabolites secondaires produits par les cellules de plantes présentent un grand intérêt pharmaceutique. Malheureusement, les rendements de production en culture *in vitro* des métabolites sont généralement très faibles. Plusieurs méthodes ont cependant permis d'augmenter leur production. Parmi celles-ci, l'ajout de résines adsorbantes directement dans le milieu de culture est une méthode très utilisée. Toutefois, le contact entre les cellules et les résines présente de nombreux inconvénients : la récolte est destructive, avec perte totale de biomasse et l'extraction tout comme la purification des métabolites sont compliquées par la présence de débris cellulaires. En faisant recirculer un milieu exempt de cellules dans une boucle externe contenant la phase extractive, ces inconvénients pourraient être évités. Des travaux de maîtrise effectués au sein du laboratoire (Kivana *et al.*, 2004) sur des flacons agités (170 mL) ont permis de démontrer la faisabilité de cette approche grâce à une méthode de séparation par filtration passive. Toutefois, la mise à l'échelle en bioréacteur de la technologie développée présente plusieurs difficultés. Il est impératif que le processus de séparation cellules/milieu, qui maintient les cellules dans le bioréacteur, repose sur des technologies sans membrane. La littérature se rapportant aux différentes méthodes de séparation cellules/milieu est revue au Chapitre 1. Un nombre important de travaux a été réalisé sur

les systèmes de séparation pour les cultures de cellules de mammifères. Par contre, peu de travaux ont été publiés concernant les cellules de plantes dont la sensibilité au cisaillement nécessite une approche particulière. Le présent projet de maîtrise a ainsi consisté à poursuivre l'étude de Klvana *et al.* (2004) en réalisant une mise à l'échelle d'un système de recirculation en bioréacteur.

### *Objectif principal du projet de maîtrise*

L'objectif global de ce projet de recherche était de développer un bioréacteur à perfusion permettant l'extraction en continu de métabolites secondaires grâce à des colonnes d'extraction externes au bioréacteur, alimentées en milieu de culture exempt de cellules. Des cellules en suspension de *E. californica* ont été sélectionnées comme système modèle. Dans ce contexte, les objectifs secondaires de ce projet étaient de :

- Concevoir des modules de séparation cellules/milieu à haut débit
- Étudier l'effet de l'agitation et du bullage sur la séparation
- Étudier l'influence des modifications de conception du bioréacteur sur sa capacité de transfert en oxygène
- Étudier l'influence d'une perfusion et d'une extraction en continu des métabolites secondaires sur l'état cellulaire
- Étudier l'effet d'une perfusion et d'une extraction en continu des métabolites secondaires sur la production des alcaloïdes

### *Méthodologie générale*

La mise au point du système de recirculation a été basée sur une étude hydrodynamique. L'étude complète des colonnes de sédimentation, du débit de circulation, du module de rétention et des colonnes d'adsorption a été décrite. L'influence du bulage ainsi que de l'agitateur sur la stabilité du front de séparation cellules/milieu au sein des colonnes de sédimentation ont été étudiés. Un bioréacteur à perfusion a ainsi été développé.

Par la suite, une série de cultures a été réalisée afin de valider le nouveau bioréacteur mais également afin de pouvoir comparer le mode perfusé aux autres modes de culture. Deux cultures ont été réalisées avec deux bioréacteurs fonctionnant en parallèle. Pour la première culture, des résines adsorbantes XAD-7 ( $50 \text{ g.L}^{-1}$ ) ont été ajoutées dans la suspension cellulaire d'un bioréacteur test au jour 4, alors que le réacteur contrôle a été opéré sans phase d'adsorption. Pour la deuxième culture, un bioréacteur test a été perfusé à partir du jour 4, au travers d'une colonne de résines XAD-7 afin d'extraire en continu les métabolites secondaires produits. Le bioréacteur contrôle contenait des résines en suspension ( $60 \text{ g.L}^{-1}$ ) dans le milieu, ajoutées au jour 4. L'effet sur la production de la présence de résines et de leur contact avec les cellules a ainsi été évalué. L'analyse d'échantillons pris quotidiennement a permis de quantifier l'évolution dans le temps de la biomasse, du pH, des concentrations intracellulaires et extracellulaires pour les alcaloïdes ainsi que pour les nutriments (anions, cations, sucres). La concentration en alcaloïdes dans les résines a également été déterminée.

La culture en bioréacteur des cellules du pavot de Californie est étudiée depuis plus de 10 ans à l'École Polytechnique. Les paramètres opératoires du bioréacteur (température, pH, concentration cellulaire, vitesse d'agitation, concentration en O<sub>2</sub> dissous, composition du milieu de culture, temps optimal d'élicitation) ont été basés sur les connaissances du laboratoire (Jolicoeur *et al.*, 1992 ; Aubry, 1995 ; Sirois, 1997 ; Klvana *et al.*, 2004 ; Lamboursain, 2004).

### *Organisation du mémoire*

Au Chapitre 1 se trouvent regroupés la revue de la littérature sur les cellules de plante en général, la lignée étudiée dans ces travaux, ainsi que l'état d'avancement des études concernant la production de métabolites secondaires par des cellules de plante en bioréacteur. Une attention particulière a été portée sur les systèmes de séparation cellules/milieu en système perfusé. Au Chapitre 2, se retrouve le matériel utilisé durant ces recherches et les méthodes de culture en bioréacteur et en mode perfusé. Le Chapitre 3 présente les résultats et discussions de la mise au point du système perfusé ainsi que de son application en culture, et sa comparaison aux autres méthodes d'extraction. Les protocoles expérimentaux ont été mis en annexes.

## CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

Dans ce chapitre, tout d'abord l'intérêt des molécules produites par les cellules de plantes est abordé, avec une présentation du métabolisme primaire et secondaire. Les différents systèmes de cultures sont décrits en comparant leurs avantages et inconvénients. La culture en suspension en bioréacteur est décrite plus particulièrement. Finalement, les différentes méthodes développées afin d'augmenter les rendements en produits et les productivités sont expliquées. Ces éléments sont utiles à la compréhension de la problématique du procédé biotechnologique développé dans le cadre des travaux de cette maîtrise et présentés par après au Chapitre 3 portant sur les résultats.

### 1.1 *L'intérêt pharmaceutique des cellules de plantes*

Depuis des siècles, les plantes ont été utilisées par l'homme pour leurs propriétés thérapeutiques. Aux Etats-Unis où la synthèse chimique domine l'industrie pharmaceutique, 25% des molécules actives proviennent d'éléments dérivés de plantes (Payne *et al.*, 1992). Le marché américain de ventes des plantes médicinales a grimpé jusqu'à une valeur de 3 milliards de dollars américains (US\$) par an, selon Glaser (1999). Les plantes vont continuer à constituer une source de composés actifs pour de nouveaux médicaments dans les années futures. En effet, la majorité des éléments produits par les plantes possèdent des propriétés d'intérêts qui doivent encore être découvertes. Beau-

coup d'espèces de plantes ont été étudiées pour leur potentiel à produire une variété de molécules d'intérêts pharmaceutiques (Collin, 2001 ; Kieran *et al.*, 1997 ; Ramachandra et Ravishankar, 2002).

La sanguinarine est un exemple de molécule intéressant les compagnies pharmaceutiques. La sanguinaire présente un potentiel commercial d'une valeur de 4 800 US\$.kg<sup>-1</sup> selon Ravishankar et Ramachandra (2000). Utilisée dans les produits pour les soins dentaires comme agent anti-bactérien et anti-inflammatoire, la sanguinarine diminue les inflammations gingivales et supragingivales (Eley, 1999 ; Godowski *et al.*, 1995 ; Kuftinec *et al.*, 1990). De plus, il a été démontré que la sanguinarine possède des propriétés anti-cancéreuses (Chaturvedi *et al.*, 1997 ; Kolenko *et al.*, 1999 ; Weerasinghe *et al.*, 2001). En effet, cette molécule a eu un effet toxique différencié sur les cellules, limitant la prolifération et provoquant une réponse apoptotique plus importante sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales (Ahmad *et al.*, 2000).

Un autre exemple de molécule d'intérêt est le paclitaxel, qui fut isolé en 1971 de l'if du Pacifique, et qui possède des propriétés pharmacologiques très intéressantes. Son activité bénéfique contre le cancer des ovaires, de la poitrine, du poumon, de la vessie, de l'utérus aussi bien que de l'œsophage a été démontrée dans nombreux traitements cliniques (Rowinsky *et al.*, 1990 ; Kuruma *et al.*, 2003). Par ailleurs, ce médicament a été approuvé pour le traitement du cancer des ovaires par la U.S. Food and Drug Administration (FDA) en 1992. Le paclitaxel a été même considéré comme la

plus importante découverte en chimiothérapie pour le traitement de cancer de la poitrine et des ovaires des 20 dernières années (Collin, 2001). La valeur du paclitaxel était estimée à 600 000 US\$.kg<sup>-1</sup> durant le monopole de Bristol Meyers Squibb (Ravishankar et Ramachandra, 2000). La fin du brevet en 2001 a permis la vente de paclitaxel générique par d'autres compagnies pharmaceutiques comme Ivax, Abbott, et Mylan, ce qui a entraîné une diminution importante de sa valeur.

*Catharanthus roseus* (la pervenche de Madagascar) produit des alcaloïdes indoles. Ces composés sont importants au niveau thérapeutique et sont inclus dans des médicaments contre le cancer (vinblastine et vincristine) et le traitement de troubles circulatoires (ajmalicine) (Collin, 2001).

## 1.2 *Le métabolisme des plantes*

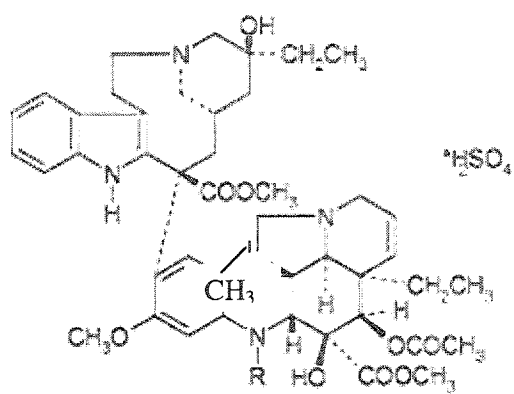
Les plantes produisent divers composés organiques dont les métabolites primaires. Ces molécules comprennent les composés associés à la synthèse des cellules et sont directement impliquées dans le processus de croissance de la plante. Elles présentent une large gamme de structures comme les phytostérols, les protéines, les polysaccharides, les nucléotides, les acides aminés et les acides organiques. La biotechnologie des plantes a récemment porté son attention sur la production de protéines recombinantes d'intérêts pharmaceutiques (Doran, 2000 ; Daniell *et al*, 2001 ; Horn *et al.*, 2004).

Cependant, plusieurs molécules produites à plus faibles concentrations ne semblaient pas participer directement à la croissance et au développement de la plante. Traditionnellement, ces substances ont été appelées métabolites secondaires. Au départ, peu d'attention était donnée à ces molécules produites en petite quantité en fin de culture. Aujourd'hui, leur importance a été démontrée. Généralement, les métabolites secondaires influencent les interactions entre la plante et son environnement, principalement lors de mécanismes biochimiques de défense contre les pathogènes ou les prédateurs. Chaque année plusieurs molécules dérivées de plantes sont découvertes. Les fonctions de la plupart de ces molécules restent encore peu caractérisées, toutefois, plusieurs métabolites secondaires ont des propriétés intéressantes en tant que produits thérapeutiques ainsi que comme colorants, arômes additifs, et parfums (Dornenburg et Knorr, 1996). En effet, ces molécules, une fois extraites des plantes et purifiées, peuvent présenter de grandes valeurs commerciales, surtout dans le domaine pharmaceutique.

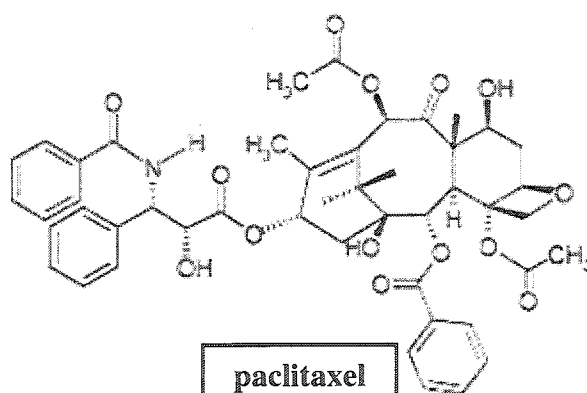
Ces composés peuvent être divisés en trois groupes majeurs: les terpénoïdes, les alcaloïdes ainsi que les composés phenyl-propanoïdes et leurs dérivés phénolés (Buchanan *et al.*, 2002). Tous les terpénoïdes, incluant les métabolites primaires et secondaires sont dérivés du précurseur isopentenylidiphosphate (IPP). Les alcaloïdes, qui contiennent un ou plusieurs atomes d'azote, sont synthétisés principalement à partir d'acides aminés. Les composés phénoliques sont synthétisés à partir de l'acide shiki-

mique ou du malonate/acétate. Ces molécules possèdent une large diversité au niveau de leur structure et de leur taille, et se retrouvent en grand nombre à travers le règne végétal. Cependant, la majorité des métabolites secondaires produits ont une structure très complexe dû à la présence de nombreux cycles aromatiques. La Figure 1.1 donne la structure de la vincristine et du paclitaxel, illustrant la complexité de ces molécules d'intérêts.

Une molécule produite par les cellules de plantes sera considérée comme un métabolite primaire ou un métabolite secondaire en fonction de son rôle dans la cellule. En effet, les métabolites peuvent être difficilement distingués primaires ou secondaires à partir de leurs molécules précurseurs ou de leurs structures chimiques.



**vincristine**



**paclitaxel**

**Figure 1.1** Structure chimique de la vincristine et du paclitaxel

### 1.3 Les méthodes de production

De par leurs intérêts pharmaceutiques, différentes méthodes de production à grande échelle des métabolites secondaires ont été développées. L'obtention par synthèse chimique de ces biomolécules complexes est possible, cependant elle implique une quantité importante d'étapes et par conséquent une possibilité de non rentabilité du procédé. Par exemple, la vinblastine et la vincristine, produites par *Catharanthus roseus* présentent une chaîne réactionnelle très longue impliquant 20 étapes enzymatiques (Collin, 2001). Alors que les synthèses de la macarpine, chelirubine et sanguinarine par *Eschscholtzia californica* sont également compliquées (Figure 1.2). Une synthèse chimique rentable ne peut être obtenue pour des composés comme les paclitaxels, les alcaloïdes indoles ou benzophénanthridiques. Pour cette raison, la méthode la plus utilisée, encore aujourd'hui, est la culture de la plante en champs. Celle-ci implique une faible reproductibilité due à la variabilité des conditions de culture agricole (localisation géographique, climat, saison, sol). De plus, la culture en champs est confrontée aux problèmes liés aux pathogènes et doit respecter les exigences des organismes de régulation telle que la FDA.

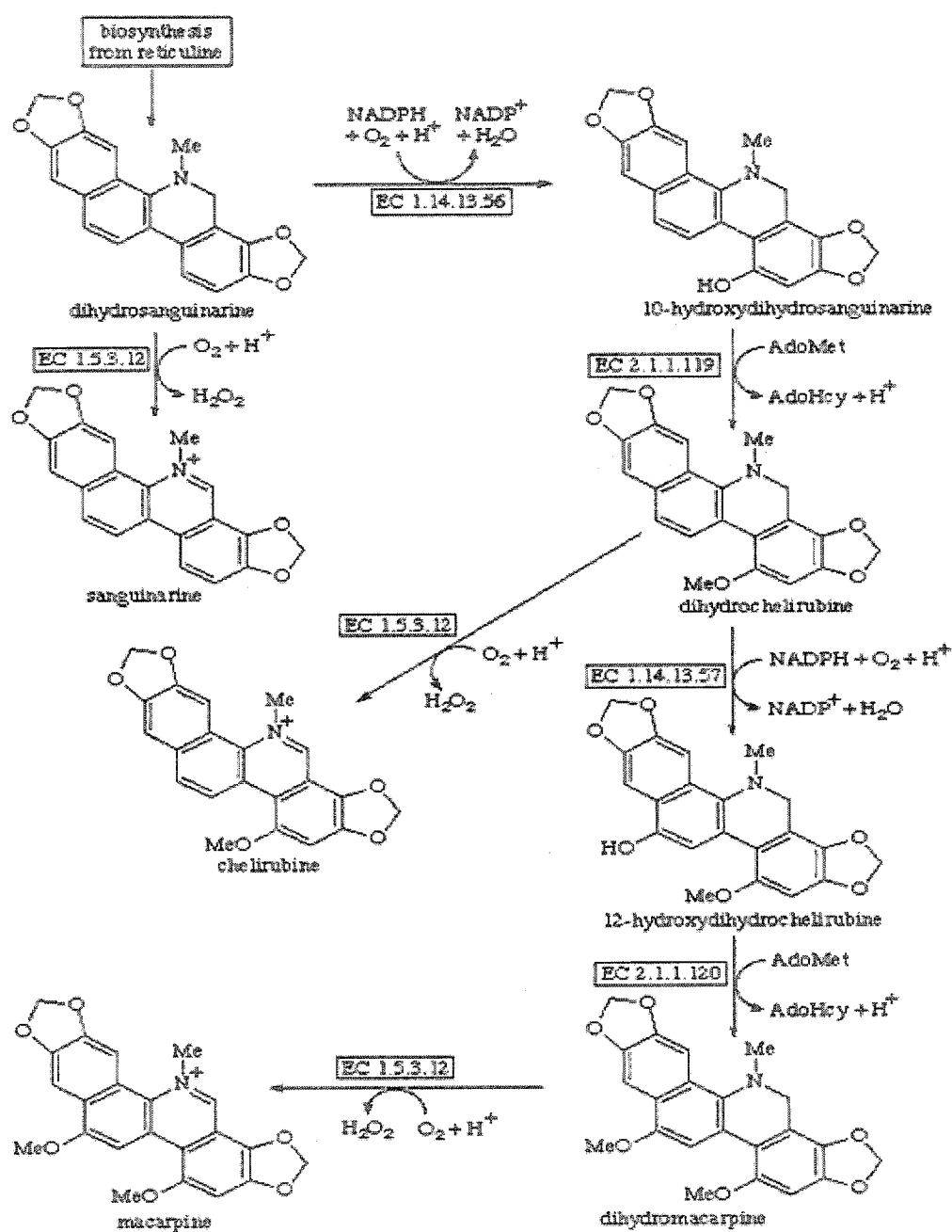


Figure 1.2 Synthèse de la macarpine, sanguinarine, et chelirubine

Enfin, les molécules sont produites en faibles concentrations dans les plantes, ce qui implique une quantité importante de surface cultivable. Pour le paclitaxel, l'unique moyen actuel pour son obtention commerciale a été son extraction directe de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) contenant seulement 0.01 % (g.g<sup>-1</sup>) de paclitaxel (Zhong, 2002). La sanguinarine était obtenue à partir de la plante *Sanguinaria canadensis* d'une faible teneur de 10 % (g.g<sup>-1</sup>) (Rho *et al.*, 1992). A cause des nombreux inconvénients que présente la culture en champs, les entreprises pharmaceutiques ont entrepris depuis plusieurs décennies des études sur la culture de cellules *in vitro* en environnement aseptique, contrôlé et défini afin de pouvoir optimiser les taux de production tout en offrant un produit plus reproductif sur le marché. La culture de cellules à grande échelle a offert une alternative technologique très attractive pour la production de ces molécules d'intérêts. Cependant, malgré le nombre important de recherches, l'exploitation industrielle des biotechnologies végétales *in vitro* est restée faible. Seules quelques espèces végétales sont actuellement utilisées commercialement, comme la cellule *Panax ginseng* produisant l'herbe orientale ginseng (Wu et Zhong, 1999), la *Lithospermum erythrorhizon* produisant le pigment rouge shikonine (Yamamoto *et al.*, 2002) et la production de l'alcaloïde berberine aux propriétés thérapeutiques par la cellule *Coptis japonica* (Mulabagal et Tsay, 2004). Ces procédés respectent les normes commerciales et biologiques imposées. Les raisons de ce faible succès commercial sont principalement dues à la grande variabilité et au faible rendement en produits.

L'instabilité des lignées cellulaires, la connaissance limitée du métabolisme secondaire, la croissance lente ainsi que la difficulté de mise à l'échelle ont été également des pro-

blèmes rencontrés. Sachant que la synthèse en culture végétale de ces molécules a permis des exploitations industrielles rentables, de nombreuses études ont été réalisées. Plusieurs travaux ont ainsi été effectués afin d'améliorer les techniques de production, notamment l'augmentation des rendements. Les chapitres suivants expliquent les différentes recherches développées.

#### 1.4 *Les systèmes de culture de cellules de plantes*

A partir d'une partie de la plante (racine, pousse, feuille, tige...), il est possible d'obtenir une culture de cellules de plantes, en la déposant stérilement sur un milieu nutritif solide pour multiplication des cellules. Généralement, l'ajout de diverses hormones telles que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est effectué de façon à réguler la croissance et inhiber la différenciation cellulaire. En présence de ces hormones, les cellules croîtront à titre de cellules méristématiques sans toutefois former de tissus organisés tels que fleurs, feuilles, tiges ou racines. A partir de cette culture sur milieu solide, deux systèmes sont utilisés: la culture de cellules immobilisées et la culture de cellules en suspension. Dans le premier cas, les cellules sont encapsulées ou fixées à un support (polymérique ou métallique biocompatible). Pour un système en suspension, les cellules cultivées sur milieu solide sont transférées dans un milieu nutritif liquide homogène.

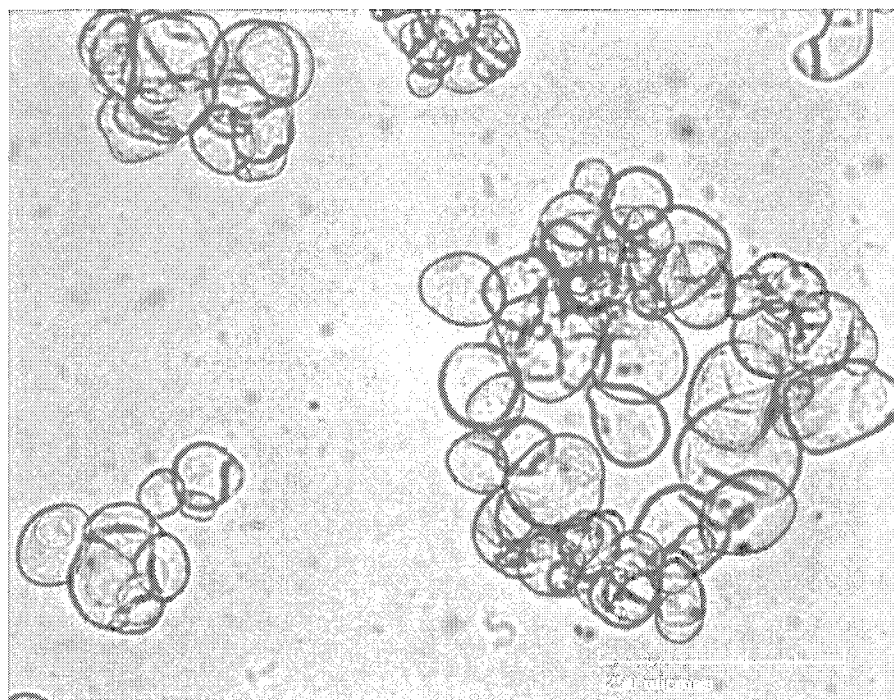
#### 1.4.1 La culture en suspension en flacons agités

L'Erlenmeyer est le système le plus utilisé pour la culture de cellules de plantes dû à une mise en œuvre très simple et un faible coût. Par contre, le suivi et le contrôle des paramètres de culture sont difficiles. La conséquence est une difficulté de reproductibilité mais également la présence d'écarts inévitables face aux conditions optimales de culture. Mc Murray-Beaulieu (données internes au laboratoire) a démontré une limitation en oxygène dans les flacons agités. La concentration en oxygène était de 15 % de saturation en  $O_2$  après 4 jours pour *Eschscholtzia californica* dont la durée totale de culture est de 10 jours. Le bioréacteur permet de travailler à grande échelle, dans des conditions permettant une maîtrise adéquate du déroulement des cultures. Ce système offre la possibilité, contrairement au flacon, un suivi continu des conditions de culture : la concentration en oxygène dissous, le pH, le débit de gaz en surface ou en bullage, etc...

#### 1.4.2 La culture en suspension en bioréacteurs

Les propriétés bien particulières des cellules de plantes doivent être considérées lors de la conception et de l'opération des bioréacteurs. Comme les cellules de mammifères, les cellules de plantes sont extrêmement sensibles au cisaillement mécanique, ce qui peut engendrer une lyse cellulaire non négligeable. Les bioréacteurs équipés d'agitateurs conventionnels (Rushton, hélice marine,...) ne sont donc pas utilisés pour

homogénéiser les cellules de plantes puisqu'ils imposent un cisaillement trop important (Tanaka, 2000). L'aération est un facteur important pour la production à grande échelle. La demande en oxygène par les cellules de plantes est relativement modeste comparée aux bactéries et aux levures. Cependant, les suspensions sont très visqueuses à haute densité avec production d'agrégats de différentes tailles, caractéristiques pouvant induire des transferts faibles en oxygène dans un bioréacteur. De plus, les cellules de plantes ont une tendance à la formation de mousse et de biomasse flottante en surface, ce qui limite le transfert et la croissance. Au niveau de la rhéologie, les suspensions de cellules de plantes ont un comportement complexe qui implique des difficultés d'homogénéisation par rapport aux suspensions de bactéries, levures et moisissures. La Figure 1.3 montre la formation d'agrégats par des cellules d'*Eschscholtzia californica* de 6 jours observées sous microscope électronique. A cause des agrégats, les vitesses de décantation sont élevées. La majorité des suspensions à haute densité ont un comportement non-newtonien rhéofluidisant (Kieran *et al.*, 1997). La viscosité apparente augmente avec la concentration en biomasse. Tanaka (1982) a suggéré que ces fluides obéissent à la loi de puissance Ostwald-de-Waele.



**Figure 1.3**    Cellules d'*Eschscholtzia californica* sous microscope électronique (10X)

Souvent sous-estimé, le comportement rhéofluidisant implique beaucoup de difficultés au niveau de l'homogénéisation, de la sensibilité des cellules au cisaillement et du transfert d'oxygène nécessaire.

Les équipements conventionnels utilisés pour les bactéries, les levures et les moisissures ne peuvent donc directement être utilisés pour les cellules de plantes. Beaucoup d'études de conception et de mise en oeuvre ont été réalisées afin de surmonter les difficultés liées à la culture de cellules de plantes, elles permettent un procédé optimisé à grande échelle.

Plusieurs bioréacteurs ont ainsi été développés pour la culture de cellules végétales immobilisées et la culture en suspension. Archambault (1991) a développé un réacteur airlift de 20 L pour des cellules immobilisées de *Catharanthus roseus*. Facchini et DiCosmo (1991) ont travaillé avec un bioréacteur de 4.5 L où le mélange est assuré par un agitateur magnétique et une colonne cylindrique de diffusion de gaz pour *Thalictrum rugosum*. Les avantages des cultures de cellules immobilisées sont nombreux : bonnes performances, facilité de mise en oeuvre et récupération aisée des produits. Cependant, de gros problèmes d'hétérogénéité d'états physiologiques des cellules en fonction de leur position dans le réacteur ont été rencontrés (Furusaki, 1988 ; Archambault *et al.*, 1996). Ceci étant causé par le faible taux de transfert des nutriments au travers des capsules, ou du biofilm, avec comme conséquence une diminution du potentiel de

production. De plus des interactions physicochimiques ont été observées entre le matériel d'immobilisation et les cellules (Haldimann et Brodelius, 1987).

Par conséquent, le système le plus utilisé et le plus prometteur à long terme reste la suspension cellulaire. Ce système est préféré pour sa flexibilité, sa facilité, sa reproductibilité et son faible coût par rapport au système immobilisé.

### *Agitation*

La production de podophyllotoxine a été réalisée dans un réacteur de 3 L où l'homogénéisation était assurée mécaniquement par un agitateur Setric imposant un faible stress aux cellules (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Une agitation de 100 rpm a permis d'obtenir une biomasse maximale de  $6.5 \text{ g.L}^{-1}$  sans induire de dommages significatifs. Les réacteurs à rubans hélicoïdaux permettent de travailler à des taux de cisaillement inférieurs de 50 % à ceux obtenus avec des agitateurs conventionnels pour une même qualité d'agitation et de transfert (Aubry, 1995). Jolicoeur *et al.* (1992) ont développé un bioréacteur de 11 Litres à double ruban hélicoïdal permettant de travailler à haute densité cellulaire. La suspension utilisée était *Catharanthus roseus* caractérisée par un comportement rhéologique de type rhéofluisant. Ce réacteur a été conçu de façon à assurer un mélange homogène à l'aide de chicanes de surface et d'un profil adéquat de la cuve. Les temps de mélange étaient élevés avec un  $t_m$  de 4 à 9 s et un taux de transfert en oxygène autour de  $45 \text{ h}^{-1}$  pour des vitesses de 120-150 rpm. Des densités

très élevées de suspensions cellulaires pouvant aller jusqu' à 25 gDW.L<sup>-1</sup> et 100 % SCV ont été obtenues à 120 rpm. Cette vitesse correspondait à l'agitation maximale, fixée par la formation importante de mousse et de biomasse flottante en surface à vitesses plus élevées. Malgré les densités et viscosités élevées (5 Pa.s au jour 14), le mélange était parfaitement homogène tout au long de la culture. Par leur propriété de mélange et le faible cisaillement imposé, les réacteurs à ruban hélicoïdal restent les réacteurs les plus performants pour la culture des cellules végétales.

### *Aération*

La plupart des études sur l'aération des cellules en suspension ont porté leur attention sur l'influence du coefficient de transfert ( $K_La$ ), paramètre liant l'aération et l'agitation. Plusieurs chercheurs ont étudié la valeur du  $K_La$  sur les performances du système pour différentes configurations de bioréacteurs (Tanaka, 2000 ; Leckie *et al.*, 1991). Ces études ont montré que lorsque la concentration en oxygène est insuffisante, la culture est inhibée. Gao et Lee (1992) ont étudié l'effet de l'alimentation en oxygène sur des suspensions de cultures de cellules de tabac génétiquement modifiées. Des apports élevés d'oxygène ont stimulé la croissance cellulaire et la production de la protéine d'intérêt  $\beta$ -glucuronidase (GUS). Cependant, des hauts taux d'alimentation en O<sub>2</sub> peuvent induire une diminution de la productivité, celle-ci étant attribuée à l'élimination du CO<sub>2</sub> et des éléments volatiles essentiels à la croissance. En effet, lors d'une mise à l'échelle d'une culture de *Catharanthus roseus*, Schlatmann *et al.* (1993)

ont confirmé l'importance des composés gazeux dissous dans un bioréacteur muni d'une recirculation des gaz. Ils en ont conclu que la perte d'un élément essentiel non identifié était responsable de la diminution de la synthèse d'ajmalicine en bioréacteur comparé à la production en flacon. De plus, une alimentation trop grande en gaz peut induire une formation importante de mousse, qui peut engendrer des problèmes sévères sur la croissance et sur la production. La formation de mousse est directement liée au taux d'aération et à la concentration extracellulaire en protéine (Wongsamuth et Doran, 1994). Des anti-mousses ont été injectés dans le milieu de culture afin de contrôler la formation de mousse dans les suspensions végétales. Il a été démontré que l'ajout de surfactant dans une culture en bioréacteur agité de *Perilla frutescens*, a favorisé la croissance et la production d'anthocyanin (Zhong *et al.*, 1992). Cependant, un agent anti-mousse peut avoir des effets négatifs, c'est-à-dire une diminution de la productivité ou de la croissance, lorsque l'agent est mal adapté au type de cellule, ou mis en trop grande concentration (Wongsamuth et Doran, 1994).

Beaucoup d'études doivent encore être réalisées, surtout au niveau de l'optimisation de la production des métabolites secondaires. En effet, les taux de production sont encore très faibles, ce qui rend le procédé encore peu rentable et non compétitif au niveau industriel. Par conséquent, plusieurs études ont porté sur l'augmentation de productivité des cellules de plantes.

## 1.5 *Stratégies d'augmentation des taux de production*

L'augmentation des taux de production peut être atteinte par une sélection de lignées hautement productives combinée à l'optimisation de la croissance, des conditions de culture, de l'élicitation, de la capacité métabolique des cellules par l'ingénierie génétique et par l'optimisation du procédé d'extraction des produits.

### 1.5.1 **Optimisation de la croissance**

Ayant comme optique l'augmentation de la production des métabolites secondaires, de nombreuses études ont porté sur la phase de croissance des cellules végétales. En effet, leurs objectifs étaient de maximiser la biomasse cellulaire, et donc le potentiel global de production. Le taux de croissance varie en fonction de l'espèce, de la lignée et des conditions de culture. Ainsi, le pH, la température, la concentration en nutriments peuvent avoir une influence plus ou moins importante sur la division cellulaire. Sirois *et al.* (2000) ont étudié un modèle de croissance afin d'optimiser les conditions de culture favorables à la croissance de *Eschscholtzia californica* en bioréacteur. La croissance et la production de jaceosidine ont également été optimisées pour les cellules en suspension de *Saussurea medusa* (Zhao *et al.*, 2001). Un modèle nutritionnel a également été développé par Jolicoeur *et al.* (2002) décrivant la symbiose micorhizienne entre les racines végétales *Daucus carota* et le champignon *Glomus intraradices*

### 1.5.2 Température

Généralement l'échelle de température pour les cultures de cellules se situe entre 17 et 25 °C. Pour la plupart des cellules de plantes, le taux spécifique de croissance augmente avec la température jusqu'à un optimum, et ensuite la croissance décline par perte de viabilité cellulaire. La croissance ou la production est favorisée à différentes températures en fonction de l'espèce de la plante, ce qui nécessite de nombreuses études d'optimisation. Kato *et al.* (1976) ont estimé la croissance de *Nicotiana tabacum* à des températures se situant entre 19 et 34 °C. Ten Hoopen *et al.* (2002) ont étudié l'influence de la température sur la croissance et la production d'ajmalicine par des suspensions de *Catharanthus roseus*, montrant une température optimale de 27.5 °C.

### 1.5.3 PH

Le pH du milieu de culture est ajusté entre 5 et 6, dépendamment de l'espèce, avant l'autoclavage et les déviations importantes par rapport au pH initial sont évitées. Husemann *et al.* (1992) ont étudié l'effet du pH externe sur le pH intracellulaire, celui-ci ayant une influence sur l'assimilation du CO<sub>2</sub> par des cellules photoautotrophique de *Chenopodium rubrum*. L'influence du pH sur la croissance a également été étudiée pour les cellules *Physcomitrella patens*, utilisées pour la production de protéines (Hohe *et al.*, 2002). Cette étude a indiqué l'importance dans certain cas, de contrôler le pH afin de le maintenir constant en bioréacteur.

#### 1.5.4 Milieu de culture

Les lignées cellulaires de plantes croissent généralement de façon hétérotrophique en consommant des sucres comme source de carbone, ainsi que des substances inorganiques comme autres nutriments. Les métabolites secondaires sont souvent produits *in vitro* en fin de culture lorsque la croissance diminue et que l'excès des nutriments (carbohydrate, azote, ...) est redirigé dans les voies métaboliques secondaires. La production peut être augmentée ou diminuée en changeant la composition du milieu de culture, plus spécifiquement au niveau de la concentration en sucre, phosphate, nitrate et facteurs de régulations. Le moment où les changements de concentration sont effectués peut également influencer la production. Pour cette raison, plusieurs milieux définis ont été développés pour la culture de cellules végétales. Le milieu B5 (Gamborg *et al.*, 1968) additionné de sucres et d'hormones a été couramment utilisé. La composition du milieu de culture utilisé pour les cellules d'*Eschscholtzia californica* est donnée en Annexe A. De nombreuses recherches ont comparé la production des molécules d'intérêts en modifiant les concentrations en nutriments. Cette méthode a été très utilisée pour augmenter les rendements de production. Cependant, actuellement cette technique est surtout utilisée au départ du développement d'une nouvelle espèce, son influence étant faible comparée aux autres méthodes.

Rho *et al.* (1992) ont observé une augmentation de la production en alcaloïdes par *Sanguinaria canadensis* lors de l'utilisation du milieu B5 contenant la moitié de la

concentration originale en nitrate. Des concentrations trop élevées de sucrose (5 %, w.v<sup>-1</sup>) ont induit une diminution de la production d'anthocyanes par *Aralia cordata* alors que l'accumulation d'anthocyanes était favorisée (Sakamoto *et al.*, 1993). Lecky *et al.* (1992) ont observé une augmentation de 4 fois la production de dihydrosanguinarine par *Papaver bracteatum* lors d'ajout de cuivre à des concentrations traces. Un manque de régulateurs de croissance a eu pour effet d'augmenter la production de sanguinarine par *Papaver bracteatum* (Cline et Coscia, 1988).

Il est également possible de travailler avec deux types de milieu de culture, l'un favorisant la croissance, et l'autre la production. Cusido *et al.* (2002) ont observé une augmentation des rendements de production de paclitaxels en cultivant les cellules *Taxus media* dans un réacteur contenant un milieu de croissance optimisé jusqu'à leur phase stationnaire, avec rajout du milieu de production optimal dans le même réacteur après avoir éliminé le milieu utilisé.

### 1.5.5 Élicitation

A cause de son effet quant à l'activation de la voie des métabolites secondaires, l'élicitation a été une technique très utilisée pour augmenter la production. L'élicitation consiste à simuler une attaque d'un pathogène. Par mécanisme de défense afin d'assurer leur survie, des molécules sont accumulées dans les cellules ou libérées dans l'environnement par la cellule (air, sol). Pour une variété de cellules de plantes, les éli-

citeurs ont augmenté la production de coumarin (Hamerski *et al.*, 1990), podophyllotoxine (Muranaka *et al.*, 1998), alcaloïde benzophénanthridine (Collinge et Brodelius, 1989), alcaloïde indole (Rijhwani et Shanks, 1998), taxoïde (Wang et Zhong, 2002). Il existe deux types d'éliciteurs pouvant induire un mécanisme de défense : les éliciteurs biotiques et abiotiques (Radman *et al.*, 2003).

### *Les éliciteurs biotiques*

Très souvent des composés biologiques de structures chimiques complexes et de composition exacte inconnue ont été utilisés comme agent éliciteur. Les éliciteurs biotiques proviennent en général d'extraits de levures ou de parois cellulaires microbiennes. Récemment, des éliciteurs de structures chimiques connues ont été sélectionnés, par exemple certains carbohydrates et protéines.

Les taux de production de sanguinarine provenant de *Papaver somniferum* ont été augmentés d'une concentration de 1 à 5 % gDW, lors d'ajout d'extrait de chitine, molécules provenant de parois de champignons ou de crustacés (Archambault *et al.*, 1996). Les alcaloïdes benzophénanthridines provenant de *Eschscholtzia californica* ont également été produits en plus grande quantité lors d'ajout d'agents éliciteurs provenant d'extraits de levure (Collinge et Brodelius, 1989 ; Byun *et al.*, 1992), de chitine (Klvana *et al.*, 2004) ou de méthyljasmonate ( Gundlach *et al.*, 1992). L'acide jasmonique est un messager secondaire intervenant dans la voie d'initiation du métabolisme

secondaire. L'effet de la paroi cellulaire de *Phytophthora nicotinae*, un pathogène potentiel, a été étudié sur la production de phytoalexins dans des cultures de *Nicotiana tabacum* (Oelofse et Dubery, 1996). Au niveau des protéines comme agent éliciteur, les glycoprotéines provenant du champignon *Ceratocystis fimbriata* ont impliqué une augmentation de la production de coumarin par *Plantanus acerifolia* (Alami *et al.*, 1998). Les exemples d'applications sont nombreux, l'élicitation biotique étant une pratique courante à cause de son efficacité sur la production de molécules d'intérêts.

Beaucoup d'études se sont portées sur la concentration et le temps optimal d'ajout de l'agent éliciteur, comme celle réalisée sur des racines de *Catharanthus roseus* par Rijhwani et Shanks (1998). Ces derniers ont également étudié l'effet de l'élicitation sur les voies métaboliques, montrant que l'acide jasmonique a eu pour effet d'augmenter le flux de production pour différentes branches du réseau réactionnel des alcaloïdes indoles.

### *Les éliciteurs abiotiques*

L'utilisation d'éliciteurs abiotiques pour les cellules de plantes a reçu moins d'attention en comparaison aux éliciteurs biotiques. Les éliciteurs abiotiques peuvent être la température, les rayons ultraviolets, les détergents, le cisaillement ainsi que divers agents chimiques.

Par utilisation de chocs thermiques, il a été possible d'augmenter la production d'huiles essentielles. En réduisant la température de 27 °C à 10 °C pendant une période de 6 h, une augmentation de 0.53 g.L<sup>-1</sup> d'huile essentielle a été induite sans affecter la croissance (Dörnenburg et Knorr, 1996). Pour des suspensions de *Portucala*, les niveaux de betacyanine ont été augmentés de 1.3 et 1.5 fois respectivement en présence de deux éliciteurs abiotiques (20 µmol.L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> et 100 µmol.L<sup>-1</sup> FeEDTA). A partir d'une suspension de *Catharanthus roseus*, une étude de production de la protéine cyclophilines a été réalisée en exposant les cellules à différents stress chimiques ou thermiques. L'élimination de phosphate de la culture, ou l'addition de 35 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl ainsi que le transfert de la culture de 24 °C à 4 °C a eu pour effet d'augmenter la production de cyclophilines (Droual *et al.*, 1997).

#### 1.5.6 Réacteur continu

Dans une culture continue, les nutriments consommés par les cellules sont remplacés en continu par une entrée de milieu frais. Généralement, la suspension usée (milieu et cellules) est éliminée au même débit que celui de l'ajout de milieu. De cette façon, un état stationnaire au niveau des concentrations cellulaires s'établit à un taux de dilution inférieur au taux spécifique de croissance ( $\mu$ ) des cellules.

Actuellement, les cultures continues ont été surtout utilisées comme moyen de recherche en laboratoire (van Gulik *et al.*, 2001). Les paramètres de culture restant constants sur de longues périodes, il a été ainsi possible d'étudier les cinétiques de croissance et de production, ainsi que la physiologie de la plante. Le métabolisme des cellules peut être facilement étudié en faisant varier la concentration de l'alimentation pour limiter la croissance par un substrat. Une culture de *Petunia hybrida* a été réalisée en mode continu sous des conditions limitantes en glucose de façon à étudier les cinétiques de croissance (de Gucht et VanderPlas, 1995). Oostdam et VanderPlas (1996) ont étudié la croissance de *Linum flavum* avec une limitation en phosphate de façon à connaître la relation entre la croissance, le métabolisme énergétique, et le métabolisme secondaire.

Des études ont porté également sur l'augmentation des rendements de production des métabolites secondaires. Park *et al.* (1990) ont comparé la production par *Catharanthus roseus* en batch, fed-batch et en culture continue. La plus haute productivité en catharanthine a été trouvée pour la culture continue. Le taux spécifique de production pour les paclitaxels a été augmenté d'un facteur de 10 comparé à une culture opérée en mode batch (Zhong, 2002). La production de podophyllotoxine produite par *Podophyllum hexandrum* a été augmentée de 13.8 mg.L<sup>-1</sup> à 48.8 mg.L<sup>-1</sup> avec une alimentation continue de milieu nutritif (Chattopadhyay *et al.*, 2003).

Pour une application industrielle, la culture continue est attractive. Les conditions étant contrôlées, la période du procédé devient plus grande et les rendements en produits élevés. Cependant, le nombre actuel d'applications est faible. Les problèmes spécifiques d'applications de la culture continue en bioréacteur ont été discutés par Heijnen *et al.* (1992).

#### **1.5.7 Extraction des métabolites secondaires pendant la culture**

L'ajout d'une seconde phase au cours d'une culture a été une stratégie très étudiée pour augmenter les rendements de production des cellules de plantes dans un bioréacteur. Une phase solide d'adsorption ou un liquide organique d'extraction ont été utilisés afin de récupérer sélectivement les métabolites secondaires produits. La phase de récupération des produits a été soit rajoutée directement dans le système de culture ou bien se situait dans une boucle externe au réacteur. Tout en limitant la détérioration des métabolites secondaires, cette technique a eu pour avantage de simplifier les étapes qui suivent la culture comme la récolte, l'extraction et la purification des produits. De plus, cette technique a la capacité d'augmenter la production par minimisation de l'effet d'inhibition des produits sur le métabolisme. En effet, le produit était éliminé continuellement du milieu de culture grâce à l'extraction de la deuxième phase. Lee-Parsons et Shuler (2002) ont démontré cet effet en rajoutant le produit (ajmalicine) dans le milieu de culture et en observant une diminution de sa production, dépendant de la concentration ajoutée.

Pour les phases organiques liquides, la tricapryline et l'huile de silicone injectée dans le milieu ont été capables d'accumuler les métabolites secondaires. Le paclitaxel produit par *Taxus brevifolia* (Collins-Pavao *et al.*, 1996) a été accumulé dans la tricapryline sans affecter leur croissance. Byun et Pedersen (1994) ont utilisé de l'huile de silicone pour accumuler et même augmenter de 140 % la production des alcaloïdes totaux dans un réacteur airlift de 2 phases pour une suspension de *Eschscholtzia californica*. Des phases solides, comme des résines polymériques ont été également capables d'augmenter les rendements de production. L'addition de résines XAD-7 a amélioré les productions de sanguinarine, pour *Papaver somniferum* d'environ 40 % (Williams *et al.*, 1992), et d'ajmalicine pour *Catharanthus roseus* d'environ 70 % (Lee-Parsons et Shuler, 2002). La résine XAD-7 est un adsorbant solide très utilisé en culture végétale. Cette résine possède d'excellentes propriétés d'adsorption et de désorption. Payne et Shuler (1988) ont comparé XAD-4, un divinylbenzene styrène et XAD-7, un ester polycarboxilique. Malgré la plus faible capacité de XAD-7, sa sélectivité d'adsorption des alcaloïdes indoles a été beaucoup plus grande comparé à XAD-4.

Beaucoup de recherches ont étudié les concentrations et les temps d'ajout optimaux de la phase d'extraction. Ces deux paramètres peuvent influencer la croissance, la production des métabolites secondaires et leur récupération de la culture. Par exemple, pour la production d'anthraquinones à partir de *Cinchona ledgeriana*, Robins et Rhodes (1986) ont observé que l'addition en début de culture de résines (jour 0 - 3) a diminué

la croissance et augmenté la production, par contre l'addition tardive (jour 14 - 18) n'a pas conduit à une augmentation de production. L'addition de résines XAD-7, le jour 5 de la culture a résulté en une production maximale en ajmalicine synthétisée par *Catharanthus roseus* en comparaison aux autres jours d'ajout (Lee-Parsons et Shuler, 2002).

Cependant, le problème de cette technique est l'arrêt de la culture, lors de la récolte des résines adsorbantes ou de la phase organique pour récupérer le produit. La récolte est ainsi destructive, ce qui limite le potentiel de production des cellules. De plus, le procédé de séparation entre la phase adsorbante et le mélange cellules-milieu est compliqué. Les cellules peuvent ainsi continuer à produire, lorsque la phase d'extraction est récoltée et renouvelée. En recirculant le milieu de culture par une boucle externe au travers d'un liquide organique ou d'une colonne, la méthode devient non destructive.

Les métabolites secondaires qui sont libérés dans le milieu de culture peuvent être transformés par les cellules. Ce système de recirculation offre une solution au problème. De cette façon, les produits sont extraits en continu, ce qui limite la détérioration des métabolites secondaires comme observé par Lee-Parsons et Shuler (2002).

Dans le cas où les cellules sont immobilisées, aucun problème de séparation entre les cellules et le milieu n'est rencontré, le milieu de culture est ainsi recirculé aisément. Corry *et al.* (1993) ont obtenu une extraction efficace des métabolites secondai-

res produits par des racines de *Hyoscyamus muticus* en recirculant le milieu par une boucle externe contenant une phase organique, alors que Yuan *et al.* (1999) ont recirculé le milieu de culture dans une colonne contenant des résines NKA-9 pour des cellules immobilisées de *Catharanthus roseus*. Tikhomiroff *et al.* (2002) ont développé un bioréacteur de deux phases liquides avec de l'huile de silicone recirculée afin d'extraire les alcaloïdes produits par des racines de *Catharanthus roseus*. Cette technique a eu pour effet de favoriser la production, induisant une augmentation des rendements en tabersonine (10-55 %) et löchnericine (20-65 %) pour des cultures élicitées.

### 1.5.8 Mode perfusé

Lorsque les cellules sont en suspension, la recirculation du milieu par une boucle externe contenant la phase d'adsorption devient complexe à mettre en oeuvre. En effet, la difficulté du procédé réside dans la séparation des cellules du milieu, de façon à conserver les cellules dans le réacteur. Il est ainsi nécessaire de concevoir des systèmes de perfusion. Plusieurs séparateurs cellules-milieu ont ainsi été développés pour les cellules de mammifères (Voisard *et al.*, 2003). Ces séparateurs sont basés sur différentes techniques de séparation : la filtration (Kawahara *et al.*, 1994), la centrifugation (Johnson *et al.*, 1996), la décantation (Batt *et al.*, 1990 ; Searles *et al.*, 1994 ; Hülscher *et al.*, 1992) et la méthode acoustique (Gorenflo *et al.*, 2003). Cependant, les cellules de

plantes ont des caractéristiques particulières qui empêchent l'utilisation directe de ces techniques. Différentes contraintes doivent être respectées pour le développement d'un séparateur : le volume sédimenté des cellules (SCV) élevé dans le cas des plantes en suspension qui peut atteindre 100 % (Jolicoeur *et al.*, 1992), la sensibilité au cisaillement (Doran, 2004) et la taille élevée des agrégats (Tanaka, 2000). La centrifugation a été une méthode rejetée d'emblée dans le cas des cellules de plantes car elle impose des cisaillements trop importants aux cellules sensibles. Des méthodes de filtration ont été développées pour retenir les cellules de plantes lorsque le volume est de petite échelle. Klvana *et al.* (2004) ont recirculé le milieu de culture par une boucle externe contenant une colonne de résines extractives, sans contact avec les cellules. Les alcaloïdes produits par *Eschscholtzia californica* en flacons agités (170 mL) ont été extraits par des résines XAD-7. Un grillage métallique de 40  $\mu\text{m}$  d'ouverture était utilisé pour filtrer les cellules à un taux maximum de dilution de 4,9  $\text{d}^{-1}$ . Une technique similaire de séparation a également été utilisée en flacons par Seki *et al.* (1997) pour *Taxus cupidata* à un taux maximum de dilution de 1,0  $\text{d}^{-1}$ . Le milieu frais était alimenté en continu, alors que les cellules étaient retenues par un grillage en nylon. Un filtre de type " spin " (rotatif) a été utilisé pour retenir les cellules *Podophyllum hexandrum* en suspension dans un bioréacteur (Chattopadhyay *et al.*, 2003). Le taux de dilution de 1,8  $\text{d}^{-1}$  était plus élevé que le taux spécifique maximum de croissance. Cependant, comme observé par Klvana *et al.* (2004), le gros problème des systèmes de filtration est la possibilité de colmatage du filtre lors d'un procédé à long terme. À notre connaissance, très peu de travaux sur le développement des bioréacteur à perfusion de cellules de plantes ont été

menés sans se baser sur le principe de filtration. Su *et al.* (1996, 2003) et Kim *et al.* (1991) ont développé des bioréacteurs perfusés plutôt basés sur la décantation des cellules, sans utiliser de membrane. Su *et al.* (1996) ont obtenu une efficacité de rétention cellulaire de 100 % pour un volume compacté de cellules (PCV) de 20 % alors qu'un taux de rétention nul a été obtenu lorsque le PCV était de 60 %, pour un taux de dilution de  $1.0 \text{ d}^{-1}$  dans un bioréacteur airlift contenant une zone de sédimentation des cellules délimitée par des chicanes. Récemment, Su et Arias (2003) ont reporté un taux de perfusion maximal de  $0.4 \text{ d}^{-1}$  avec une efficacité de rétention de 100 % pour un PCV de 60 % en utilisant une zone annulaire de sédimentation dans un bioréacteur agité.

Les recherches ont montré le grand intérêt d'utiliser une phase d'extraction pour retirer les métabolites secondaires en simplifiant les procédés de séparation et en diminuant la dégradation des métabolites secondaires. Le mode perfusé permet une séparation entre les cellules en suspension et le milieu. En couplant le réacteur perfusé à une colonne externe contenant la phase extractive, il devient ainsi possible d'extraire en continu les métabolites secondaires, de les conserver dans une colonne externe et d'ensuite alimenter le réacteur avec un milieu sans métabolites secondaires. Cependant, les travaux effectués en mode perfusé ont proposé des taux de dilution faibles. Lorsque le produit est instable, susceptible d'être transformé par les cellules ou possède des temps de demie-vie courts, le taux de perfusion doit être élevé afin d'éliminer le produit de la zone réactive. De plus, Klvana *et al.* (2004) ont suggéré que le taux de perfu-

sion de la boucle externe doit être équivalent ou plus élevé par rapport aux taux de production des cellules dans le milieu afin d'éviter les effets significatifs d'inhibition.

Un réacteur perfusé permet également d'alimenter en continu en milieu frais avec une rétention partielle ou totale des cellules. Cette méthode offre la possibilité d'alimenter les cellules et donc de les maintenir dans un état non-limitant ou non-inhibiteur. Un état physiologique optimisant la production pourrait ainsi être maintenu durant toute la phase de production.

## CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE

Durant tout le projet de maîtrise, les cultures se sont déroulées sous des paramètres opératoires identiques. Seules les conditions d'extraction des produits ont varié; des cultures se sont déroulées en absence de phase extractive, d'autres avec des résines en suspension dans le milieu, et finalement une culture a été réalisée avec des colonnes de résines externes. La description des différentes techniques utilisées lors d'une culture en bioréacteur sans résines et avec résines en suspension dans le milieu ont été résumées dans ce chapitre, ainsi que la méthode concernant la culture avec des résines dans une colonne externe. Afin de vérifier la reproductibilité une deuxième culture en mode perfusé a été réalisée. La méthode ainsi que les résultats de cette culture sont donnés en Annexe E.

La culture d'*Eschscholtzia californica* en flacons est décrite, tout comme la préparation de l'extrait de chitine. Les protocoles opératoires mis en Annexes B et C, ont été rédigés pour expliquer en détails chacune des étapes de la procédure pour la culture en bioréacteur et l'injection des résines. Dans les protocoles, les dimensions, le matériau, le fournisseur et numéro de catalogue sont donnés avec précision dans la section "matériel, réactifs et instruments". Dans ce chapitre, les méthodes et les principes des protocoles sont expliqués brièvement. Le tableau de prise de données des échantillons est mis en Annexe D.

## 2.1 Culture d'*Eschscholtzia californica* en flacons

Les cellules de plantes *Eschscholtzia californica* en suspension ont été maintenues en milieu liquide B5 standard (Gamborg *et al.*, 1968) contenant 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada; cat.#: G5767), 0.2 mg.L<sup>-1</sup> de 2-4 dichlorophenoxyacetic acid (Sigma-Aldrich; cat.#: D7299) et 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de kinetine (Sigma-Aldrich; cat.#: K0753). La composition précise du milieu est donnée au Tableau A.1. en annexe. Le pH du milieu a été ajusté à 5.6 avant la stérilisation par une solution de KOH (1M). Le milieu a été stérilisé (cycle liquide) à l'autoclave à 121 °C pendant 25 min sous une pression de 1 atm. Ensuite, la suspension (80 g) était transférée sous la hotte à flux laminaire stérile dans un flacon Erlenmeyer de 500 ml contenant le milieu de culture (170 g). Les cultures en suspension de 250 mL ont été sous-cultivées chaque 10-11 jours, lorsque le volume sédimenté de cellules atteignait 70-80 % du volume total après 5 minutes, sans agitation des flacons. Les flacons ont été maintenus à 130 rpm par un agitateur orbital, à une température de 25 °C ± 3 °C, sous des conditions normales d'éclairage de laboratoire.

## 2.2 Description du protocole PL-CULT-005 : Culture d'*Eschscholtzia californica* élicitée en suspension, en bioréacteur de 3-L

Cette procédure d'opération normalisée a pour objectif de définir la marche à suivre pour cultiver une suspension d'*Eschscholtzia californica* élicitée en bioréacteur de 3-L. Différentes étapes doivent être respectées afin de mener à bien une culture de cellules de plantes. Après avoir monté le bioréacteur, une stérilisation du système permet de travailler de façon aseptique. Après inoculation du bioréacteur, l'agitation, le contrôle d'oxygène ainsi que la circulation d'eau pour refroidir le condenseur sont activés. Après inoculation, le premier échantillon est rapidement pris, suivi des autres échantillons les jours suivants. Le plan expérimental décrivant avec précision les étapes à suivre pour la culture d'*Eschscholtzia californica* élicitée se retrouve dans le protocole mis en Annexe B.

### 2.2.1 Principes

L'inoculation du bioréacteur a été effectuée à partir de cellules âgées de 11 jours et provenant de cultures en flacons agités (section 2.1 : culture d'*Eschscholtzia californica* en flacons). La suspension cellulaire a été élicitée par ajout d'extrait de chitine au jour 4 pour induire le métabolisme secondaire et la production des alcaloïdes.

Les cultures se sont déroulées dans un bioréacteur en verre de 3-L d'un volume utile de 2.5-L composé d'un couvercle en acier inoxydable et d'une cuve en verre. Pour assurer un milieu homogène et éviter un déficit en oxygène, le bioréacteur a été agité mécaniquement par un double ruban hélicoïdal à 60 rpm dans le sens horaire (pompage vers le haut). De l'air enrichi en  $O_2$  a été alimenté dans le bioréacteur par un diffuseur poreux en acier inoxydable installé dans le fond de la cuve, qui a engendré des fines bulles de gaz. La concentration en oxygène, mesurée par une sonde immergée dans le milieu, a été maintenue à un minimum de 60 % (saturation en air) par un système de contrôle, pour une pression au détendeur de 15 psi (Aubry 1995 ; Sirois 1997). Le mélange gazeux était assuré par deux contrôleurs massiques. Sachant qu'en milieu industriel, la culture se déroulera toujours dans une cuve d'acier inoxydable (absence de lumière), le réacteur expérimental a été protégé des rayons lumineux. De cette façon la dégradation des alcaloïdes par la lumière a été évitée. La température était maintenue à  $25 \pm 2$  °C. Le bioréacteur a été stérilisé à l'autoclave (121 °C, 1 atm, 90 min) avec le milieu de culture (même composition que le flacon). La solution d'élicitation (voir plus bas) contenue dans un flacon a été stérilisée en même temps que le bioréacteur. Le rapport d'inoculation des cellules âgées de 11 jours des flacons agités était de 33 % (v.v<sup>-1</sup>), ce qui induit des concentrations initiales de biomasse d'environ 3.7 gDW.L<sup>-1</sup>. Les cellules ont été élicitées après 4 jours de culture avec une concentration d'extrait de chitine de 160 mL.L<sup>-1</sup> dans le bioréacteur. Les paramètres opératoires de la culture en bioréacteur sont résumés dans le Tableau 2.1.

Au niveau de l'aération, le maintien de la consigne en oxygène (60% saturation en air) a été assuré par un système de contrôle et d'acquisition de données. L'oxygène dissous a été mesuré par la sonde immergée dans le milieu de culture afin d'envoyer un signal au système d'acquisition. A partir de cette valeur, le contrôleur a envoyé une consigne de débit aux contrôleurs de débits massiques. Le programme de contrôle agit chaque minute de façon à respecter la consigne. Au départ, les valeurs initiales des contrôleurs massiques étaient de  $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  pour l'air et de débit nul pour  $\text{O}_2$ . Dans le cas, où la sonde montrait un déficit en  $\text{O}_2$  ( $< 60 \% \text{ sat. air}$ ), le programme était tel que le débit d'air augmentait jusqu'à la valeur maximale de  $200 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

- si le débit d'air atteignait  $200 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  et que la concentration d' $\text{O}_2$  n'était toujours pas suffisante, une ouverture du contrôleur massique d' $\text{O}_2$  se faisait tout en maintenant un débit total de  $200 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

- si le rapport débit d'air/ débit d' $\text{O}_2$  atteignait 50/50 et que la concentration d' $\text{O}_2$  n'était toujours pas suffisante, une augmentation du débit d'air se faisait jusqu'à la valeur maximale de  $400 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

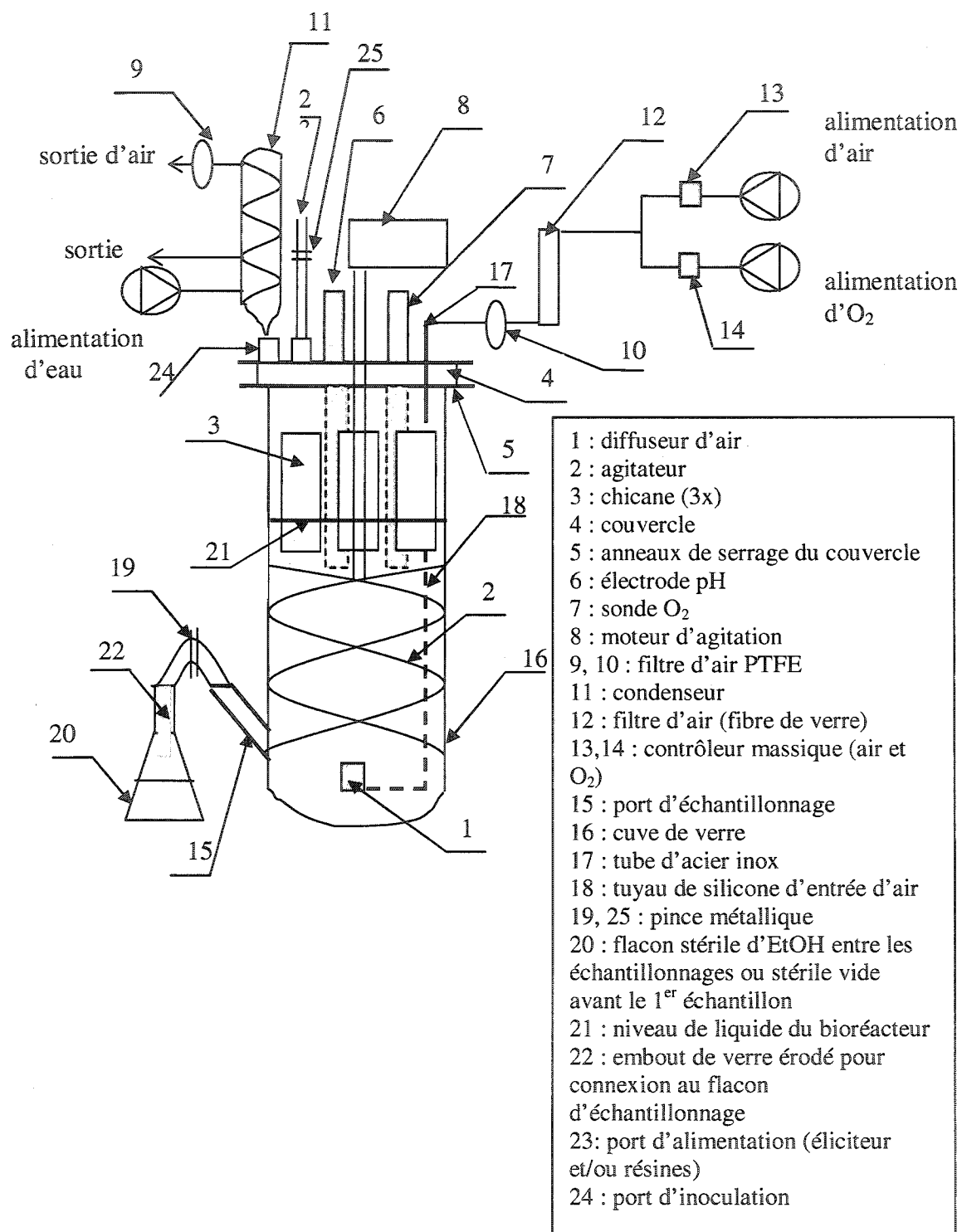
**Tableau 2.1** Conditions opératoires d'un bioréacteur d'*Eschscholtzia californica*

Paramètres de culture	Valeurs
Température	25 ± 2 °C
Pression d'alimentation	15 psi au détendeur
Vitesse d'agitation	60 rpm
Sens d'agitation	sens horaire (pompage vers le haut)
Luminosité	réduite (parois recouvertes)
Rapport d'inoculation	33 % v/v (cellules de 11 jours)
Élicitation	160 mL.L <sup>-1</sup> (jour 4)
Paramètre contrôlé	Valeur
O <sub>2</sub> dissous	60 % saturation d'air

Un échantillon de la suspension cellulaire était pris quotidiennement afin d'assurer le suivi des paramètres comme la biomasse (poids sec et humide), la production (mesure des alcaloïdes intra et extracellulaires), la nutrition (mesure des nutriments intra et extracellulaires) et le pH. Pendant 10 jours, l'évolution de la croissance et de la production en métabolites secondaires par les cellules de plantes a été suivie.

### **2.2.2 Description du bioréacteur**

Le montage du bioréacteur était constitué de 5 systèmes principaux : alimentation en air, agitation, condenseur, échantillonnage et élévation. La Figure 2.1 décrit la configuration de base du bioréacteur utilisé. Cette configuration respectait les rapports géométriques du bioréacteur développé par Jolicoeur *et al.* (1992).



**Figure 2.1** Montage du bioréacteur

### *Système d'alimentation en air*

La sonde O<sub>2</sub> (n°7 à la Figure 2.1) a été connectée au système de contrôle et d'acquisition de données. La calibration de la sonde se faisait par bullage d'azote (0% saturation en air) suivi d'un bullage d'air (100 % saturation en air). La calibration de la sonde O<sub>2</sub> devait être réajustée dans le réacteur après stérilisation de celui-ci. Pour l'alimentation en air, le tuyau d'entrée d'air (n°18) était connecté au diffuseur d'air poreux (n°1) installé au fond du bioréacteur. Un contrôleur de débit massique d'air ajustait le débit d'air et un autre contrôleur massique O<sub>2</sub> ajustait le débit d'O<sub>2</sub> selon les consignes du contrôleur. Les alimentations d'air et d'O<sub>2</sub> ont été connectées ensemble dans un tuyau pour assurer un mélange avant l'entrée du bioréacteur. Afin d'injecter un gaz pur, un tube cylindrique rempli de fibre de verre (n°12) servant de pré-filtre aux gaz et un filtre absolu PTFE (n°9, n°10) ont été ajoutés à l'entrée et à la sortie du réacteur, respectivement. Les deux contrôleurs massiques ont été préalablement calibrés à l'aide d'un débitmètre.

Du lubrifiant a été déposé sur le joint d'étanchéité du couvercle du bioréacteur. Pour vérifier l'étanchéité de l'ensemble du système, de l'air était injecté avec la sortie bloquée par une pince métallique. Dans le cas où le débit d'air, mesuré à la sortie était non nul, de l'eau savonneuse était injectée sur les connexions afin de détecter les fuites de gaz. La pression maximale imposée lors du test d'étanchéité était de 5 psi.

### *Système d'agitation*

Le moteur (n°8), le contrôleur de vitesse d'agitation, le ruban et l'arbre d'agitation du bioréacteur ont assuré l'agitation du mélange. La vitesse d'agitation a été fixée à l'aide d'un stroboscope. Les 3 chicanes ont été placées sur le couvercle en respectant l'orientation optimale de 10° par rapport au rayon (Jolicoeur *et al.*, 1992).

### *Système de condensation*

Le condenseur (n°11) alimenté en eau froide et placé à la sortie des gaz du réacteur a permis de retenir l'humidité des gaz de sortie dans le réacteur. De l'eau froide (environ 10 °C) circulait au sein du condenseur pour le maintenir refroidi. Un filtre PTFE (n°9), connecté au condenseur assurait une légère surpression dans le bioréacteur (~1-2 psi) et prévenait la contamination.

### *Système d'échantillonnage*

Le port d'échantillonnage (n°15), à 45 ° d'inclinaison, a été préalablement conçu (Jolicoeur *et al.*, 1992) afin de minimiser l'accumulation de cellules. Un tuyau en plastique assurait une connexion entre le port d'échantillonnage et l'embout de verre érodé. Cet embout érodé permettait une connexion aseptique avec un flacon d'échantillonnage. Une pince métallique (n°19) a maintenu le tuyau fermé. Après le

premier échantillonnage, l'embout de verre a été trempé dans un flacon stérile d'éthanol (n°20) entre les échantillonnages.

### *Système d'élicitation*

Un flacon contenant 400 mL de la solution d'extrait de chitine a été connecté par un tuyau de silicone sur un port d'alimentation du couvercle (n°23). Le tuyau a été maintenu fermé par une pince métallique. Le flacon d'élicitation a donc été stérilisé en même temps que le bioréacteur. Lors de l'élicitation, l'ajout de cette solution au bioréacteur a été assuré par une pompe péristaltique.

### *Calibrations et précautions à prendre*

Avant la culture, le couvercle (n°4), la cuve du bioréacteur (n°16), les chicanes (n°3) et le ruban hélicoïdal (n°2) ont été lavés au savon et rincés abondamment à l'eau distillée. La cuve en verre était entourée de deux couches de papier aluminium pour protéger le réacteur des rayons lumineux. De plus, des courroies d'attaches à crans d'arrêt ont été posées sur chaque tuyau pour éviter une déconnexion en cours de stérilisation ou de culture qui aurait pour effet d'annuler les conditions aseptiques.

### 2.2.3 Stérilisation

Un volume de 1667 mL de milieu de culture (même composition que les flacons) a été introduit dans le bioréacteur afin de stériliser ce milieu de culture en même temps que le bioréacteur. Le condenseur entouré de papier aluminium, n'a pas été stérilisé dans son embouchure, mais séparément du bioréacteur. L'inoculation du bioréacteur s'est faite par injection des cellules dans l'embouchure prévue pour le condenseur (n°24). Un entonnoir a été introduit dans l'embouchure pour la phase d'inoculation. Un couvercle de boîte de Petri en verre a ensuite été placé sur l'entonnoir, le tout était enveloppé de papier aluminium. Du coton a été introduit dans l'embout de verre du port d'échantillonnage et l'entrée du condenseur. Le coton a ensuite été entouré d'emballage plastique, suivi de papier d'aluminium. Le bioréacteur et le condenseur ont été stérilisés en même temps, à l'autoclave pendant 90 min (cycle liquide) à 121 °C, 11 atm. Après la stérilisation à l'autoclave, le réacteur était amené encore chaud sous la hotte stérile. La sonde d'O<sub>2</sub> a été rapidement branchée afin de la polariser avant l'inoculation.

### 2.2.4 Inoculation

L'inoculation se déroulait sous la hotte à flux laminaire, pour conserver l'asepsie. Après avoir stérilisé la surface de travail avec l'éthanol 70 % v/v, le papier aluminium de l'entonnoir a été enlevé tout en maintenant le couvercle de boîte de Petri sur l'entonnoir. Quatre flacons contenant la suspension cellulaire âgée de 11 jours ont

été pesés et chaque col passé au bec Bunzen de façon à travailler aseptiquement. Après avoir soulevé le couvercle de boîte de Petri bouchant l'entonnoir, la suspension contenue dans les 3 premiers flacons a été introduite par l'entonnoir. Ces flacons ont été pesés de façon à connaître la quantité de suspension introduite dans le bioréacteur ( $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ). De façon à obtenir un volume de 833 mL de suspension cellulaire dans le bioréacteur, la quantité de cellules introduite pour le dernier flacon était de 833 g - ( $m_1 + m_2 + m_3$ ) g de suspension. Après introduction de la suspension cellulaire, l'embout du condenseur a été chauffé au bec Bunzen et introduit rapidement dans l'embouchure. Le bioréacteur a pu donc être retiré de la hotte stérile et mis en route.

#### **2.2.5 Mise en fonctionnement**

La pression aux détendeurs d'alimentation d'air, ainsi qu'au niveau de la bonbonne d' $O_2$  ont été ajustés à 15 psi afin de contrer les pertes de charge. Une consigne de  $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  pour les deux contrôleurs massiques a été imposée au démarrage. La circulation d'eau pour le système de condensation a été mise en route. Le moteur d'agitation a été lancé à une vitesse de 60 rpm dans le sens de rotation horaire (pompage du liquide vers le haut). La calibration de la sonde  $O_2$  a ensuite été réajustée.

#### **2.2.6 Échantillonnage**

Après l'inoculation, le premier échantillon a été prélevé rapidement. En condition aseptique, le papier d'aluminium du flacon était retiré sous la flamme d'un bec Bunsen et le col du flacon était passé à la flamme. La pince métallique était desserrée et un volume de 30 mL de suspension cellulaire, suffisant pour les analyses ultérieures, a été collecté dans le flacon. Le volume ne pouvait pas être supérieur afin d'éviter de perturber la culture. De plus, il était impératif que le volume du liquide soit suffisant pour que la sonde d'O<sub>2</sub> baigne dans le liquide tout au long de la culture. La pince métallique a ensuite été resserrée et le port d'échantillonnage a été introduit dans un flacon d'éthanol pour conserver l'asepsie. Lors des prochains échantillons, l'utilisateur a dû souffler dans le filtre 0.2 µm du flacon d'échantillonnage afin de remettre en suspension les cellules déposées sur les parois du tube d'échantillonnage.

### 2.2.7 Élicitation

Au jour 4, la solution de l'agent éliciteur était introduite dans le bioréacteur. Le tuyau du flacon d'alimentation a été introduit dans la tête de pompe. La pince métallique fermant le tuyau a ensuite été ouverte pour permettre à la solution d'être pompée dans le réacteur.

## 2.3 *Bioréacteur perfusé*

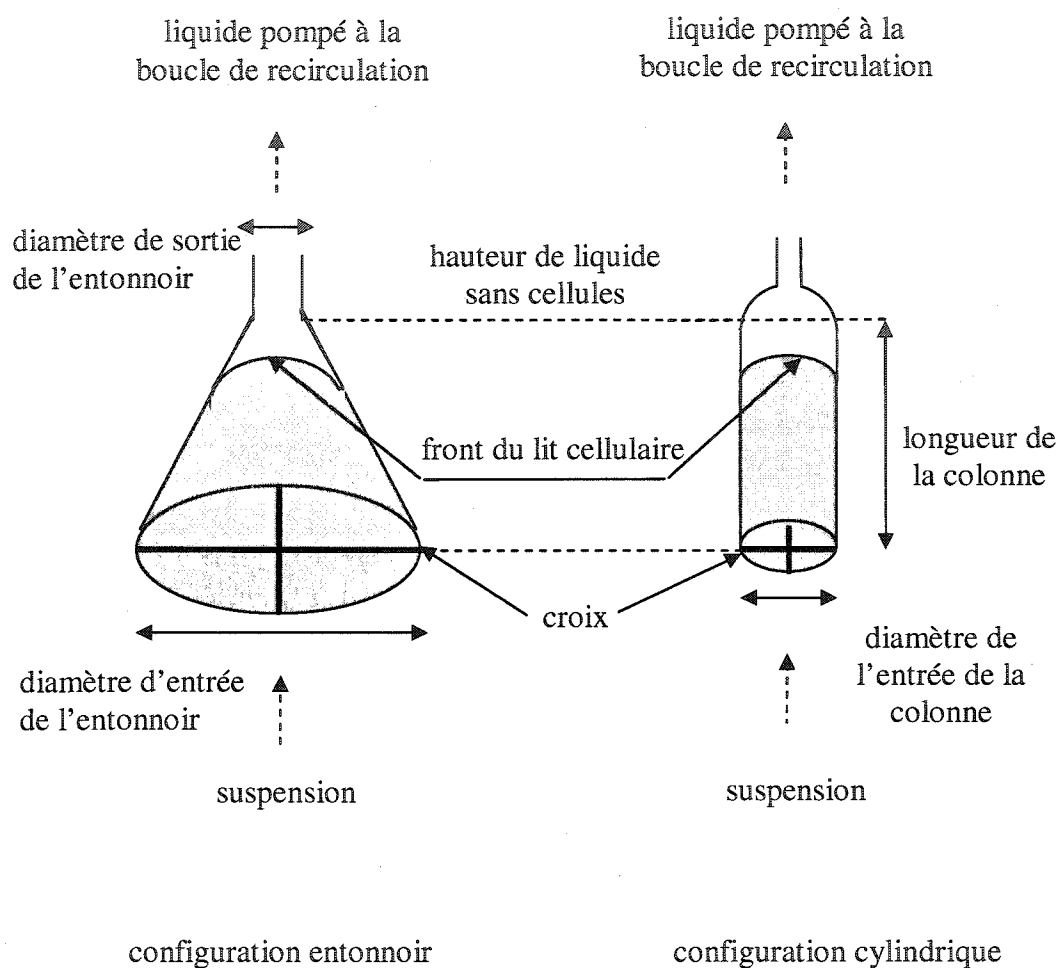
Les études portant sur la vitesse de sédimentation des cellules et sur le dispositif de séparation ont été réalisées sous conditions non aseptiques et non élicitées. Les suspensions cellulaires utilisées étaient fraîches et provenaient de cultures de flacons agités. Les expériences ont été réalisées avec une suspension donnée pour une période maximum d'un jour de façon à éviter le biais de la contamination.

### 2.3.1 Vitesse de sédimentation des cellules de plantes

La vitesse de sédimentation a été déterminée en mesurant la vitesse à laquelle le front de sédimentation a progressé avec le temps (Figure 2.4.B). Le front de sédimentation a été défini comme l'interface entre le lit de cellules et le liquide libre de cellules. Une suspension cellulaire de 100 mL provenant des cultures de flacons agités a été placée dans une éprouvette en verre de 28 mm I.D. Le volume de cellules sédimentées (SCV) était déterminé lors de la stabilisation du front de sédimentation, ce qui prenait de 20 à 60 minutes. Le SCV (en %) a été calculé comme le rapport du volume de cellules sédimentées  $V_{\text{sed}}$  divisé par le volume de suspension initial  $V_0$  de 100 mL.

### 2.3.2 Configuration du dispositif de sédimentation

Quatre dispositifs de séparation cellules/milieu ont été évalués pour leur efficacité de séparation (Figure 2.2). Les sections d'entrée des dispositifs ont été immergées dans 3 cm d'une suspension cellulaire mise dans un contenant en polypropylène (165 mm x 85 mm I.D.) équipé d'un double ruban hélicoïdal respectant les rapports géométriques du bioréacteur de 3-L. L'agitation ne pouvait dépasser 30 rpm (pompage vers le bas ou vers le haut) autrement le front de sédimentation était instable avec le temps. Le volume initial du contenant était de 650 mL et le niveau liquide a été conservé au niveau initial par ajout de suspension lorsque nécessaire (par ex. en remplissant la boucle de recirculation). Le liquide a été pompé (pompe péristaltique, Masterflex, Labcor, Anjou, QC, Canada; cat.#: A77521) à la sortie du dispositif de séparation et recirculé dans le récipient. A la sortie des dispositifs de séparation, le liquide était échantillonné et centrifugé pendant 5 minutes (16 000 g) et le DW du résidu mesuré, représentant les cellules et les débris emportés dans la boucle de recirculation. Le dispositif de configuration A était un entonnoir (hauteur 25 mm, diamètres internes d'entrée et de sortie 38 mm et 20 mm) et les dispositifs de configuration B, C et D étaient des colonnes cylindriques de différents diamètres et hauteurs (B : 90 mm x 26 mm I.D.; C : 90 mm x 31 mm I.D.; D: 165 mm x 41 mm I.D.). Tous les dispositifs ont été évalués avec ou sans croix installée à leur entrée. La croix était utilisée pour diminuer les vortex et les oscillations du liquide et consistait en une feuille de polystyrène de 1 mm avec une hauteur de 10 mm.



**Figure 2.2** Différentes configurations pour le dispositif de séparation cellules/milieu. Le dispositif A était un entonnoir (hauteur 25 mm, diamètres internes d'entrée et de sortie 38 mm et 20 mm), le dispositif B (90 mm x 26 mm I.D.), C (90 mm x 31 mm I.D) et D (165 mm x 41 mm I.D.) étaient des colonnes cylindriques. Tous les dispositifs ont été testés avec et sans croix en polystyrène (10 mm de hauteur, 1 mm d'épaisseur) installées à leur section d'entrée.

Pour la colonne D, un plus grand contenant de polypropylène de 145 mm x 105 mm a été utilisé avec un volume initial de suspension de 1000 mL. Le même agitateur que celui du plus petit récipient (650 mL) a été utilisé et fixé à une vitesse rotationnelle de 60 rpm (pompage vers le bas ou le haut).

### **2.3.3 Configuration des colonnes d'extraction**

Les colonnes d'extraction contenant des résines fluidisées ont été conçues sur base de la vitesse de sédimentation des cellules du bioréacteur. La configuration du lit compacté a montré une grande susceptibilité à l'obstruction provoquée par l'accumulation de débris de cellules. La fluidisation permet alors aux débris de cellules de passer librement au travers du lit fluidisé de résine. De cette façon, les effets de surpression dans les tuyauteries qui pourraient survenir dû à l'accumulation de débris sont réduits. Les colonnes de résine ont ainsi été conçues afin de garder les résines fluidisées pendant la durée de la culture. Les vitesses de sédimentation étant fixées par les cellules, les différents diamètres des colonnes de résines ont été alors déterminés pour la culture perfusée. Pour maintenir la vitesse de fluidisation constante dans les colonnes de résine malgré la vitesse de sédimentation variable, le diamètre des colonnes devait aussi changer avec le temps. Expérimentalement, la vitesse de fluidisation des résines XAD-7 a été mesurée à  $70 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Trois colonnes de différents diamètres ont ainsi été sé-

lectionnées: colonne I (26 mm I.D.) pour le jour 4, 5 et 6, colonne II (17 mm I.D.) pour les jours 7 et 8 et la colonne III (13 mm I.D.) pour le jour 9.

#### **2.3.4 Détermination du $K_La$ du bioréacteur perfusé**

Différentes conditions d'aération et d'agitation ont été évaluées pour étudier le transfert dans le bioréacteur rempli d'eau. L'agitation a été testée aux vitesses de 45 rpm et à 60 rpm dans le sens anti-horaire (pompage vers le bas) et dans le sens horaire (pompage vers le haut).

#### **2.3.5 Culture dans le bioréacteur perfusé**

La culture est réalisée dans le bioréacteur de 3-L, décrit rigoureusement dans la section précédente, pourvu d'un dispositif de perfusion et de recirculation du milieu (Figure 2.3 et Figure 2.4). Toutes les conditions opératoires sont les mêmes par rapport au réacteur non perfusé, excepté certaines différences décrites ici. Dans le cas du bioréacteur perfusé, le diffuseur poreux ne se trouve pas au fond de la cuve mais à 6 cm en dessous du niveau de liquide. Le volume utile était de 2.5-L pour toutes les cultures non perfusées, par contre pour le bioréacteur perfusé, le volume total était de 3.2-L avec un volume mort de 860 mL. La vitesse de rotation était de 40 rpm (pompage vers le bas) au lieu de 60 rpm (pompage vers le haut).

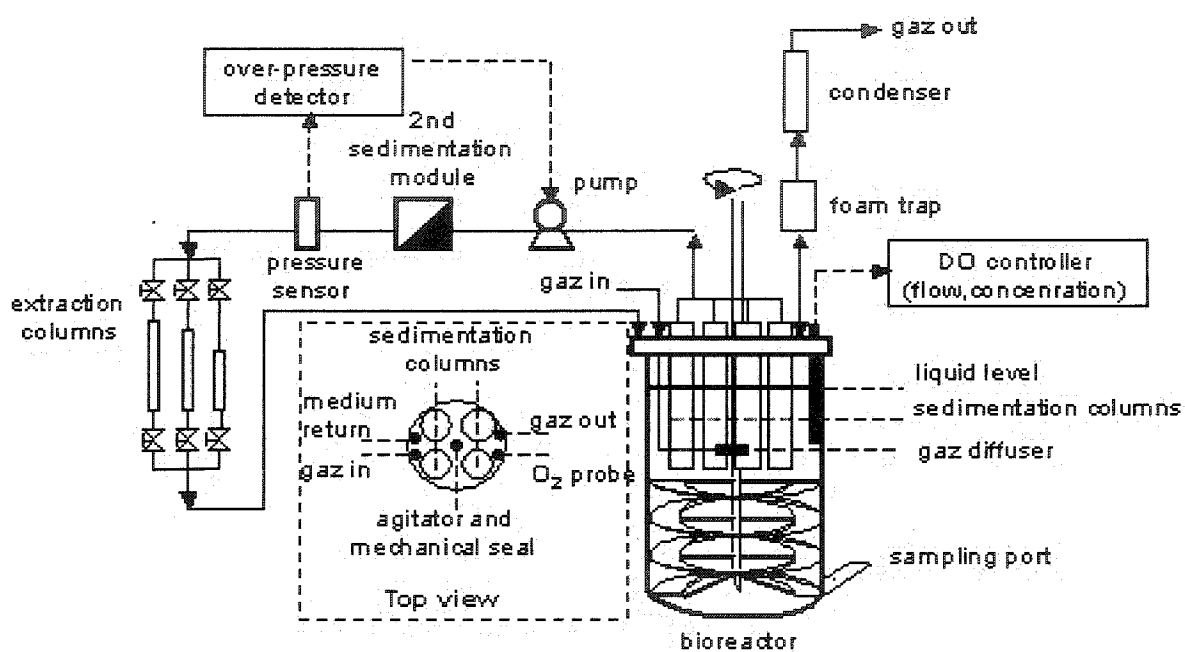
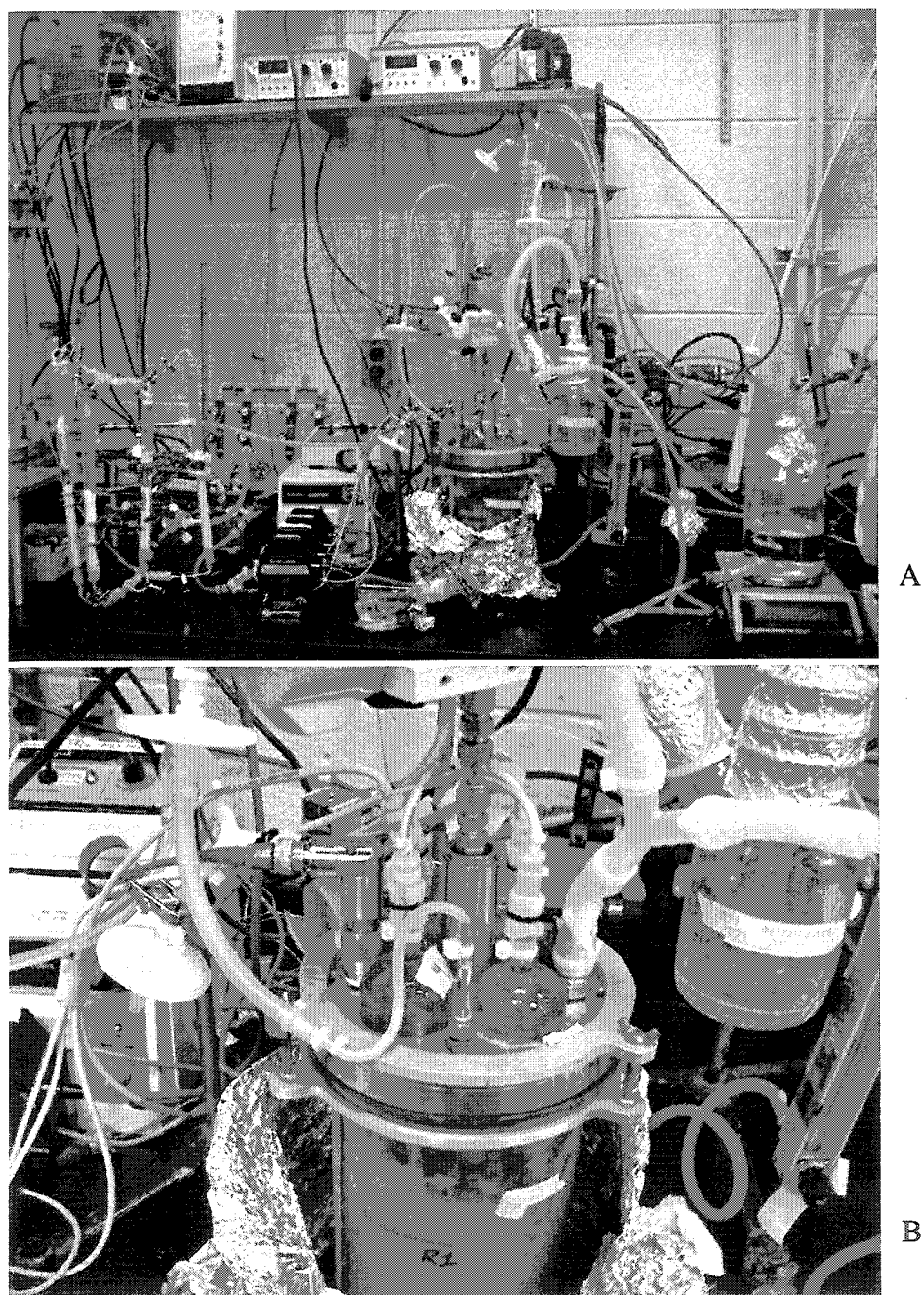


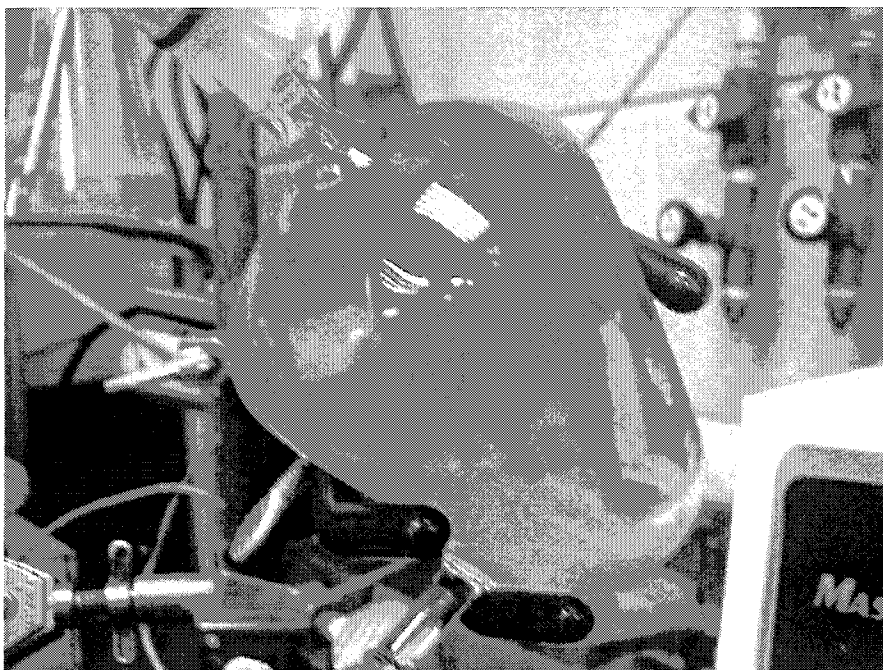
Figure 2.3 Bioréacteur connecté au système de perfusion



**Figure 2.4** Photographies du système perfusé (A) et du bioréacteur de 3-L pourvu de quatre colonnes de sédimentation (B).

Au niveau de l'inoculation, le ratio était plus élevé 47 % (v/v), comparé à 33 % (v/v), afin de respecter les dilutions importantes dans le bioréacteur perfusé. La concentration initiale de biomasse était de  $5.1 \text{ gDW.L}^{-1}$ . Au jour 4, le milieu frais (690 mL) et la solution de chitine (540 mL) étaient ajoutés pour remplir le volume du bioréacteur (2320 mL) ainsi que le volume mort (860 mL). Après élicitation (le jour 4), le milieu a été recirculé par quatre têtes de pompe péristaltique (Masterflex; cat.#: 77390-00) à travers quatre dispositifs de séparation (type D avec une croix d'acier inoxydable d'une hauteur de 10 mm), chacun se composant d'une colonne cylindrique qui sépare le milieu des cellules par sédimentation. Les sections d'entrée des colonnes étaient situées à 7 cm sous la surface moyenne du liquide. Les quatre tuyaux de 1.6 mm I.D. étaient raccordés ensemble après la pompe à un tube commun de 6 mm I.D. menant au module de deuxième étape de sédimentation, inséré avant les colonnes de résine XAD-7. Le module de rétention a été un décanteur configuré pour retenir un maximum de particules flottantes et sédimentées (Figure 2.5). Chaque colonne de résine a été utilisée alternativement, avec les résines maintenues dans un état de fluidisation. Avant de les insérer dans les colonnes, les résines ont été préalablement conditionnées comme expliqué par après (section 2.5). Le milieu sans cellules sortant du système de perfusion a été recirculé ( $45 \text{ mL.min}^{-1}$ ) au jour 4, 5 et 6 dans la colonne Nalgene I (185 mm x 26 mm I.D.), contenant 29.8 g de résines XAD-7. L'écoulement a alors été transféré manuellement vers la colonne II (240 mm x 17 mm I.D.) contenant 23.6 g de résines, pour la recirculation au jour 7 et 8 à  $16 \text{ mL.min}^{-1}$ . Au jour 9, la recirculation ( $11 \text{ mL.min}^{-1}$ ) a été faite au travers de la colonne III (330 mm x 13 mm I.D.), contenant 17.4 g de résines. Un

grillage en acier inoxydable de 45  $\mu\text{m}$  d'ouverture (les Laboratoires de Spectre, le Ranch Dominguez, CA, USA) a été utilisé comme écran pour retenir les résines à l'intérieur des colonnes. Une sonde de pression (Dynisco, York Nord, ON, Canada) a été utilisée pour mesurer la pression à l'entrée des colonnes de résine. Quand une augmentation de pression de 0.5 atm était observée, la recirculation a été automatiquement interrompue. Un piège à mousse a été installé avant le condenseur pour retenir les cellules entraînées par l'écoulement d'air de sortie. La mousse piégée a été régulièrement reinjectée dans le bioréacteur. Un volume de 1 mL d'anti-mousse (Mazu, BASF Corporation, Gurnee, IL, USA) a été injecté dans le réacteur à perfusion juste après l'élicitation.



**Figure 2.5** Photographie du module de rétention des particules provenant des colonnes de sédimentation du bioréacteur

## 2.4 *Préparation de l'extrait de chitine*

Afin d'induire la phase de production, une solution de chitine a été injectée 4 jours après le démarrage du bioréacteur. Pour préparer l'extrait de chitine ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ), la chitine a été moulue au pilon et diluée dans le milieu de culture B5 (même composition que les flacons). Pour assurer une bonne dilution de la chitine, la poudre était moulue en 2 fois. La solution était autoclavée pendant 30 min (cycle liquide) à  $121^\circ\text{C}$  et refroidie sous agitation par un barreau magnétique. Ensuite, la solution refroidie était filtrée sur deux couches de tissus Miracloth sous vide. Le matériel et la méthode pour la préparation de l'extrait de chitine sont donnés précisément à la procédure opératoire normalisée (PON) en Annexe B.

## 2.5 *Description du protocole PL-CULT-006 : Injection de résines XAD-7 dans une suspension d'*Eschscholtzia californica* élicitée en bioréacteur de 3-L*

Cette procédure d'opération a pour objectif de définir la marche à suivre pour conditionner et injecter des résines contenues dans une solution élicitrice à une suspension d'*Eschscholtzia californica* en bioréacteur. Les métabolites secondaires ont été extraits de la culture grâce à l'adsorption des résines neutres polymériques XAD-7,

ajoutées dans le bioréacteur. Le plan expérimental décrivant avec précision les étapes à suivre pour la préparation et l'addition des résines se retrouve en Annexe C.

Afin de conditionner les résines, celles-ci ont été immergées pendant un minimum de 24 h dans du méthanol. Elles ont ensuite été rincées 4 fois à l'eau déionisée pour enlever toute trace de méthanol. Enfin, uniquement la fraction des résines de grands diamètres ( $>400\text{ }\mu\text{m}$ ) était conservée pour les expériences. Les résines trop fines ont été éliminées par filtration sous gravité sur un grillage nylon de  $400\text{ }\mu\text{m}$  d'ouverture. Les résines ont ensuite été conservées dans un flacon rempli d'eau déionisée.

La solution composée des billes de résines XAD-7 et de l'agent éliciteur (la chitine) était contenue dans le flacon d'alimentation et stérilisée en même temps que le bioréacteur. Cette solution a été injectée après 4 jours de culture. La solution était préparée de façon à obtenir dans le bioréacteur une concentration de  $50\text{ g.L}^{-1}$  en résines, et de  $160\text{ mL.L}^{-1}$  d'extrait de chitine. Le mode opératoire d'injection est équivalent au protocole PL-CULT-005 (Culture d'*Eschscholtzia californica* élicitee, en suspension, en bioréacteur de 3-L).

## 2.6 Analyses

Pendant les 10 jours de culture, un échantillon de suspension cellulaire (30-50 mL) a été prélevé stérilement chaque jour, de préférence aux mêmes heures. Les échantillons prélevés quotidiennement ont été soumis à différentes analyses: pH, poids humide, poids sec, nutriments extracellulaires (Cl, PO<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, Ca, Mg, Na, NH<sub>4</sub>, K, glucose, fructose, sucrose), nutriments intracellulaires (Cl, PO<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, Ca, Mg, Na, NH<sub>4</sub>, K, glucose, fructose, sucrose), alcaloïdes extracellulaires (sanguinarine, chelerythrine, chelilutine, macarpine, chelirubine), alcaloïdes intracellulaires (sanguinarine, chelerythrine, chelilutine, macarpine, chelirubine), alcaloïdes adsorbés par les résines (sanguinarine, chelerythrine, chelilutine, macarpine, chelirubine).

Le poids humide des cellules a d'abord été obtenu par filtration de 10 mL de suspension cellulaire à travers un filtre papier Whatman (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA; cat.#: 09874-48) sous vide. L'échantillon a été mis dans un four à 60 ° C pendant 24 heures pour la mesure du poids sec. Afin d'obtenir des cellules lyophilisées, les cellules humide ont été évaporées sous vide afin de les assécher (Dura-Top FTS Systems, Bulk Tray Dryer, NY, USA) pendant 24 heures à -5 ° C et -97 kPa.

### *Hydrates de carbone*

10 mg de biomasse lyophilisée ont été lavés trois fois par de l'éthanol 80 %, suivi chaque fois par 15 minutes de sonication. Ensuite, le surnageant a été centrifugé 5 minutes à 16 000 g et analysé par HPLC. Le milieu de culture a été filtré à 0.45 µm (Fisher Scientific; cat.#: 09-902-10) et analysé par HPLC comme décrits plus loin. Les concentrations en glucose, fructose et sucrose ont été quantifiées en utilisant un système HPLC Beckman Coulter (pompe modèle 126, auto-sampler modèle 508) et un détecteur à indice de réfraction (ERC-7515-A). Une colonne analytique carbohydrate ES Alltech prevail (250 mm x I.D de 4.6 mm, 5 µm) a été couplée à une colonne de garde carbohydrate ES Alltech prevail (7.5 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm) maintenue à 35 °C. La phase mobile était composée du solvant acétonitrile et d'eau 75:25 (v/v) pour un débit de 1.0 mL.min<sup>-1</sup> et un volume d'injection de 20 µL.

### *Ions*

10 mg de biomasse lyophilisée ont été lavés avec 1.5 mL d'acide trichloroacétique (5 %; w/v). La solution a été soniquée à 40 °C pendant 30 minutes et ensuite centrifugée 10 minutes à 16 000 g. Le surnageant a été analysé par HPLC. Le milieu de culture a été filtré à 0.45 µm (Fisher Scientific; cat.#: 09-902-10) et analysé par HPLC. Les concentrations des ions majeurs (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) ont été quantifiées en utilisant un système Dionex IC (AI-450) équipé par une pompe gradient, un détecteur électrochimique pulsé en mode conductivité et un auto-sampler

ThermoFinnigan AS-3500. Pour les anions, la séparation a été faite par une colonne analytique Dionex IonPac AS-14 (250 mm x 4 mm I.D., 9  $\mu\text{m}$ ) couplée à une colonne de garde Dionex IonPac AG-14 (50 mm x 4 mm I.D., 9  $\mu\text{m}$ ) et un supresseur ASRS-ultra (4 mm). La phase mobile était composée de 2mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / 1 mM  $\text{NaHCO}_3$  à un débit de 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. Pour les cations, l'analyse a été faite par une colonne analytique IonPac CS-12A (250 mm x 4 mm I.D., 8 $\mu\text{m}$ ), une colonne de garde IonPac CG-12A (50 mm x 4 mm I.D., 8 $\mu\text{m}$ ), et un supresseur CSRS-ultra II (4 mm). La phase mobile était composée d'une solution acide de 20 mM pour un débit de 0.9 mL.min<sup>-1</sup>.

### *Alcaloïdes*

40 mg de biomasse lyophilisée ont été extraits trois fois par 1.5 mL de méthanol acidifié (0.5 % HCl, v/v), suivi chaque fois par 15 minutes de sonication. Le surnageant a été centrifugé 10 minutes à 16 000 g, évaporé sous vide et resuspendu dans 400  $\mu\text{L}$  de méthanol acidifié (0.5 % HCl, v/v) pour les analyses de HPLC. La concentration d'alcaloïdes extracellulaires dans le milieu a été déterminée par une extraction phase solide sur des colonnes Phenomenex Strata C<sub>18</sub>-E (capacité de 3 mL, packing de 300 mg). Le conditionnement de la colonne a été fait par ajout de 3 mL de méthanol acidifié (0.5 % HCl; v/v) suivi de 3 mL d'eau distillée. Le milieu (10 mL) a été injecté et ensuite, 3 mL de la solution de méthanol acidifié 10 % (v/v) a été appliqué pour nettoyer la colonne. L'élution finale a été faite avec 1 mL de méthanol acidifié (0.5 % HCl; v/v). La solution a été filtrée (0.45  $\mu\text{m}$ , PTFE membrane, VWR; cat.#:28143-981)

avant les analyses par HPLC. Après la séparation par sédimentation de la biomasse, les résines ont été rincées dans l'eau distillée. Le contenu dans les résines a été extrait 5 fois dans 10 mL de méthanol acidifié (0.5 % HCl; v/v). Le volume a été ajusté à 50 mL avec du méthanol acidifié (0.5 % HCl; v/v). Pour analyser le contenu en alcaloïde des colonne de résines, la totalité des résines a été extraite 5 fois avec 60 mL de méthanol acidifié (0.5 % HCl; v/v). Le volume a été ajusté à 300 mL avec du méthanol acidifié (0.5 % HCl; v/v). La solution (1 mL) de chaque échantillon a été filtrée (0.45  $\mu$ m, PTFE membrane, VWR; cat.#:28143-981) avant l'analyse par HPLC.

L'analyse des alcaloïdes (intracellulaires, extracellulaires et adsorbés sur résines) a été réalisée par un système HPLC Beckman Coulter (pompe modèle 126, auto-sampler modèle 508). Les molécules de sanguinarine, de chelerythrine et de chelirubine ont été quantifiées par le détecteur à fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 330$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 570$  nm, modèle Jasco FP-1520) et de macarpine et de chelilutine ont été quantifiées par PDA (341 nm, modèle Beckman Coulter 168). Une colonne analytique Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm I.D.; 5  $\mu$ m) a été couplée à une colonne de garde Securiguard C<sub>18</sub> (35°C), pour un débit de 1.5 mL.min<sup>-1</sup> et un volume d'injection de 20  $\mu$ L. La phase mobile était composée du solvant 50mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3 ajusté avec KOH) et acétonitrile injecté par gradient de concentration.

### CHAPITRE 3: RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, un bioréacteur perfusé incorporant un système efficace de séparation cellule/milieu a été développé. Ce bioréacteur a été couplé à 3 colonnes externes de résines polymériques, utilisées à tour de rôle, afin de recirculer à haut taux de dilution le milieu et extraire en continu les métabolites produits. L'étude hydrodynamique a été réalisée pour déterminer les conditions opératoires qui permettent d'obtenir un front stable de séparation des cellules et du milieu. Les cellules en suspension de *Eschscholtzia californica* ont été utilisées comme modèle pour la production des alcaloïdes. La croissance et la production des cellules ont ainsi été étudiées afin de valider le système.

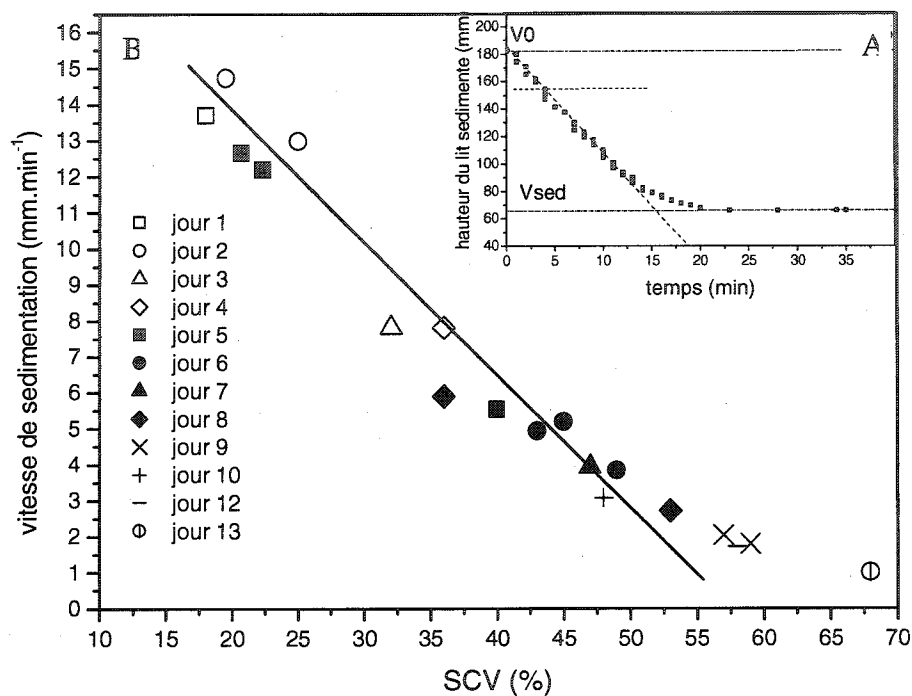
Deux cultures ont été réalisées afin de pouvoir comparer les différentes conditions opératoires. Pour chacune des cultures, deux bioréacteurs ont été menés en parallèle: un bioréacteur test et un bioréacteur utilisé comme contrôle. Pour la première culture, les deux bioréacteurs ont été élicités au jour 4 et au même moment des résines de XAD-7 ( $50 \text{ g.L}^{-1}$ ) ont aussi été ajoutées au bioréacteur de test. Pour la deuxième culture, le bioréacteur de test était en mode perfusé avec recirculation du milieu à partir du jour 4 dans la colonne de résines. Dans le bioréacteur de contrôle, des résines XAD-7 ( $60 \text{ g.L}^{-1}$ ) ont été ajoutées dans la suspension au jour 4, avec des concentrations similaires au bioréacteur de contrôle de la première culture. Afin de pouvoir comparer les

résultats, le bioréacteur de contrôle a été agité à une vitesse de 40 rpm (sens anti-horaire), contrainte de vitesse imposée au bioréacteur perfusé.

### 3.1 *Étude de la séparation milieu/cellules de plantes*

#### 3.1.1 **Relation entre la vitesse de sédimentation et le SCV de la suspension**

La séparation cellule/milieu est fondée sur le principe de sédimentation. Etant donné qu'il a été précédemment observé que la porosité d'un lit de cellules évolue avec l'âge de la culture et peut varier en fonction de la sous-culture, le paramètre volume sédimenté des cellules (SCV) a été préféré à la matière sèche (DW) pour qualifier la sédimentation des cellules. La vitesse de sédimentation a été déterminée dans la région linéaire décroissante du graphe de la hauteur du lit de cellules en fonction du temps ( $SD=0.7\%$ ,  $R^2=99.6\%$ ) (Figure 3.1.A). Il a été observé que la vitesse de sédimentation des cellules décroît linéairement avec le SCV de la suspension (Figure 3.1.B). Néanmoins, une augmentation de la densité cellulaire peut causer des effets stériques et hydrodynamiques, ce qui influence la sédimentation des cellules. Pour un SCV supérieur à 55 %, cet effet stérique/hydrodynamique semble devenir important et la vitesse de sédimentation diminue alors plus lentement avec l'augmentation du SCV.



**Figure 3.1** Étude de la vitesse de sédimentation dans une éprouvette en verre de 100 mL de suspensions provenant de flacons agités. Vitesse de sédimentation en fonction du SCV (A), et profil de sédimentation en fonction du temps pour une suspension âgée de 4 jours (B).

Les résultats de la Figure 3.1.B montrent aussi que l'âge des cellules n'est pas un paramètre fiable pour la prédiction de la vitesse de sédimentation d'une suspension de cellules. Le poids sec des cellules est également un paramètre à rejeter pour mesurer la sédimentation. En effet, les cellules possèdent une même vitesse de sédimentation le jour 3 et le jour 4 alors que leurs poids secs sont nettement différents ( $5.4 \text{ g.L}^{-1}$  et  $7.2 \text{ g.L}^{-1}$ ). Il est évident que la vitesse de sédimentation des cellules évolue avec le temps de culture et il faudra donc que la vitesse de pompage de la suspension à travers les dispositifs de séparation cellules/milieu soit changée au cours du temps.

### 3.1.2 Conception du dispositif de séparation

Deux configurations de dispositifs de séparation cellules/milieu ont été étudiées: une configuration de type conique (un entonnoir, type A) et une configuration de type cylindrique (types B, C et D). Les effets de la vitesse de pompage ainsi que de la géométrie et de la taille du système sur l'établissement d'un front stable de séparation cellules/milieu ont été examinés dans un contenant pourvu d'un agitateur. La configuration A a été étudiée à cause de la réduction linéaire de sa section d'entrée. Immersée dans une suspension de cellules contenant  $240 \text{ gWW.L}^{-1}$  (vitesse de sédimentation de  $1.5 \text{ mm.min}^{-1}$ ), le flux de sortie en régime permanent contenait  $40 \text{ gWW.L}^{-1}$  en pompant à  $1 \text{ mL.min}^{-1}$  (vitesse de pompage de  $0.9 \text{ mm.min}^{-1}$  à l'entrée). Malgré une vitesse du liquide à l'entrée du dispositif plus faible que la vitesse de sédimentation de la suspension, une mauvaise séparation a été constatée. Pour remédier au problème, l'ajout

d'une croix à travers la section d'entrée du dispositif a impliqué une diminution des turbulences induites par l'hélice du réacteur, turbulences empêchant l'établissement d'un front stable de séparation cellules/milieu. La concentration de cellules dans le flux de sortie en régime permanent a ainsi été réduite à  $10 \text{ gWW.L}^{-1}$  pour  $1 \text{ mL.min}^{-1}$  (vitesse de pompage de  $0.9 \text{ mm.min}^{-1}$ ). Néanmoins, le dispositif de type A a présenté une grande sensibilité à l'hydrodynamique du bioréacteur et a donc été rejeté. Le dispositif cylindrique de type B a permis l'amélioration du processus de séparation avec un flux de sortie contenant  $6 \text{ gWW.L}^{-1}$  pour un débit de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$  (vitesse de pompage de  $1.9 \text{ mm.min}^{-1}$ ) avec une suspension cellulaire similaire ( $240 \text{ gWW.L}^{-1}$ , vitesse de sédimentation de  $1.5 \text{ mm.min}^{-1}$ ). L'augmentation du diamètre interne de colonne à  $31 \text{ mm}$  (type C) au lieu de  $26 \text{ mm}$  (type B) a permis d'augmenter le débit de sortie. Trois suspensions cellulaires ayant des vitesses de sédimentation de  $5.5 \text{ mm.min}^{-1}$ ,  $4.8 \text{ mm.min}^{-1}$  et  $2.0 \text{ mm.min}^{-1}$  respectivement ont été utilisées et le débit a été ajusté pour avoir des vitesses du liquide égales aux vitesses respectives de sédimentation ( $4.1 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $3.6 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $1.5 \text{ mL.min}^{-1}$ ). La concentration cellulaire de sortie était alors de  $4 \pm 2 \text{ gWW.L}^{-1}$  dans toutes les conditions. Avec des débits supérieurs ( $5.6 \text{ mL.min}^{-1}$  ( $7.4 \text{ mm.min}^{-1}$ ),  $5 \text{ mL.min}^{-1}$  ( $6.6 \text{ mm.min}^{-1}$ ),  $3.1 \text{ mL.min}^{-1}$  ( $4.1 \text{ mm.min}^{-1}$ )), la stabilité du front n'a jamais été atteinte. Ces résultats montrent l'importance de pomper à une vitesse plus petite que la vitesse de sédimentation de façon à avoir un front de séparation stable. Les résultats sont repris dans le tableau 3.1. Ensuite, un dispositif de type D possédant un diamètre supérieur de  $41 \text{ mm}$  a été étudié. Différents débits ont également été testés sur différentes suspensions.

**Tableau 3.1** Comparaison des dispositifs de séparation

<b>Présence d'une croix</b>	<b>Type de colonne</b>	<b>Vitesse de sédimentation (mm.min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cellules entraînées (gWW.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vitesse de pompage (mm.min<sup>-1</sup>)</b>
Non	A	1.5	40	0.9
Oui	A	1.5	10	0.9
Oui	B	1.5	6	1.9
Oui	C	5.5	4 ± 2	4.1
Oui	C	4.8	4 ± 2	3.6
Oui	C	2.0	4 ± 2	1.5

Une séparation efficace ( $4 \pm 2 \text{ gWW.L}^{-1}$ ) a également été observée pour cette colonne travaillant à une vitesse de pompage équivalente à la vitesse de sédimentation des cellules. Le débit requis pour obtenir un front stable variait ainsi linéairement avec les diamètres de colonne de 26, 31 et 41 mm, ce qui supposait que l'effet des parois était négligeable dans le cadre de cette étude.

### 3.1.3 Modifications de conception du bioréacteur

Un ensemble de 4 colonnes de type D (165 mm x 41 mm I.D.) a été sélectionné et a joué également le rôle de chicanes de surface (Jolicoeur *et al.*, 1992). Cette configuration a permis d'obtenir une homogénéisation optimale comme suggéré par Jolicoeur *et al.* (1992). Suite aux contraintes géométriques de l'installation, les sections d'entrée des colonnes ont été immergées à 7 cm sous la surface de liquide.

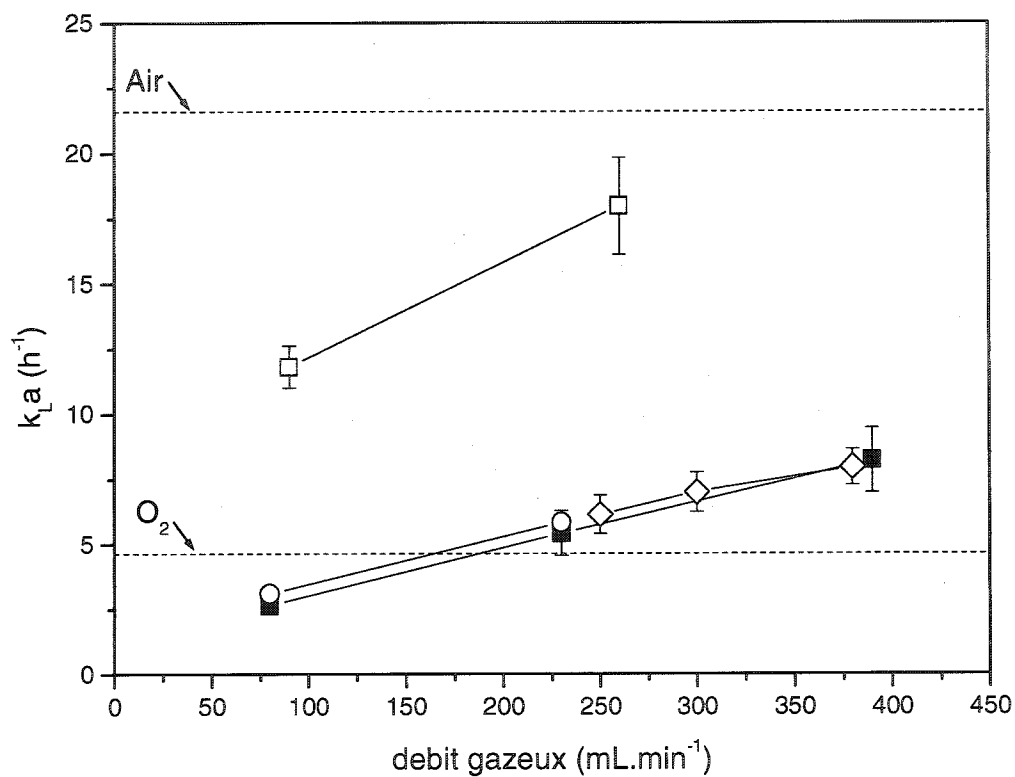
Afin de concevoir le système, différents paramètres ont été étudiés en bioréacteur. L'influence sur la séparation cellules/milieu de la distance entre l'agitateur et l'entrée des colonnes de séparation a été étudiée à une vitesse de 60 rpm, pour une rotation anti-horaire (pompage descendant) et horaire (pompage ascendant) avec une suspension cellulaire de 13 jours d'âge. La hauteur de liquide exempt de cellules en haut de colonne a été mesurée. Pour éviter toute influence de la boucle de recirculation et du temps, le débit était arrêté une fois la colonne pleine de liquide. Étonnamment, plus la

distance colonne-hélice était petite, plus la hauteur de la zone exempte de cellules était grande et donc l'efficacité de la séparation élevée. L'effet du sens et de la vitesse de rotation ont également été étudiés (Tableau 3.2). La perturbation du front cellulaire a augmenté avec la vitesse de rotation mais une rotation anti-horaire a induit des perturbations moindres du front. L'utilisation d'une croix en entrée de colonne a également augmenté la stabilité de séparation. En conclusion, les paramètres d'opération optimaux en bioréacteur ont pu être fixés par cette étude. La distance entre l'agitateur et les colonnes D, pourvues d'une croix, a ainsi été fixée à 1 cm et la vitesse de rotation à 40 rpm pour une rotation anti-horaire.

**Tableau 3.2** Influence des conditions opératoires sur la stabilité du front pour une suspension âgée de 13 jours, avec une distance de 1 cm entre la colonne et le haut de l'agitateur. Le front a été considéré stable lorsque la hauteur minimale de liquide était de 5 cm.

<b>Croix</b>	<b>Vitesse d'agitation (rpm)</b>	<b>Rotation horaire</b>	<b>Rotation anti-horaire</b>
non	25, 30, 35	pertes faibles de cellules	front stable
oui	30	front stable	front stable
non	40,60	pertes élevées de cellules	pertes élevées de cellules
oui	40,60	pertes faibles de cellules	front stable

L'injection de gaz au pied du bioréacteur a engendré l'introduction de nombreuses bulles dans les colonnes de séparation, ce qui a déstabilisé le front et créé une zone de mélange au sein des colonnes. Le positionnement du diffuseur gazeux à 1 cm au dessus de l'entrée des colonnes a réduit quasiment à zéro le nombre de bulles entrant dans celles-ci. L'effet de cette position du diffuseur gazeux sur le taux de transfert de l'oxygène a alors été évalué (Figure 3.2). La position a eu beaucoup plus d'influence sur le  $K_La$  que la direction et la vitesse de rotation. Malgré une baisse nette du potentiel du bioréacteur à distribuer l'oxygène nécessaire aux cellules lorsque le diffuseur se situe à 6 cm de la surface du liquide, il a été observé que le taux de transfert d'oxygène est suffisant lors de l'utilisation de gaz enrichi en oxygène. Le OUR maximum attendu pour une suspension cellulaire de *E. californica* de  $10 \text{ gDW.L}^{-1}$  est de  $2.43 \text{ mMO}_2.\text{gDW}^{-1}$  (Lamboursain *et al.*, 2002) ce qui implique un  $K_La$  requis de  $21.6 \text{ h}^{-1}$  pour un apport d'air et de  $4.6 \text{ h}^{-1}$  pour un apport d'oxygène pur. Comme montré sur la Figure 3.2, un mélange gazeux d'air enrichi en oxygène au delà de  $200 \text{ mL.min}^{-1}$  est adéquat.



**Figure 3.2** Influence du débit d'air sur le  $K_La$ . (□) 60 rpm, horaire (pompage vers le haut), diffuseur installé dans le fond de la cuve du bioréacteur; (○) 60 rpm, anti-horaire (pompage vers le bas), diffuseur installé à 6 cm de la surface de liquide; (◇) 45 rpm, anti-horaire, diffuseur de surface (6 cm); (■) 60 rpm, horaire, diffuseur de surface (6 cm).

Une suspension cellulaire a été cultivée en bioréacteur afin de déterminer l'évolution des vitesses de sédimentation avec le temps. Les conditions opératoires de culture ont respecté les conditions optimales déterminées par les études hydrodynamiques (4 colonnes de type D, croix en entrée, 40 rpm, rotation anti-horaire, 1 cm entre l'hélice et les sections d'entrée des colonnes). La vitesse de sédimentation de chaque échantillon a alors été mesurée et le débit de perfusion réajusté continuellement de façon à avoir la vitesse de pompage égale à la vitesse de sédimentation. Le lit de cellules a été gardé stable au sein de la colonne durant toute la culture. La Tableau 3.3 donne la vitesse de sédimentation et le SCV des échantillons pendant l'expérience ainsi que le débit de pompage appliqué à la boucle de recirculation.

A partir de cette expérience, il a été possible de fixer les vitesses de pompage et donc les débits du bioréacteur perfusé. Afin d'éviter que des cellules ne soient emportées et pour avoir une certaine marge de sécurité, les débits appliqués durant la culture de perfusion ont été fixés  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  en dessous des débits déterminés par l'expérience précédente. Aux jours 4, 5 et 6, le débit a ainsi été fixé à  $45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , et pour les jours 7 et 8 à  $16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . La vitesse de sédimentation pour le jour 9 n'a pas été mesurée mais estimée à environ  $3 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ , ce qui correspond à un débit de  $16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Pour être prudent, le débit a alors été fixé à  $11 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  pour le bioréacteur perfusé au jour 9.

**Tableau 3.3** La vitesse de sédimentation et le débit de pompage en fonction du temps et du SCV en bioréacteur. Cette culture a été réalisée en respectant les conditions opératoires optimales (4 colonnes de type D, croix installée au bout des colonnes, rotation anti-horaire, 40 rpm, 1 cm entre le haut de l'agitateur et la section d'entrée des colonnes).

Temps de culture (j)	SCV (%)	Vitesse de sédimentation (mm.min <sup>-1</sup> )	Débit de pompage (mL.min <sup>-1</sup> )
4	33	9.2	48.6
5	34	9.7	51.2
6	32	9.6	50.5
7	47	4.9	26.0
8	46	4.1	21.7

## 3.2 *Validation du système perfusé*

### 3.2.1 **Étude de la croissance et de la nutrition cellulaire**

La culture sans addition de résines a donné des taux de croissance ainsi que des taux de production de glucose et de nitrate similaires à ceux obtenus pour les cultures avec addition de résines ainsi que celle avec colonnes d'extraction (Tableau 3.4). L'indice de croissance a évolué de façon similaire pour toutes les cultures avant élicitation (Figure 3.3.A). L'élicitation (jour 4) lors de l'addition de milieu frais avec une solution d'extrait de chitine a induit une dilution cellulaire de 16 % pour toutes les cultures. Cependant, la dilution cellulaire absolue était plus importante dans le cas du bioréacteur perfusé à cause du volume supplémentaire des dispositifs de séparation, des colonnes d'extraction, du dispositif secondaire de séparation et de l'ensemble de la tuyauterie (addition de 860 mL). Une partie des cellules occupait alors des volumes additionnels dans les dispositifs de séparation ainsi que dans le liquide supplémentaire des colonnes de séparation. Les cellules se trouvaient alors au sein d'un volume plus important de milieu ce qui donna lieu à une dilution de 38 %. L'addition de milieu supplémentaire ainsi que d'autres facteurs comme l'ajout d'anti-mousse ont semblé retarder la croissance de la biomasse d'environ 2 jours.

**Tableau 3.4** Paramètres de croissance de *E. californica*, calculés avant et après élicitation pour les différentes stratégies de cultures dans le bioréacteur (avec et sans les résines), ainsi que le bioréacteur avec le système perfusé.

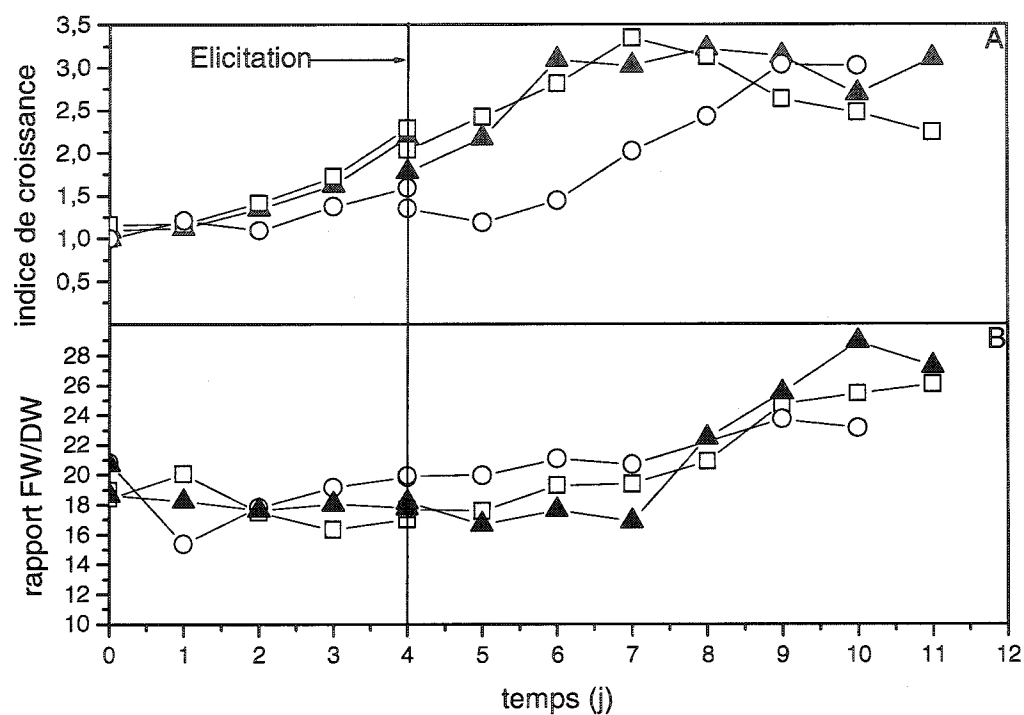
Culture en bioréacteur	$\mu_{\max}^*$ (d <sup>-1</sup> )		$Y_{X/\text{glucose}}^{**}$ (gDW.g <sup>-1</sup> glucose)		$Y_{X/\text{NO}_3}^{***}$ (gDW.g <sup>-1</sup> mNO <sub>3</sub> )	
	Pre-elicit	Post-elicit	Pre-elicit	Post-elicit	Pre-elicit	Post-elicit
Pas de phase	0.22 ± 0.02	0.20±0.04	0.47±0.04	0.32±0.05	0.19±0.03	0.95±0.01
extractive						
perfusion du	0.20±0.02	0.23±0.05	0.69±0.3	0.84±0.3	0.20±0.08	0.78±0.3
milieu						
résines XAD-7	0.25±0.02	0.27±0.02	0.52±0.06	0.40±0.06	0.28±0.04	1.61±0.71

\* :  $\mu_{\max}$  calculé dans la phase exponentielle en utilisant un minimum de 3 points de données.

\*\* :  $Y_{X/\text{glucose}}$  calculé du début de la culture jusqu'à l'élicitation et de l'élicitation jusqu'à la fin de la culture.

\*\*\* :  $Y_{X/\text{NO}_3}$  calculé du début de la culture jusqu'à l'élicitation et de l'élicitation jusqu'à la fin de la culture.

NB: Dans le cas des résines, les données présentées en suspension sont des valeurs moyennes (± déviation standard) des deux bioréacteurs. Pour le cas sans résine et le bioréacteur perfusé, l'erreur sur les pentes des droites est donnée par la déviation standard.



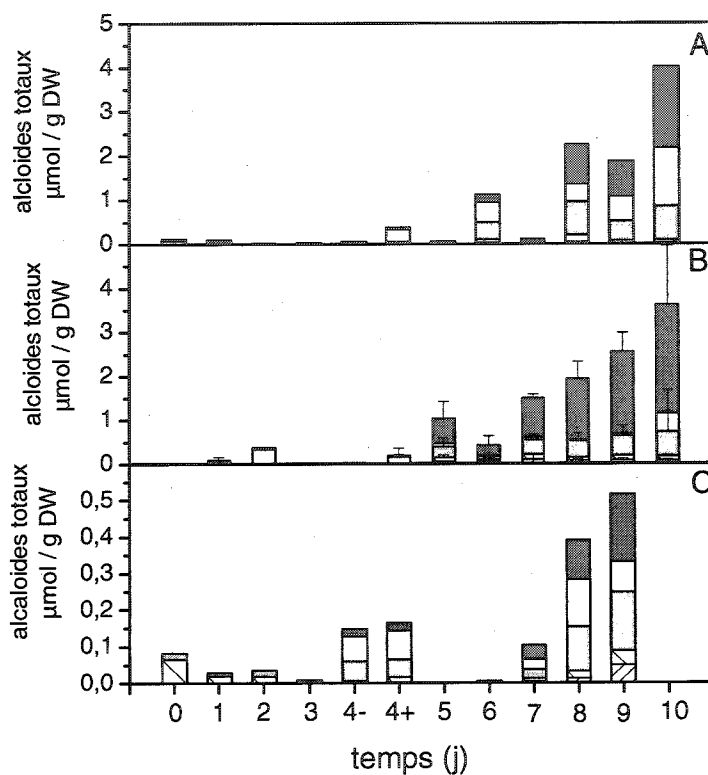
**Figure 3.3** Indice de croissance cellulaire (A) et rapport FW/DW (B) au cours du temps pour différentes conditions opératoires de culture. (□) bioréacteur sans phase d'extraction; (▲) bioréacteur contenant des résines en suspension; (○) bioréacteur perfusé.

Néanmoins, des taux de croissance de  $0.23 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$ , similaires aux autres cultures (moyenne de  $0.24 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$ ) ont été observés après élicitation. Les valeurs étaient également identiques avant élicitation pour toutes les cultures. L'évolution du rapport FW/DW était identique pour l'ensemble des cultures, avec une augmentation du rapport à partir du jour 9 (Figure 3.3.B). Les nutriments et sucres extracellulaires/intracellulaires sont donnés au cours du temps pour les différentes conditions d'extraction en Annexes G et F.

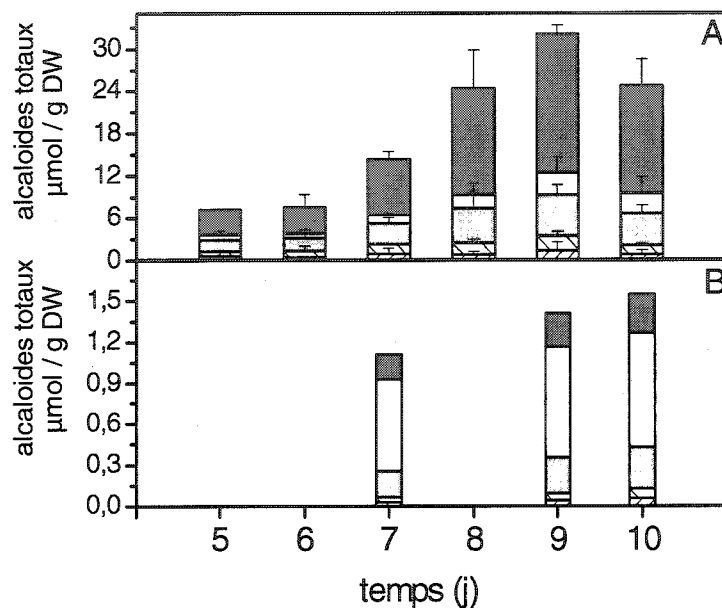
### 3.2.2 Effet de la perfusion sur la production de métabolites secondaires

Après élicitation, la production totale d'alcaloïdes intracellulaires au sein de la culture sans résines d'extraction a atteint un maximum de  $2.25 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$  au jour 8, ce qui est similaire aux  $2.54 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$  obtenus au jour 9 avec le réacteur à résines en suspension (Figure 3.4). Dans le réacteur à perfusion une valeur plus faible a été mesurée de  $0.52 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$ . Klvana *et al.* (2004) ont observé un contenu total intracellulaire d'alcaloïdes de 1.18, 0.12 et  $1.53 \mu\text{mol.gDW}^{-1}$ , après 10 jours de culture en flacons des mêmes cellules *E. californica*, respectivement pour une culture élicitée sans résines, une culture avec résines en suspension dans le milieu et une culture avec une colonne de recirculation contenant des résines. Au niveau du contenu en alcaloïdes du milieu de culture, les concentrations étaient sous le seuil de détection analytique. Pour les résines, un contenu total d'alcaloïdes de  $1.54 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$  a été extrait pour le ré-

acteur à perfusion (Figure 3.5). Par contre, les cultures en bioréacteur avec résines suspendues ont montré une concentration maximale totale en métabolites secondaires de  $28.4 \pm 8.8 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$ . Certaines des conditions opératoires pour le réacteur à perfusion ont donc réduit significativement ses performances. En effet, les taux de production de métabolites secondaires observés pour des cultures en flacons par Klvana *et al.* (2004) étaient très similaires avec 4.66, 4.94 et  $6.8 \mu\text{mol.g DW}^{-1}$ , respectivement pour une culture sans résines, une culture avec des résines en suspension et une culture avec une colonne de recirculation contenant des résines. Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer les faibles performances au niveau des productions du réacteur à perfusion. Dans ce réacteur, des quantités plus faibles de résines étaient continuellement en contact avec le milieu de recirculation. Les trois colonnes utilisées successivement contenaient 29.8, 23.6 et 17.4 g de résines comparé aux 150 g de résines dans le bioréacteur avec résines en suspension. Les rapports résines sur milieu étaient de 8.5, 6.7 et  $5 \text{ g.L}^{-1}$  pour le réacteur à perfusion comparé à  $60 \text{ g.L}^{-1}$  pour le réacteur avec résines en suspension et  $40 \text{ g.L}^{-1}$  pour la culture en flacons (Klvana *et al.*, 2004). Il a été observé que le rapport de la quantité de résine sur le nombre de cellules en suspension est important au niveau de la production cellulaire (Galipeau, 2004). De plus, selon les cinétiques d'adsorption, 15 minutes auraient dû être nécessaires afin d'adsorber totalement les alcaloïdes (Klvana *et al.*, 2004). Or, Durant notre expérience, le temps de contact a été très faible, il se situait aux alentours de 2 minutes. L'utilisation d'une plus grande quantité de résines permettrait un temps de contact plus grand pour les métabolites et les résines.



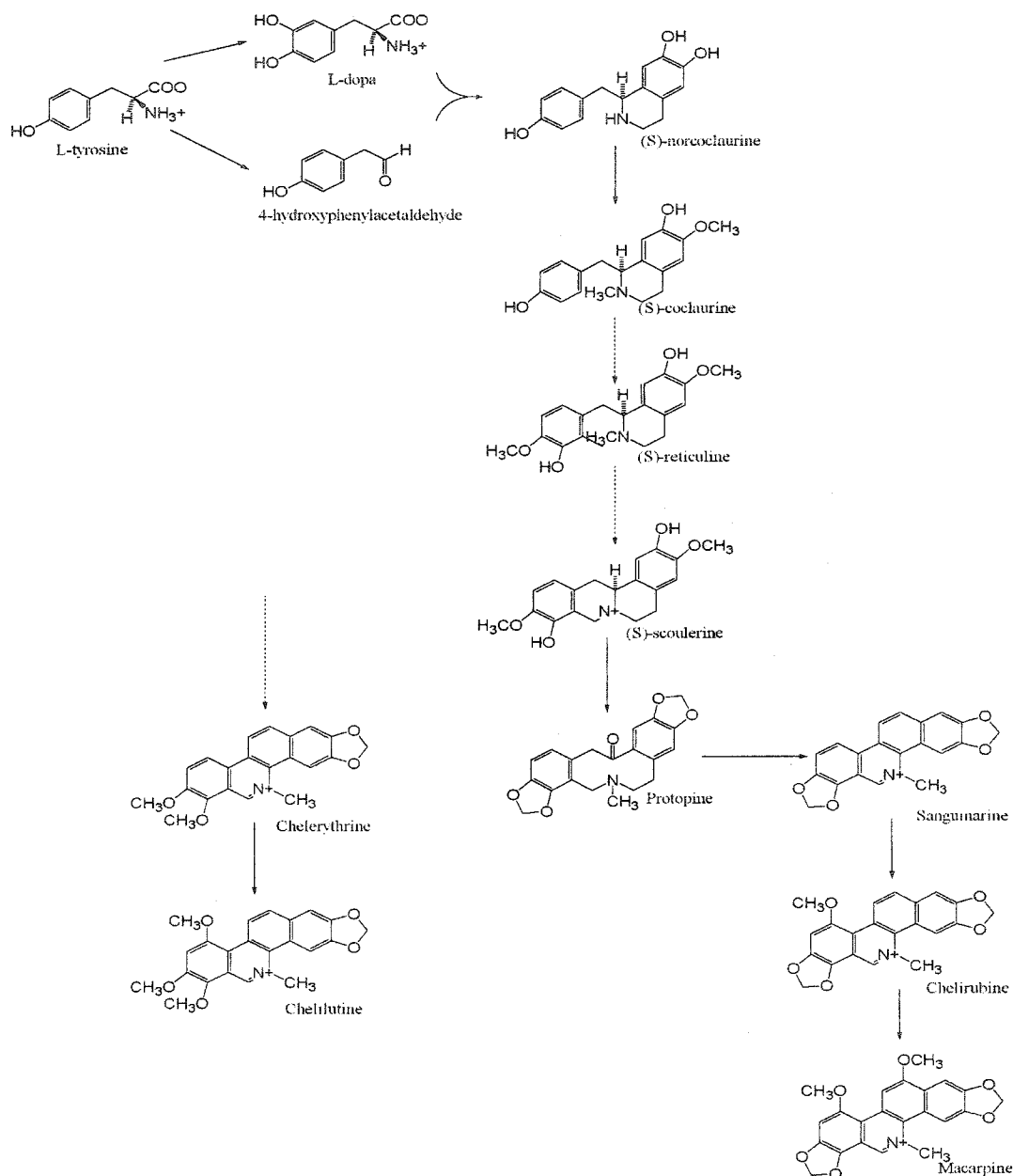
**Figure 3.4** Production d'alcaloïdes intracellulaires au cours du temps pour différentes cultures. Jour 0 = jour d'inoculation, jour 4- = jour 4 avant l'élicitation (30 min) et jour 4+ = jour 4 après l'élicitation (30 min). Hachuré dense vers la droite = sanguinarine, hachuré large vers la gauche = chelerythrine, gris clair = chelerubine, blanc = chelilutine, gris foncé = macarpine. (A) bioréacteur sans phase d'extraction; (B) bioréacteur contenant des résines en suspension; (C) bioréacteur perfusé.



**Figure 3.5** Production d'alkaloïdes adsorbés par les résines au cours du temps pour différentes cultures. Jour 0 = jour d'inoculation, jour 4- = jour 4 avant l'élévation (30 min) et jour4+ = jour 4 après l'élévation (30 min). Hachuré dense vers la droite = sanguinarine, hachuré large vers la gauche = chelerythrine, gris clair = chelerubine, blanc = chelilutine, gris foncé = macarpine. (A) bioréacteur contenant des résines en suspension; (B) bioréacteur perfusé.

En outre, une grande dilution de cellules par ajout de milieu frais lors de l'élicitation ainsi que l'addition d'anti-mousse a éventuellement influencé la production cellulaire et la capacité d'adsorption des résines.

Néanmoins, malgré un taux de production plus faible dans le réacteur à perfusion, les mêmes variations dans la distribution du flux métabolique (Figure 3.6) de la voie de la macarpine et de la chelelutine ont été observés comme Klvana *et al.* (2004) dans une culture en flacon agités avec colonne d'extraction. Ce résultat a confirmé ainsi qu'un contact direct entre cellules et résines favorise la voie de la macarpine et qu'une adsorption indirecte de métabolites secondaires favorise la voie de la chelelutine. Pour le bioréacteur contenant des résines en suspension (Figure 3.5), l'alcaloïde majeur a été la macarpine totalisant 60 % des alcaloïdes adsorbés. Pour le bioréacteur perfusé, il y a eu entre 80 à 85 % des alcaloïdes produits comprenant la sanguinarine, la chelerythrine et la macarpine, alors que dans le cas des colonnes extractives, il y a eu entre 60 et 70 % d'alcaloïdes comprenant la chelerubine et la chelelutine. La chelelutine était dominante (55 % à 60 % du nombre total d'alcaloïdes) dans le cas du bioréacteur avec colonnes d'extraction, alors que la macarpine était dominante (55 % à 65 % du nombre total d'alcaloïdes) pour le bioréacteur à résines en suspension. Dans le flacon contenant des résines en suspension 63 % du nombre total d'alcaloïdes étaient issus de la voie macarpine, par contre 64% étaient issus de la voie chelelutine (58 % chelelutine et 29 % macarpine) lors de l'utilisation d'une colonne d'extraction (Klvana *et al.*, 2004).



**Figure 3.6** Voies métaboliques d'*Eschscholtzia californica* menant aux alcaloïdes benzophénanthridines (Klvana *et al.*, 2004). La voie de la chelilutine mène à la production de chelerythrine et chelilutine, et la voie de la macarpine mène aux produits sanguinarine, chelirubine et macarpine.

## CHAPITRE 4: DISCUSSION, CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ces travaux de maîtrise ont concerné la conception d'un bioréacteur à perfusion permettant l'alimentation et l'extraction en continu dans une boucle externe de divers métabolites. Les cellules en suspension d'*Eschscholtzia californica* ont été utilisées à titre de système modèle. Cette espèce accumule des alcaloïdes benzophénanthridines présentant des intérêts pharmaceutiques. Plusieurs sous-objectifs ont été poursuivis dont la mise en place de protocoles expérimentaux afin de déterminer le mode opératoire de culture et d'injection de résines. La conception du bioréacteur perfusé pourvu d'un système de séparation externe a été réalisée avec succès.

Premièrement, lors de ces travaux, une étude hydrodynamique a été réalisée afin de concevoir des colonnes de décantation permettant une séparation entre les cellules de plantes et le milieu de culture afin de le recirculer à travers des colonnes d'extraction. Le débit de recirculation, l'effet du bullage et de l'agitation sur la séparation milieu/cellules ont été étudiés. L'hydrodynamique des colonnes a également été étudiée dans un bioréacteur de 3-L. Un ensemble de 4 colonnes de décantation a été installé en tête du bioréacteur pour le pompage du milieu de culture. La géométrie optimale des colonnes de décantation pour la configuration du bioréacteur a consisté en un cylindre de 41 mm de diamètre et de 165 mm de hauteur. Les colonnes ont été pourvues d'une croix en entrée de colonne afin de réduire les perturbations engendrées par

l'agitateur. L'étude hydrodynamique a démontré que le débit de perfusion était directement lié à la vitesse de décantation des cellules, qui elle, était variable avec le déroulement de la culture. L'agitation et le bullage avaient pour effet de déstabiliser le front de séparation entre les cellules et le milieu au sein des colonnes de décantation, ce qui aurait pu entraîner des cellules hors du bioréacteur. L'agitation a été fixée à 40 rpm de façon à maintenir le front de séparation stable tout en ayant un transfert d' $O_2$  suffisant sans imposer un cisaillement important aux cellules. Une rotation anti-horaire (pompage vers le bas) a eu pour effet de moins perturber le front qu'une rotation horaire (pompage vers le haut). La distance optimale entre l'agitateur et la section d'entrée des colonnes était de 1 cm, afin de réduire les perturbations. La position du diffuseur gazeux nécessaire à l'oxygénation des cellules a été choisie de façon à éviter le passage des bulles dans les colonnes de sédimentation, permettant ainsi un front stable et minimisant l'entraînement des cellules. Ce bullage fixé entre la surface du liquide et l'entrée des colonnes de séparation a assuré un coefficient de transfert global en oxygène ( $K_{La}$ ) de  $8.2\text{ h}^{-1}$ . La capacité de transfert du bioréacteur dans ces conditions s'est avérée suffisante face à la demande maximale estimée en oxygène des cellules équivalent à un  $K_{La}$  de  $4.6\text{ h}^{-1}$  avec l'utilisation d'oxygène pur et de  $21.6\text{ h}^{-1}$  pour une alimentation en air.

Deuxièmement, après avoir déterminé les conditions opératoires, une culture en bioréacteur à perfusion a été réalisée avec recirculation externe du milieu libre des cellules au travers d'une colonne remplie de résines XAD-7 de façon à extraire les métabolites secondaires en continu. Cette méthode d'extraction a été comparée aux autres

méthodes de culture (sans résines, ou avec des résines en suspension). Les débris cellulaires présents dans le milieu de sortie des colonnes du bioréacteur ont été retenus par un module supplémentaire de séparation extérieur, basé sur la décantation et la flottation. Un anti-mousse a été injecté en même temps que l'éliciteur dans la culture afin de minimiser la formation de mousse. De plus, une trappe à mousse a été ajoutée au montage du bioréacteur pour récupérer les cellules entraînées avec la mousse et éviter tout colmatage du filtre des gaz de sortie. La séparation du système global a montré une efficacité totale au cours des 10 jours de culture, et ce, même avec des densités cellulaires importantes de 50 % SCV (volume sédimenté des cellules). Les taux de croissance dans le bioréacteur à perfusion a été de  $0.23 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$ , soit un temps de dédoublement de 3.0 jours. Le taux était du même ordre de grandeur que la moyenne de  $0.24 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$ , des autres méthodes de culture réalisées. Au niveau du glucose, nitrate et phosphate, les consommations étaient quasiment similaires quel que soit le type d'extraction utilisé. Par conséquent, la croissance et la nutrition cellulaire dans le bioréacteur avec recirculation ne semblent pas être affectés par la présence des colonnes et du bullage de surface. L'influence d'une recirculation externe sur le métabolisme secondaire des cellules de plantes a été également étudiée. La concentration en alcaloïdes dans les résines à la fin de la culture à perfusion était de  $1.54 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$ , et donc présente une valeur du même ordre de grandeur que les concentrations obtenues par Klvana *et al.* (2004) de  $6.8 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$  dans des flacons perfusés de 170 mL. Ce résultat a montré qu'une mise à l'échelle du bioréacteur donne des niveaux de production comparables. Cependant, la production d'alcaloïdes obtenue avec le système de recirculation a été réelle-

ment inférieure au potentiel de production des cellules. En effet, à la fin de la culture, le bioréacteur possédant des résines en suspension montrait des concentrations en métabolites secondaires de  $28.4 \pm 8.8 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$ . Plusieurs hypothèses ont été énoncées pour expliquer le faible niveau de production obtenu en mode perfusion. La conception des colonnes d'extraction a favorisé des temps de contact courts entre le milieu et les résines. De plus, l'obligation d'ajouter un anti-mousse peut avoir affecté la productivité cellulaire de même que la capacité d'adsorption des résines. Malgré une productivité inférieure l'effet d'une absence de contact entre les résines et les cellules sur la distribution des flux métaboliques au niveau des métabolites secondaires a été similaire à des résultats antérieurs obtenus en flacons agités. Ainsi, la voie de biosynthèse de la chelelutine (entre 60 et 70 % d'alcaloïdes comprenant la chelerubine et la chelelutine) a été favorisée en mode perfusé par rapport à la voie de la macarpine (entre 80 à 85 % des alcaloïdes produits comprenant la sanguinarine, la chelerythrine et la macarpine) avec des résines libres. La macarpine était dominante (55 % à 65 % du nombre total d'alcaloïdes) pour le réacteur à résines en suspension alors que la chelelutine était dominante (55 % à 60 % du nombre total d'alcaloïdes) dans le cas du réacteur avec colonnes d'extraction.

La production des métabolites secondaires au sein du bioréacteur perfusé offre beaucoup d'avantages par rapport aux solutions de type batch ou par rapport aux systèmes de perfusion développés jusqu'ici pour les plantes ces dernières années. En effet, la séparation se faisait par sédimentation ce qui a impliqué un faible stress imposé aux

cellules. De plus, comme aucun système membranaire n'était utilisé pour séparer les cellules, le procédé n'était pas soumis aux problèmes de colmatages. Ce bioréacteur a fonctionné à des hauts taux de recirculation permettant un remplacement élevé du volume réactionnel par jour. Au départ de la culture, la recirculation était de  $20.4 \text{ d}^{-1}$  avec en fin de culture un plus faible taux de  $5 \text{ d}^{-1}$  dû à la croissance cellulaire et donc aux plus faibles vitesses de décantation obtenues. Comme observé au Chapitre 1, ces taux sont élevés en comparaison aux valeurs trouvées dans la littérature pour la séparation des cellules de plantes du milieu dans un bioréacteur. En flacons, Klvana *et al.* (2004) ont recirculé le milieu de culture, séparé des cellules par un grillage, à un taux maximum de dilution de  $4.9 \text{ d}^{-1}$  alors que Seki *et al.* (1997) ont recirculé à un taux de  $1.0 \text{ d}^{-1}$ . Pour les volumes plus importants, Su *et al.* (1996) ont reporté un taux de perfusion de  $1.0 \text{ d}^{-1}$  dans un bioréacteur airlift et de  $0.4 \text{ d}^{-1}$  dans un bioréacteur agité (Su *et al.*, 2003). Cependant, malgré le taux de recirculation élevé, la production en alcaloïdes dans le réacteur perfusé était faible. Différentes hypothèses ont été émises : mauvaises performances des colonnes d'extraction, présence d'anti-mousse, dilution importante du milieu. De plus amples études pour améliorer le processus de production devraient être réalisées afin d'optimiser le système d'extraction des résines.

Ce procédé est une bonne alternative aux systèmes de plantes immobilisées. Par simplicité de séparation des cellules et du milieu, les cellules sont souvent immobilisées ou encapsulées lors d'un procédé continu d'extraction. Cependant, ce système possède de grands inconvénients comparé aux systèmes en suspension, le milieu étant

souvent moins homogène, et moins reproductif. Le système à perfusion offre la possibilité de travailler de façon continue. Une fois la saturation obtenue au sein des résines, la colonne d'extraction peut être remplacée par une nouvelle au cours de la culture. Le procédé de production peut ainsi se poursuivre sans arrêter la culture. En conclusion, ce nouveau bioréacteur présente un potentiel élevé en ce qui concerne les cultures de cellules à grande échelle.

Les différents résultats obtenus au cours de ce projet permettent de proposer quelques recommandations pour les travaux ultérieurs.

Au niveau des faibles rendements obtenus en alcaloïdes, des études supplémentaires seront nécessaires afin de vérifier les hypothèses émises pour expliquer les résultats obtenus. Au niveau de l'extraction, les colonnes de résines devront être optimisées. Le temps de contact étant trop faible pour le taux de recirculation, il serait nécessaire d'augmenter la quantité de résines dans les colonnes en augmentant leur surface et/ou leur longueur. Plusieurs tests devront être réalisés afin de vérifier si l'extraction des alcaloïdes est totale après le passage du milieu dans les colonnes.

Il serait également intéressant de vérifier l'effet de l'anti-mousse sur le développement des cellules, ainsi que son adsorption par les résines.

Une étude plus approfondie des flux métaboliques, permettrait également de comprendre les causes du changement de proportions des alcaloïdes en fonction des conditions opératoires de culture.

Il serait également intéressant d'utiliser le bioréacteur perfusé pour une autre espèce cellulaire ou pour l'extraction d'un autre type de métabolites secondaires, comme des protéines. Certaines modifications devraient être réalisées, particulièrement au niveau des débits d'extraction liés aux vitesses de sédimentation des cellules, ainsi que la colonne d'extraction, liée au type de métabolites.

En outre, ce système pourrait être utilisé pour une autre application comme l'étude des modèles cellulaires. Grâce à une alimentation de milieu frais et une élimination du milieu usé de façon continue, il serait possible de stabiliser les cellules. L'injection de milieu frais de différentes compositions serait une méthode pour observer l'effet d'un nutriment particulier sur les cellules. La détermination des cinétiques de croissance et de production permettrait, par la suite, de contrôler la culture et d'optimiser la production en fonction de la physiologie de la plante.

## RÉFÉRENCES

- AHMAD, N., GUPTA, S., HUSAIN, M.M., HEISKANEN, K.M., MUKHTAR, H. 2000. "Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells *versus* normal cells". *Clinical Cancer Research*. 6:4. 1524-1528.
- ALAMI, I., MARI, S., CLERIVET, A. 1998. "A glycoprotein from *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *Platani* triggers phytoalexin synthesis in *Platanus x acerifolia* cell-suspension cultures". *Phytochemistry*. 48:5. 771-776.
- ARCHAMBAULT, J. 1991. "Large-scale (20 L) culture of surface-immobilized *Catharanthus roseus* cells". *Enzyme and Microbial Technology*. 13:11. 882-892.
- ARCHAMBAULT, J., WILLIAMS, R.D., PERRIER, M., CHAVARIE, C. 1996. "Production of sanguinarine by elicited plant cell culture III. Immobilized bioreactor cultures". *Journal of Biotechnology*. 46:2. 121-129.
- AUBRY, D. 1995. *Développement et commande d'un procédé de production de sanguinarine à partir de la culture en suspension de cellules de plantes*. 202p. Mémoire de maîtrise en Génie Chimique, Ecole Polytechnique de Montréal.
- BATT, B.C., DAVIS, R.H., KOMPALA, D.S. 1990. "Inclined sedimentation for selective retention of viable hybridomas in a continuous suspension bioreactor". *Biotechnology Progress*. 6:6. 458-464.

- BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. 2002. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons. 1408 p.
- BYUN, S.Y., KIM, C., PEDERSEN, H. 1992. "Elicitation of alkaloid production at different growth stages in cell suspensions of *Eschscholtzia californica*". *Plant Tissue Culture Letters*. 9:3. 164-168.
- BYUN, S.Y., PEDERSEN, H. 1994. "Two-phase airlift fermentor operation with elicitation for the enhanced production of benzophenanthridine alkaloids in cell suspensions of *Escherichia californica*". *Biotechnology and Bioengineering*. 44:1. 14-20.
- CHATTOPADHYAY, S., BISARIA, V.S., SRIVASTAVA, A.K. 2003. "Enhanced production of podophyllotoxin by *Podophyllum hexandrum* using in situ cell retention bioreactor". *Biotechnology Progress*. 19:3. 1026-1028.
- CHATTOPADHYAY, S., SRIVASTAVA, A.K., BHOJWANI, S.S., BISARIA, V.S. 2002. "Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93:2. 215-220.
- CHATURVEDI, M.M., KUMAR, A., DARNAY, B.G., CHAINY, G.B.N., AGARWAL, S., AGGARWAL, B.B. 1997. "Sanguinarine (pseudocheilerythrine) is a potent inhibitor of NF- kappaB activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation". *Journal of Biological Chemistry*. 272:48. 30129-30134.

- CLINE, S., COSCIA, C. 1988. "Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*". *Plant Physiology*. 86. 161-165.
- COLLIN, H.A. 2001. "Secondary product formation in plant tissue cultures". *Plant Growth Regulation*. 34:1. 119-134.
- COLLINGE, M.A., BRODELIUS, P.E. 1989. "Dynamics of benzophenanthridine alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica* after treatment with a yeast elicitor". *Phytochemistry*. 28:4. 1101-1104.
- COLLINS-PAVAO, M., CHIN, C.-K., PEDERSEN, H. 1996. "Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia*". *Journal of Biotechnology*. 49:1-3. 95-100.
- CORRY, J.P., REED, W.L., CURTIS, W.R. 1993. "Enhanced recovery of solavetivone from *Agrobacterium* transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus* using integrated product extraction". *Biotechnology and Bioengineering*. 42:4. 503-508.
- CUSIDO, R.M., PALAZON, J., BONFILL, M., NAVIA-OSORIO, A., MORALES, C., PINOL, M.T. 2002. "Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*". *Biotechnology Progress*. 18 :3. 418-423.
- DANIELL, H., STREATFIELD, S.J., WYCOFF, K. 2001. "Medical Molecular Farm-

- ing: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants". *Trends in Plant Science*. 6:5. 219-226.
- DORAN, PM. 1999. "Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors". *Biotechnology Progress*. 15:3. 19-335.
- DORAN, PM. 2000. "Foreign protein production in plant tissue cultures". *Current Opinion in Biotechnology*. 11. 199-204.
- DE GUCHT, L.P.E., VANDERPLAS, L.H.W. 1995. "Growth-kinetics of glucose-limited *Petunia-hybrida* cells in chemostat cultures: determination of experimental values for growth and maintenance parameters". *Biotechnology and Bioengineering*. 47:1. 42-52.
- DORNENBURG, H., KNORR, D. 1996. "Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures". *Critical reviews in plant sciences*. 15:2. 141-168.
- DROUAL, A., MAAROUFI, H., CRECHE, J., CHENIEUX, J., RIDEAU, M., HAMDI, S. 1997. "Changes in the accumulation of cytosolic cyclophilin transcripts in cultured periwinkle cells following hormonal and stress treatments". *Journal of plant physiology*. 151:2. 142-150.
- ELEY, B.M. 1999. "Antibacterial agents in the control of supragingival plaque". *British Dental Journal*. 186:6. 286-296.
- FACCHINI, P.J., DICOSMO, F. 1991. "Plant cell bioreactor for the production of pro-

- toberberine alkaloids from immobilized *Thalictrum rugosum* cultures". *Biotechnology and Bioengineering*. 37:5. 397-403.
- FURUSAKI, S. 1988. "Engineering aspects of immobilized biocatalysts". *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 21:3. 219-230.
- GALIPEAU, S. 2004. *Étude de la phase de production d'alcaloïdes indoliques par une suspension cellulaire de Catharanthus Roseus*. Mémoire de maîtrise en Génie Chimique. École Polytechnique de Montréal.
- GAMBORG, O.L., MILLER R.A., OJIMA K. 1968. "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells". *Experimental Cell Research* 50. 151-158.
- GAO, J., LEE, J.M. 1992. "Effect of oxygen supply on the suspension culture of genetically modified tobacco cells". *Biotechnology Progress*. 8:4. 285-290.
- GLASER, V. 1999. "Billion-dollar market blossoms as botanicals take root". *Nature Biotechnology*. 17:1. 17-18.
- GMATI, D., CHEN, J., JOLICOEUR, M. 2004. "Application to *In Vivo* NMR Measurment". *Biotechnology and Bioengineering*. *In press*.
- GODOWSKI, K.C., WOLFF, E.D., THOMPSON, D.M., HOUSLEY, C.J., POLSON, A.M., DUNN, R.L., DUKE, S.P., STOLLER, N.H., SOUTHARD, G.L. 1995. "Whole mouth microbiota effects following subgingival delivery of sanguinarium". *Journal Periodontological*. 66:10. 870-877.

- GORENFLO, V.M., ANGEPAT, S., BOWEN, B.D., PIRET, J.M. 2003. "Optimization of an acoustic cell filter with a novel air-backflush system". *Biotechnology Progress*. 19:1. 30-36.
- GUNDLACH, H., MÜLLER, M.J., KUTCHAN, T.M., ZENK, M.H. 1992. "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures". *Plant Biology*. 89. 2389-2393.
- HALDIMANN, D., BRODELIUS, P. 1987. "Redirecting cellular metabolism by immobilization of culture plant cells: a model study with *Coffea arabica*". *Phytochemistry*. 26:1431-1434.
- HAMERSKI, D., BEIER, R.C., KNEUSEL, R.E., MATERN, U., HIMMELSPACHT, K. 1990. "Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension cultures of *Ammi majus*". *Phytochemistry*. 29:4. 1137-1142.
- HEIJNEN, J., VANSCHELTINGA, A.H.T., STRAATHOF, A.J. 1992. "Fundamental bottlenecks in the application of continuous bioprocesses". *Journal of Biotechnology*. 22:1-2. 3-20.
- HOHE, A., DECKER, E.L., GORR, G., SCHWEEN, G., RESKI, R. 2002. "Tight control of growth and cell differentiation in photoautotrophically growing moss (*Physcomitrella patens*) bioreactor cultures. *Plant Cell Reports*. 20. 1135-1140.

- HORN, M.E., WOODARD, S.L., HOWARD, J. A. 2004. "Plant molecular farming: systems and products". *Plant Cell Reports*. 22. 711-720.
- HULSCHER, M., SCHEIBLER, U., ONKEN, U. 1992. "Selective recycle of viable animal cells by coupling of airlift reactor and cell settler". *Biotechnology and Bioengineering*. 39:4. 442-446.
- HUSEMANN, W., CALLIES, R., LEIBFRITZ, D. 1992. "External pH modifies the intracellular pH and the mode of photosynthetic CO<sub>2</sub>-assimilation in photoautotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium- rubrum L* ". *Botanica Acta*. 105:2. 116-120.
- JOHNSON, M., LANTHIER, S., MASSIE, B., LEFEBVRE, G., KAMEN, A.A. 1996. "Use of the Centritech Lab centrifuge for perfusion culture of hybridoma cells in protein-free medium". *Biotechnology Progress*. 12:6. 855-864.
- JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P.J., ARCHAMBAULT, J. 1992. "Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture". *Biotechnology and Bioengineering*. 39:5. 511-521.
- JOLICOEUR, M., BOUCHARD-MARCHAND, E., BÉCARD, G., PERRIER, M. 2002. "Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model". *Ecological Modelling*. 158:1-2. 121-142.

- KATO, A., HASHIMOTO, Y., SOH, Y. 1976. "Effect of temperature on the growth of tobacco cells". *Journal of Fermentation Technology*. 54:754-757.
- KAWAHARA, H., MITSUDA, S., KUMAZAWA, E., TAKESHITA, Y. 1994. "High-density culture of Fm-3a cells using a bioreactor with an external tangential-flow filtration device". *Cytotechnology*. 14:1. 61-66.
- KIERAN, P.M., MACLOUGHLIN, P.F., MALONE, D.M. 1997. "Plant cell suspension cultures: some engineering considerations". *Journal of Biotechnology*. 59:1-2. 39-52.
- KIM, D., CHO, G.H., PEDERSEN, H., CHIN, C.K. 1991. "A hybrid bioreactor for high density cultivation of plant cell suspensions". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34:6 . 726-729.
- KLIVANA, M., LEGROS, R., JOLICOEUR, M. 2004. "In situ extraction strategy affects benzophenanthridine alkaloid production fluxes in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*". *Biotechnology and Bioengineering*. In press
- KOLENKO, V., BLOOM, T., RAYMAN, P., BUKOWSKI, R., HSI, E., FINKE, J. 1999. "Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3". *The Journal of Immunology*. 163:2. 590-598.

- KUFTINEC, M.M., MUELLER-JOSEPH, L.J., KOPCZYK, R.A. 1990. "Sanguinaria toothpaste and oral rinse regimen clinical efficacy in short- and long-term trials". *Journal Cancer Dental Association*. 56:31-33.
- KURUMA, H., FUJITA, T., SHITARA, T., EGAWA, S., YOKOYAMA, E., BABA, S. 2003. "Weekly paclitaxel plus estramustine combination therapy in hormone-refractory prostate cancer: a pilot study". *International Journal of Urology*. 10:9. 470-475.
- LAMBOURSAIN, L. 2004. *Études des liens entre le statut nutritionnel des cellules de plantes et leur capacité à produire des métabolites secondaires*. 212p. Thèse de doctorat en Génie Chimique. Ecole Polytechnique de Montréal.
- LAMBOURSAIN, L., ST-ONGE, F., JOLICOEUR, M. 2002. "A lab-built respirometer for plant and animal cell culture". *Biotechnology Progress*. 18:6. 1377-1386.
- LECKIE, F., SCRAGG, A.H., CLIFFE, K.C. 1991. "Investigation into the role of initial KLa on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*". *Biotechnology and Bioengineering*. 37:4. 364-370.
- LECKY, R., HOOK, I., SHERIDAN, H. 1992. "Enhancement of dihydrosanguinarine production in suspension-cultures of *Papaver Bracteatum*. I. Medium Modifications". *Journal of Natural Products*. 55:10. 1513-1517.
- LEE-PARSONS, C.W.T., SHULER, M.L. 2002. "The effect of ajmalicine spiking and

- resin addition timing on the production of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* cell cultures". *Biotechnology and Bioengineering*. 79:4. 408-415.
- MULABAGAL., TSAY, H.-S. 2004. "Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites". *International Journal of Applied Science and Engineering*. 2:1. 29-48.
- MURANAKA, T., MIYATA, M., ITO, K., TACHIBANA, S. 1998. "Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor". *Phytochemistry*. 49:2. 491-496.
- OELOFSE, D., DUBERY, I. 1996. "Induction of defence responses in cultured tobacco cells by elicitors from *Phytophthora nicotianae*". *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 28:3. 295-301.
- OOSTDAM, A., VANDERPLAS, L.H.W. 1996. "A cell suspension of *Linum flavum* (L) in phosphate limited continuous culture". *Plant Cell Reports*. 16:3-4. 188-191.
- PARK, H.H., CHOI, S.K., KANG, J.K., LEE, H.Y. 1990. "Enhancement of producing catharanthine by suspension growth of *Catharanthus roseus*". *Biotechnology Letters*. 12:8. 603-608.
- PAYNE, G.P., BRINGI, V., PRINCE, C.L., SHULER, M.L. 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Gardner Publications. 346 p.
- PAYNE, G.F., SHULER, M.L. 1988. "Selective adsorption of plant products". *Bio-*

*technology and Bioengineering*. 31:9. 922-928.

RADMAN, R., SAEZ, T., BUCKE, C., KESHAVARZ, T. 2003. "Elicitation of plants and microbial cell systems". *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 37:1. 91-102.

RAMACHANDRA, R.S., RAVISHANKAR, G.A. 2002. "Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites". *Biotechnology Advances*. 20:2. 101-153.

RAVISHANKAR, G.A., RAMACHANDRA, R.S. 2000. "Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals". *Journal of Biochemistry*. 4:2. 73-102.

RHO, D., CHAURET, N., LABERGE, N., ARCHAMBAULT, J. 1992. "Growth characteristics of *Sanguinaria canadensis* L. cell suspensions and immobilized cultures for production of benzophenanthridine alkaloids". *Applied Microbiology Biotechnology*. 36:5. 611-617.

RIJHWANI, S.K., SHANKS, J.V. 1998. "Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures". *Biotechnology Progress*. 14: 3. 442-449.

ROBINS, R.J., RHODES, M.J. 1986. "The stimulation of anthraquinone production by *Cinchona ledgeriana* cultures with polymeric adsorbents". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 24: 1. 35-41.

ROWINSKY, E.K., CAZENAVE, L.A., DONEHOWER, R.C. 1990. "Taxol: a novel

- investigational antimicrotubule agent". *Journal of the National Cancer Institute*. 82:15. 1247-1259.
- SAKAMOTO, K., IIDA, K., SAWAMURA, K., HAJIRO, K., ASADA, Y., YOSHIKAWA, T., FURUYA, T. 1993. "Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured-cells of *Aralia-cordata*". *Phytochemistry*. 33:2. 357-360.
- SCHLATMANN, J.E., NUUTILA, A.M., VAN GULIK, W.M., TEN HOOPEN, H.J.G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J.J. 1993. "Scaleup of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus*". *Biotechnology and Bioengineering*. 41:2. 253-262.
- SEARLES, J.A., TODD, P., KOMPALA, D.S. 1994. "Viable cell recycle with an inclined settler in the perfusion culture of suspended recombinant chinese hamster ovary cells". *Biotechnology Progress*. 10:2. 198-206.
- SEKI, M., OHZORA, C., TAKEDA, M., FURUSAKI, S. 1997. "Taxol (paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata*". *Biotechnology and Bioengineering*. 53:2. 214-219.
- SIROIS, J. 1997. *Optimisation de la croissance de cellules d'Eschscholtzia californica en bioréacteur*. 293p. Mémoire de maîtrise en Génie Chimique, École Polytechnique de Montréal.
- SIROIS, J., PERRIER, M., ARCHAMBAULT, J. 2000. "Development of a two-step

- segregated model for the optimization of plant cell growth". *Control Engineering Practice*. 8:7. 813-820.
- SU, W.W., ARIAS, R. 2003. "Continuous plant cell perfusion culture: Bioreactor characterization and secreted enzyme production". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95:1. 13-20.
- SU, W.W., HE, B.J., LIANG, H., SUN, S. 1996. "A perfusion air-lift bioreactor for high density plant cell cultivation and secreted protein production". *Journal of Biotechnology*. 50:2-3. 225-233.
- TANAKA, H. 1982. "Oxygen transfer in broths of plant cells at high density". *Biotechnology and Bioengineering*. 24:425-442.
- TANAKA, H. 2000. "Technological problems in cultivation of plant cells at high density". *Biotechnology and Bioengineering*. 67:6. 775-790.
- TEN HOOPEN, H.J.G., VINKE, J.L., MORENO, P.R.H., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J.J. 2002. "Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharanthus roseus* suspension cultures". *Enzyme and Microbial Technology*. 30:1. 56-65.
- TIKHOMIROFF, C., ALLAIS, S., KLVANA, M., HISIGER, S., JOLICOEUR, M. 2002. "Continuous selective extraction of secondary metabolites from *Catharanthus roseus* hairy roots with silicon oil in a two-liquid-phase bioreactor". *Biotech-*

*nology Progress*. 18:5. 1003-1009.

- VAN GULIK, W.M., TEN HOOPEN, H.J.G., HEIJNEN, J.J. 2001. "The application of continuous culture for plant cell suspensions". *Enzyme and Microbial Technology*. 28:9-10. 796-805.
- VOISARD, D., MEUWLY, F., RUFFIEUX, P.-A., BAER, G., KADOURI, A. 2003. "Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells". *Biotechnology and Bioengineering*. 82:7. 751-765.
- WANG, Z.Y., ZHONG, J.J. 2002. "Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors". *Biotechnology Letters*. 24. 445-448.
- WEERASINGHE, P., HALLOCK, S., TANG, S.-C., LIEPINS, A. 2001. "Role of Bcl-2 family proteins and caspase-3 in sanguinarine-induced bimodal cell death". *Cell Biology and Toxicology*. 17:6. 371-381.
- WILLIAMS, R.D., CHAURET, N., BEDARD, C., ARCHAMBAULT, J. 1992. "Effect of Polymeric Adsorbents on the Production of Sanguinarine by *Papaver-Somniferum* Cell-Cultures". *Biotechnology and Bioengineering*. 40:8. 971-977.
- WONGSAMUTH, R., DORAN, P.M. 1994. "Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effect of chemical antifoams". *Biotechnology and Bio-*

*engineering*. 44:4. 481-488.

WU, J., ZHONG, J.J. 1999. "Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects". *Journal of Biotechnology*. 68:2-3. 89-99.

YAMAMOTO, H., ZHAO, P., YAZAKI, K., INOUE, K. 2002. "Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 50:8. 1086-1090.

YUAN, Q., XU, H., HU, Z. 1999. "Two-phase culture for enhanced alkaloid synthesis and release in a new airlift reactor by *Catharanthus roseus*". *Biotechnology Techniques*. 13:2. 107-109.

ZHAO, D., XING, J., LI, M., LU, D., ZHAO, Q. 2001. "Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67:3. 227-234.

ZHONG, J.-J. 2002. "Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94:6. 591-599.

ZHONG, J.-J., SEKI, T., KINOSHITA, S.-I., YOSHIDA, T. 1992. "Rheological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*". *Biotechnology and Bioengineering*. 40: 10. 1256-1262.

## ANNEXES

**Annexe A** Composition du milieu de culture  
d'*Eschscholtzia californica*

Tableau A.1 Composition du milieu de culture

Solutions	Produits	Quantités	Eau	Milieu
Sels majeurs	KNO <sub>3</sub>	50.0 g	dans 1L	utiliser 50 mL
	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	5.0 g		dans 1L de
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	3.0 g		milieu
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.7 g		
Micronutriments	MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	1.0 g	dans 1L	utiliser 10 mL
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	300 mg		dans 1L de
	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	200 mg		milieu
	KI	75 mg		
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	25 mg		
	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	2.5 mg		
	CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	2.5 mg		
Vitamines	inositol	10.0 g	dans 1L	utiliser 10 mL
	Thiamine-HCl	1.0 g		dans 1L de
	Nicotinic acid	100 mg		milieu
	Pyridoxine-HCl	100 mg		
Calcium	CaCl <sub>2</sub>	15.0 g	dans 1L	utiliser 10 mL dans 1L de

				milieu
FeSO <sub>4</sub> EDTA	FeSO <sub>4</sub> EDTA	4.3 g	dans 1L	utiliser 10 mL dans 1L de milieu
Hormones	Kinetine	400 µL		400 µL dans 1L de milieu
	Acide 2,4-D	400 µL		400 µL dans 1L de milieu

**Notes : - 30 g de glucose sont ajoutés par litre de milieu**

**- Le pH doit être ajusté à 5.6 avant la stérilisation**

**- Les solutions sont conservées au frigo à +4 °C**

**Annexe B** Protocole de laboratoire PL-CULT-005

Culture d'*Eschscholtzia californica* élicitées, en suspension, en  
bioréacteur de 3L

1	OBJECTIFS .....	117
2	CHAMPS D'APPLICATION ET D'UTILISATION .....	117
3	RESPONSABILITÉ .....	117
4	PRINCIPES.....	117
5	RÉFÉRENCES .....	117
6	MATÉRIEL, RÉACTIFS ET INSTRUMENTS .....	118
	6.1 MONTAGE DU BIOREACTEUR.....	118
	6.2 STERILISATION DU BIOREACTEUR .....	120
	6.3 REFROIDISSEMENT DU BIOREACTEUR.....	120
	6.4 INOCULATION .....	120
	6.5 ECHANTILLONNAGE.....	121
	6.6 ELICITATION .....	121
7	MODE D'OPÉRATION .....	122
	7.1 MONTAGE DU BIOREACTEUR.....	122
	7.2 STERILISATION DU BIOREACTEUR .....	126
	7.3 REFROIDISSEMENT DU BIOREACTEUR.....	127
	7.4 INOCULATION .....	128
	7.5 MISE EN FONCTIONNEMENT .....	129
	7.6 ECHANTILLONNAGE.....	130
	7.7 ELICITATION .....	131
	7.8 SUIVI DU PH ET DE L'O <sub>2</sub> DISSOUS.....	132
8	CONSIGNES EN CAS DE PROBLÈMES .....	132
9	FORMULAIRES / ENREGISTREMENTS.....	132

## 1. OBJECTIFS

Cette procédure d'opération normalisée a pour objectif de définir la marche à suivre pour cultiver une suspension d'*Eschscholtzia californica* élicitée en bioréacteur de 3-L.

## 2. CHAMPS D'APPLICATION ET D'UTILISATION

S'applique à toute culture en suspension d'*Eschscholtzia californica* élicitée, en suspension, en bioréacteur de 3-L.

## 3. RESPONSABILITÉ

Il est de la responsabilité de chacun de suivre les instructions de cette PON.

## 4. PRINCIPES

Pendant 10 jours, la croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica* (EC6), leur consommation en nutriments et leur production en métabolites secondaires (alcaloïdes) sont suivies par des prélèvements journaliers. Ces analyses sont réalisées sur la matrice intra- et extra- cellulaire.

Notons que l'ajout d'extrait de chitine, agent éliciteur, se fait au 4<sup>ème</sup> jour de culture, à une concentration de 160 mL.L<sup>-1</sup> (Lamboursain, 2004). Un système de contrôle régule la concentration en O<sub>2</sub> dissous à 60 % (Aubry, 1995 ; Sirois, 1997).

## 5. RÉFÉRENCES

Les documents suivants seront requis :

AUBRY, D. 1995. « Développement et commandes d'un bioprocédé de production de sanguinarine à partir de la culture en suspension de cellules de plantes ». 202 p. Mémoire de maîtrise en Génie Chimique. École Polytechnique de Montréal.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P.J., ARCHAMBAULT, J. 1992. « Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture ». *Biotechnology and Bioengineering*. 39:5. 511-521.

LAMBOURSAIN, L. 2004. «*Études des liens entre le statut nutritionnel des cellules de plantes et leur capacité à produire des métabolites secondaires*». 212p. Thèse de doctorat en Génie Chimique. Ecole Polytechnique de Montréal.

SIROIS, J. 1997. «*Optimisation de la croissance de cellules d'Eschscholtzia californica en bioréacteur* ». 293p. Mémoire de maîtrise en Génie Chimique. Ecole Polytechnique de Montréal.

Les protocoles d'opération normalisés (PON) suivants seront requis :

PL-ANA-001  
 PL-ANA-005  
 PL-CULT-002  
 PL-CULT-004

## 6. MATÉRIEL, RÉACTIFS ET INSTRUMENTS

### 6.1 Montage du bioréacteur

#### 6.1.1 Système de base

- 1 bioréacteur (volume utile 2.5-L) : cuve de verre (3 L, 12.5 cm x 27 cm, VWR, No. 36390.086), couvercle en acier inox, 2 anneaux en acier inox pour serrer celui-ci
- 1 double ruban hélicoïdal en acier inox (120 mm x 115 mm O.D., hélice de 22 mm de largeur)
- 3 chicanes en acier inox (38 mm x 118 mm)
- 1 tube en acier inox (10 mm x 1 mm I.D.)
- 1 diffuseur d'air poreux en acier inox (2 µm)
- Solution d'eau savonneuse (Fischer, No. 04-320)
- Tuyau de silicone (1\16" I.D., 1\8" O.D., VWR, No. 63009-254) : connexion tube en acier inox – diffuseur poreux
- Silicone (Mastercraft, Rona, No. 67-0862-0)

#### 6.1.2 Alimentation en air et O<sub>2</sub>

- 1 filtre PTFE (0.2 µm, Cole-Parmer, No. 02915-28)

- 1 filtre cylindrique en acier inox (158 mm x 27 mm O.D.), rempli de fibre de verre (Cole-Parmer, No. A-34552-01)
- Alimentation en air de 15 psi (pression maintenue par un détendeur, air du réseau passe dans un déshuileur)
- 1 bonbonne O<sub>2</sub> EXD (volume 44 L, Air Liquide)
- 1 bonbonne N<sub>2</sub> (volume 44 L, Air liquide)
- 2 contrôleurs massiques (Tylan, No. FC 260): air et O<sub>2</sub>
- Tuyau de tygon ( 1/4" I.D., 3/8" O.D., Fisher, No. 14-169-1J) : contrôleur massique - connecteur - filtre (fibre de verre)
- Tuyau de silicone (1/4" I.D., 3/8" O.D., Fisher, No. 14-176-332E) : connexion filtre (fibre de verre)- filtre (PTFE)
- Tuyau de silicone (3/32" I.D., 7/32" O.D., VWR, No. 63009-258) : connexion filtre (PTFE) - tube en acier inox
- Tuyau en plastique rigide (5/32" I.D., 1/4" O.D., Parflex, No. QC42J04K1) : connexion alimentation air- contrôleur massique d'air et connexion bonbonne O<sub>2</sub>- contrôleur massique d'O<sub>2</sub>
- 1 connecteur Y en polypropylène (Cole-Parmer, No. BH-06296-00)
- 1 sonde O<sub>2</sub> (125 mm x 18 mm I.D., Mettler Toledo, No. InPro 6800)
- 1 ferrule PTFE (face, 18 mm, Swagelok, No. T18M3-1)
- 1 ferrule PTFE (arriere, 18 mm, Swagelok, No. T18M4-1)
- 1 lecteur O<sub>2</sub> (Cole-Parmer, No. A-01971-00)
- Système de contrôle et d'acquisition de données (Allen-Bradley controller, Isagraf Enhanced 2.4 program)

### 6.1.3 Agitation

- 1 moteur à vitesse variable (Stir-Pak, Cole-Parmer, No. A-04554-10)
- 1 contrôleur de vitesse d'agitation (Stir-Pak, Cole-Parmer, No. A-50002-02)
- 1 stroboscope (Ametek, Digistrobe III, No. 1965)
- 1 rapporteur

### 6.1.4 Système de condensation

- 1 condenseur en verre (VWR, No. 80067-264)
- 1 filtre PTFE (0.2 µm, Cole-Parmer, No. 02915-28)
- Alimentation d'eau froide du réseau (± 10 °C)
- Tuyau de tygon (1/4" I.D., 3/8" O.D., Fisher, No. 14-169-1J) : connexion entrée eau/sortie eau - condenseur
- Tuyau de silicone (1/4" I.D. et 3/8" O.D., Fisher, No. 14-169-15) : connexion sortie air - condenseur

### 6.1.5 Echantillonnage

- Pince métallique de serrage (Cole-Parmer, No. A08028-00)
- Col rodé en verre 24/40 (VWR, No. KT 199000-2440)
- Tuyau de silicone (3/4" I.D. et 1" O.D., Fisher, No. 14-176-332Q)

#### **6.1.6 Vérification de l'étanchéité du montage**

- 1 débitmètre digital de plage 0-1 L.min<sup>-1</sup> (Varian analytical instruments, No. 190011500)
- Lubrifiant de silicone (Dow Corning, Cole-Parmer, No. A79754-00)
- Solution d'eau savonneuse (Fischer, No. 04-320)
- 1 pince métallique de serrage (Cole-Parmer, No. A08028-00)

#### **6.1.7 Calibrations et précautions à prendre**

- Courroies d'attaches à crans d'arrêts (Thomas & Betts, Rona, No. MR-10400)
- Papier d'aluminium
- 1 débitmètre digital de plage 0-1 L.min<sup>-1</sup> (Varian analytical instruments, No. 190011500)
- 1 bonbonne N2 (volume 44 L, Air liquide)

### **6.2 Stérilisation du bioréacteur**

- 1667 mL de milieu de culture
- 1 entonnoir en Nalgène (80 mm I.D., Fisher, No. 10-348B)
- Autoclave (STERIS, amsco century medium steam sterilizers)
- Autocollant indicateur de stérilité (Fisher, No. 11-875-50)
- 1 pince métallique de serrage (Cole-Parmer, No. A08028-00)
- 1 couvercle de boîte de Petri en Pyrex (Fisher, No. 08-747C)
- Feuille de plastique autoclavable (Allegiance, VWR, No. 63007-910)
- Papier collant autoclavable (Fisher, No. 11-880-10E)- coton
- Papier d'aluminium

### **6.3 Refroidissement du bioréacteur**

- Hotte à flux laminaire horizontal (Microzone corporation, No. H5-MW-99-C35)
- Ethanol (EtOH 95% / H<sub>2</sub>O distillée, 70:30 v/v)

## **6.4 Inoculation**

- 1000 mL de suspension cellulaire de 10 jours de croissance, soit 4 Erlenmeyers de 250 mL chaque
- Balance précise au mg (Sartorius, 600.00g / 60.000g, No. 1412)
- Hotte à flux laminaire horizontal (Microzone Corporation, No. H5-MW-99-C35)
- Ethanol (EtOH 95% / H<sub>2</sub>O distillée, 70:30 v/v)
- Bec Bunzen (Fisher, No. 03-962)

## **6.5 Echantillonnage**

### **6.5.1 Préparation des flacons d'échantillonnage**

- 12 Erlenmeyers d'échantillonnage en Pyrex de 250 mL adaptés au joint 24/40 (VWR, No. 29137-084)
- 12 filtres PTFE (0.2 µm, Cole-Parmer, No. 02915-28)
- Tuyau de silicone (1¼" I.D. et 3⅝" O.D., Fisher, No. 14-169-15)
- Autoclave (STERIS, amsco century medium steam sterilizers)
- Papier d'aluminium

### **6.5.2 Pour le 1er jour**

- 1 Erlenmeyer d'éthanol de capacité 250 mL (EtOH 95% / H<sub>2</sub>O distillée, 70/30 v/v)
- feuille de Parafilm (Fisher, No. 13-374-10)
- Balance précise au mg (Sartorius, 600.00g / 60.000g, No. 1412)
- Bec Bunzen (Fisher, No. 03-962)

### **6.5.3 Du 2eme au 11eme jour**

- feuille de parafilm (Fisher, No. 13-374-10)
- Balance précise au mg (Sartorius, 600.00g / 60.000g, No. 1412)
- Bec Bunzen (Fisher, No. 03-962)

## **6.6 Elicitation**

### **6.6.1 Préparation de la solution de chitine**

- 4 g de poudre de chitine (poly-N-acetyl-D-glucosamine, Sigma, No. C3387)
- 2 couches de Miracloth (22-25 µm, Calbiochem, No. 475855)
- 1 entonnoir magnétique de filtration (300 mL, Cole-Parmer, No. A-29826-00)
- 500 mL de milieu de culture
- 1 éprouvette graduée en verre (100 mL, Fisherbrand, Fisher, 08-570E)

- 1 mortier en porcelaine (Fisher, No. 12-961B)
- 1 pilon en porcelaine (Fisher, 12-961-5AA)
- Autoclave (STERIS, amsco century medium steam sterilizers)
- 1 barreau magnétique (51 mm x 8 mm O.D., Fisher, No. 14-511-65)
- Papier d'aluminium
- 1 Erlenmeyer de 1 L (Corning, Fisher, No. 10-040K)

#### **6.6.2 Injection de la solution de chitine dans le flacon d'alimentation**

- 1 flacon en Pyrex de 500 mL contenant un tube de sortie (Corning, VWR, No. 16331-303)
- 1 pince métallique de serrage (Cole-Parmer, No. A08028-00)
- Tuyau de silicone (1/4" I.D. et 3/8" O.D., Fisher, No. 14-169-15)
- Papier d'aluminium
- Coton

#### **6.6.3 Injection de la solution de chitine dans le réacteur**

- 1 pompe péristaltique (Masterflex, Cole-Parmer, No. A77521)
- 1 tête de pompe Easy load II (Masterflex, Cole-Parmer, No. 77390-00)

## **7 MODE D'OPÉRATION**

### ***7.1 Montage du bioréacteur***

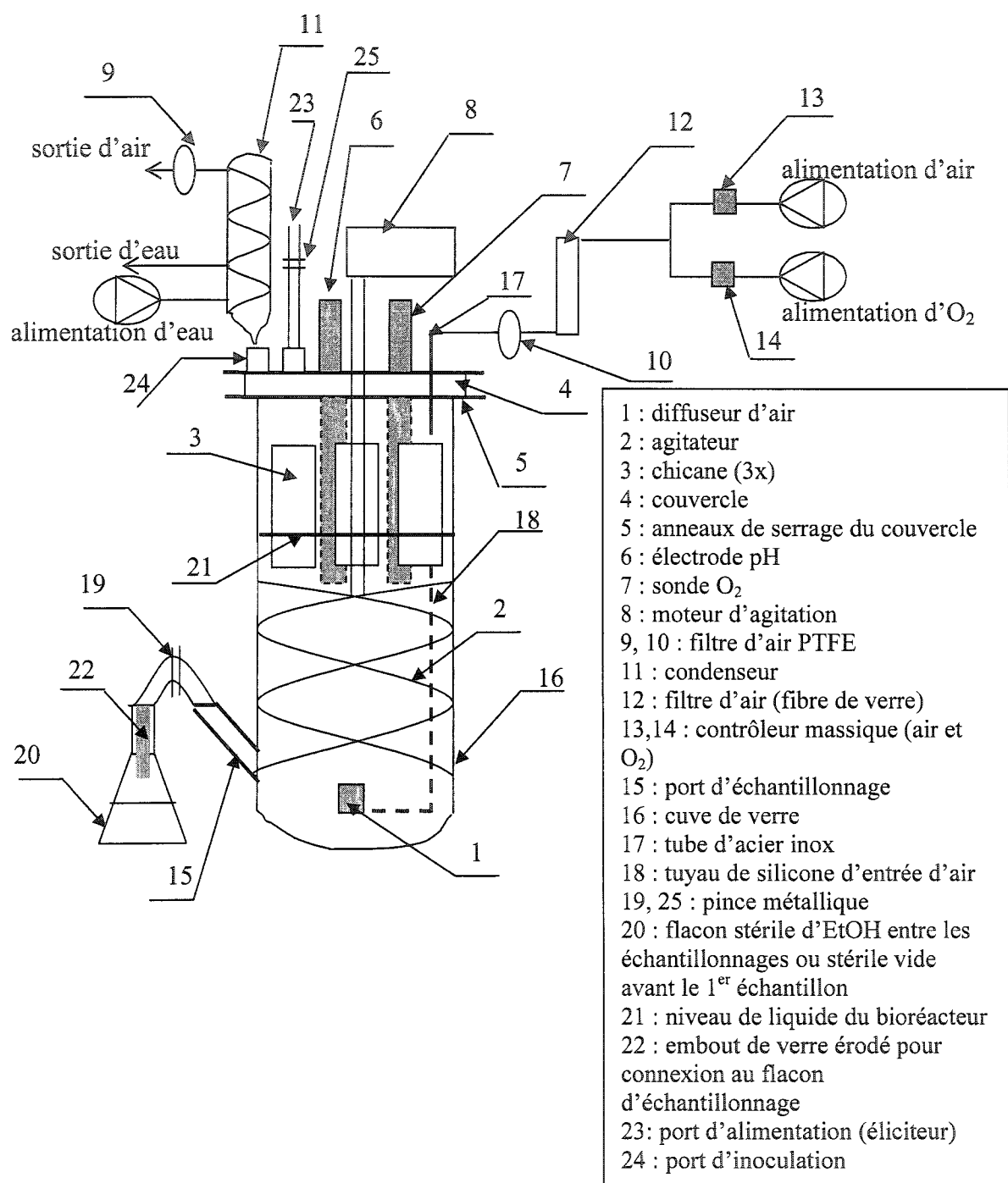
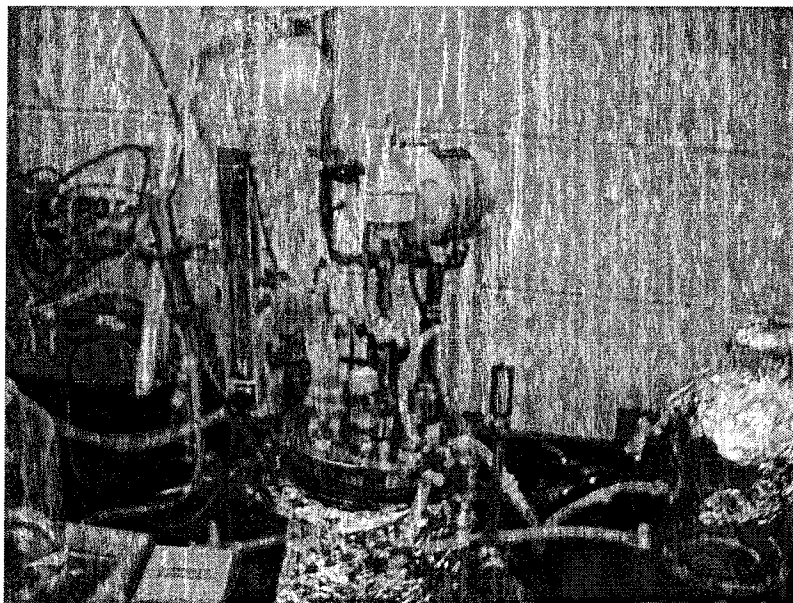


Figure A.1 Montage du bioréacteur



**Figure A.2** Photographie du montage

### 7.1.1 Système de base

- Laver au savon et rincer à l'eau distillée la cuve du bioréacteur (n°16), le couvercle (n°4), le tube en acier inox (n°17), les 3 chicanes (n°3), le ruban hélicoïdal (n°2) et les 2 anneaux de serrage
- Sceller le tuyau de silicone (1\6" ID, 1\8" OD) pour l'entrée d'air (n°18) à la paroi de verre du bioréacteur par du silicone
- Connecter le diffuseur d'air (n°1) à la sortie du tuyau de silicone et le sceller au fond du réacteur avec du silicone
- Connecter le tube en acier inox (n°17) à l'entrée du tuyau de silicone

### 7.1.2 Alimentation en air et O<sub>2</sub>

- Connecter un tuyau Parflex à l'alimentation en air et connecter l'autre bout du tuyau au contrôleur massique d'air (n°13)
- Connecter un tuyau de Parflex à la bonbonne d'O<sub>2</sub> et connecter l'autre bout du tuyau au contrôleur massique d'O<sub>2</sub> (n°14)
- Connecter un tuyau de tygon (1/4" I.D., 3/8" O.D.) à la sortie du contrôleur massique d'air et du contrôleur massique d'O<sub>2</sub>
- Relier les 2 tuyaux de tygon avec le connecteur pour assurer un mélange dans un unique tuyau de silicone (1/4" I.D. et 3/8" O.D.)
- Connecter l'extrémité du tuyau de silicone au filtre cylindrique de fibre de verre (n°12)
- Relier le filtre cylindrique au filtre PTFE (n°10) avec un tuyau de silicone (1/4" I.D. et 3/8" O.D.)
- Relier le filtre PTFE au tube en acier inox avec un tuyau de silicone (3/32" I.D. et 7/32" O.D.)
- Mise en place de la sonde O<sub>2</sub> sur le couvercle en posant les ferrules en PTFE
- Connecter la sonde O<sub>2</sub> (n°7) aux lecteurs respectifs
- Connecter les lecteurs au système de contrôle et d'acquisition de données
- Calibrer la sonde O<sub>2</sub> par bullage d'azote pour 0% et d'air pour 100%, la calibration de la sonde O<sub>2</sub> sera réajustée dans le réacteur après stérilisation de celui-ci

### 7.1.3 Agitation

- Placer les 3 chicanes sur le couvercle en respectant l'orientation optimale de 10° (Jolicoeur *et al.*, 1992) à l'aide d'un rapporteur
- Fixer le ruban hélicoïdal à l'arbre d'agitation du bioréacteur
- Mettre en place le couvercle
- Connecter le moteur (n°8) et le contrôleur de vitesse d'agitation au ruban hélicoïdal
- A l'aide d'un stroboscope, fixer la vitesse d'agitation à 60 rpm

#### **7.1.4 Système de condensation**

- Mettre condenseur (n°11) dans embout prévu sur le bioréacteur
- Connecter un tuyau tygon à l'alimentation d'eau et connecter l'autre bout du tuyau au condenseur (embout entrée eau)
- Connecter un tuyau tygon au condenseur (embout sortie eau) et connecter l'autre bout du tuyau à l'évacuation d'eau
- Poser le filtre PTFE (n°9) au condenseur (embout sortie air) à l'aide d'un tuyau en silicone

#### **7.1.5 Echantillonnage**

- Mettre le tuyau de silicone au port d'échantillonnage du bioréacteur (n°15)
- Connecter l'embout de verre (n°22) au tuyau de silicone
- Fermer le tuyau avec une pince métallique (n°19)

#### **7.1.6 Vérification de l'étanchéité du montage**

- Mettre du lubrifiant sur le joint du couvercle du bioréacteur pour assurer l'étanchéité
- Mettre en place le couvercle et les anneaux de serrage (n°5)
- Fermer le tuyau en silicone de sortie d'air avec une pince métallique
- Fixer la pression maximale d'entrée à 5 psi à l'aide du détendeur
- Vérifier si le débit est nul à l'aide du débitmètre, sinon mettre de l'eau savonneuse sur les connexions pour détecter la fuite

#### **7.1.7 Calibrations et précautions à prendre**

- Calibration des deux contrôleurs massiques pour un bioréacteur rempli de 2.5-L d'eau (donner un signal de consigne et vérifier débit de sortie du bioréacteur avec un débitmètre.
- Tester le programme en injectant de l'air et l'azote pour connaître le temps de réponse du système et vérifier le bon fonctionnement du contrôleur
- Entourer la cuve en verre de deux couches de papier aluminium pour protéger le réacteur des rayons lumineux
- Poser des courroies d'attaches à crans d'arrêt à chaque tuyau pour éviter une déconnexion en cours de culture qui aurait pour effet de nuire au bon déroulement

### **7.2 Stérilisation du bioréacteur**

- S'assurer que l'alimentation en air, le condenseur, les lecteurs de sondes et le moteur d'agitation sont enlevés du réacteur
- Fermer le tuyau avec une pince métallique à l'entrée d'air du réacteur, après le filtre PTFE (de façon à éviter toute remontée du liquide dans le filtre)

- Éviter de trop serrer l'écrou d'acier des sondes pH et O<sub>2</sub>, stérilisées avec le bioréacteur
- Vérifier si les sondes sont introduites au maximum dans le bioréacteur
- Placer un entonnoir dans le port d'inoculation (n°24)
- Introduire un volume de 1667 mL de milieu de culture dans le bioréacteur par l'entonnoir
- Rincer l'entonnoir à l'eau distillée et le replacer dans le port d'inoculation
- Déposer sur l'entonnoir le couvercle de boîte de Petri
- Introduire une boule de coton dans l'embout de verre du port d'échantillonnage
- Entourer d'emballage plastique l'extrémité des tuyaux en silicone (sortie du filtre en fibre de verre et port d'alimentation), les embout du condenseur et du port d'échantillonnage)
- Maintenir le plastique avec du papier collant
- Entourer d'emballage plastique l'extrémité des tuyaux en silicone (sortie du filtre en fibre de verre et port d'alimentation), les embout du condenseur et du port d'échantillonnage)
- Envelopper avec du papier aluminium l'entonnoir placé sur le bioréacteur et le condenseur en entier
- Placer un bout d'autocollant indicateur de stérilité sur le réacteur
- Stériliser le bioréacteur et le condenseur à l'autoclave pendant 45 min (cycle liquide) à 121 °C.
- Dès que la pression a atteint 0 psi, le bioréacteur et le condenseur sont retirés de l'autoclave
- Vérifier si l'autocollant a bien changé de couleur sinon recommencer la stérilisation
- Vérifier sur l'indicateur de l'autoclave si le cycle s'est correctement déroulé, sinon recommencer la stérilisation
- Noter la date et l'heure de la stérilisation dans le tableau mis dans la section 9 (formulaires/enregistrements)

### **7.3 Refroidissement du bioréacteur**

- Nettoyer la hotte à l'éthanol
- Amener rapidement le bioréacteur et le condenseur encore chauds sous la hotte stérile
- Serrer l'écrou de la sonde O<sub>2</sub>
- Brancher les sondes aux lecteurs respectifs (polarisation nécessaire avant l'inoculation)
- Connecter les lecteurs au système de contrôle et d'acquisition de données
- Laisser refroidir (environ 12h) pour atteindre la température ambiante (25°C) sous la hotte stérile

- A partir de ce moment le bioréacteur et le milieu sont stériles et doivent rester exempt de toute contamination
- Après 24 h, calibrer la sonde O<sub>2</sub> par injection d'air pour le 100%, alors que le 0% est fixé par coupure de la connexion électrique

#### 7.4 Inoculation

L'inoculation se déroule sous la hotte horizontale à flux laminaire, pour conserver l'asepsie.

- Stériliser la surface de travail et ses mains avec l'éthanol 70 %
- Retirer le papier aluminium de l'entonnoir tout en maintenant le couvercle de la boîte de Petri sur l'entonnoir
- Peser le flacon contenant la suspension cellulaire et noter son poids (masse flacon rempli) dans le Tableau A.3 mis en section 9
- Passer le col du flacon au bec Bunzen
- Soulever le couvercle de la boîte de Petri de façon aseptique
- Introduire la suspension par l'entonnoir
- De nouveau, déposer le couvercle de la boîte de Petri sur l'entonnoir
- Peser le flacon vide et noter son poids (masse flacon vide) mis en section 9 (formulaire/enregistrements). De cette façon le poids de suspension introduit est connu (biomasse flacon = masse flacon rempli – masse flacon vide) et noter dans le Tableau A.3 mis en section 9
- Refaire l'opération pour les trois autres flacons
- Pour avoir environ 833 gramme de suspension cellulaire au total dans le bioréacteur, pour le dernier flacon (biomasse flacon 4) il faut introduire seulement 833 - (biomasse flacon 1 + biomasse flacon 2 + biomasse flacon 3) gramme de suspension

Comme

$$biomasse_{flacon1} + biomasse_{flacon2} + biomasse_{flacon3} + biomasse_{flacon4} = 833g$$

Nous avons

$$biomasse_{flacon4} = 833g - biomasse_{flacon1} - biomasse_{flacon2} - biomasse_{flacon3} - biomasse_{flacon3}$$

- Enlever le papier aluminium et la feuille de plastique entourant le condenseur
- Enlever l'entonnoir et le couvercle de la boîte de Pétri
- Passer l'embout du condenseur au bec Bunzen
- Insérer rapidement le condenseur encore chaud dans le port d'inoculation
- Noter la date et l'heure d'inoculation dans le tableau A.3 mis en section 9

### 7.5 Mise en fonctionnement

- Ajuster la pression à 15 psi sur le détendeur d'alimentation air
- Ajuster la pression à 15 psi sur la bonbonne de O<sub>2</sub>
- Imposer une consigne de 100 mL.min<sup>-1</sup> pour les deux contrôleurs massiques
- Mettre en marche la circulation d'eau froide pour le système de condensation
- Lancer le moteur d'agitation à une vitesse de 60 rpm dans le sens horaire (pompage du liquide vers le haut)

Les paramètres opératoires sont résumés dans le tableau A.2.

**Tableau A.2** Paramètres opératoires de culture

Paramètres de culture		Valeurs
Température		25 ± 2 °C
Pression d'alimentation		15 psi
Vitesse d'agitation		60 rpm
Sens d'agitation		Horaire (pompage vers le haut)
Luminosité		Réduite (parois recouvertes)
Ratio d'inoculation		33 % (cellules de 11 jours)
Elicitation		160 mL.L <sup>-1</sup> (jour 4)
Paramètre contrôlé		Valeur
O <sub>2</sub> dissous		60 % saturation d'air

## 7.6 Echantillonnage

Le volume prélevé quotidiennement ne peut pas dépasser 30 mL (les sondes doivent être constamment immergées dans le milieu de culture)

### 7.6.1 Préparation des flacons d'échantillonnage

- Connecter au flacon un filtre PTFE à la sortie d'air à l'aide d'un tuyau en silicone (1¼" I.D. et 3⁄8" O.D.).
- Déposer un bouchon d'aluminium sur le col du flacon et sur la sortie du filtre
- Stériliser les flacons à l'autoclave pendant 25 min à 121 °C

### 7.6.2 Le 1<sup>er</sup> jour

Après l'inoculation, le premier échantillon noté J0 sera directement prélevé. Il sera nécessaire de travailler en condition aseptique sous la flamme d'un bec Bunzen pour retirer le papier d'aluminium entourant le port d'échantillonnage, puis la feuille de plastique, suivi du coton.

- Peser 1 flacon stérile d'échantillonnage
- Dans la zone d'asepsie, retirer le papier d'aluminium du flacon et le coton de l'embout de verre
- Introduire très rapidement l'embout de verre dans le flacon d'échantillonnage
- Attendre 30 s, pour laisser refroidir le port d'échantillonnage
- Desserrer la pince métallique et laisser écouler dans le flacon un volume de 30 mL de suspension cellulaire, suffisant pour les analyses ultérieures
- Resserrer la pince métallique, laisser écouler quelques minutes pour récupérer la suspension résiduelle dans le tuyau
- Sous la flamme, séparer l'embout de verre du flacon d'échantillonnage
- Introduire le port d'échantillonnage dans le flacon d'éthanol (n°20)
- Refermer le flacon d'éthanol contenant le port d'échantillonnage par un parafilm
- Noter la date et l'heure de prélèvement dans le tableau A.3 mis en section 9
- Peser le flacon après l'échantillonnage pour connaître la masse prélevée dans le bioréacteur et noter la masse de suspension dans le tableau A.3 mis en section 9

### 7.6.3 Du 2<sup>ème</sup> au 11<sup>ème</sup> jour

Chaque jour un échantillon noté Ji sera prélevé en condition aseptique sous la flamme d'un bec Bunzen

- Peser 1 flacon stérile d'échantillonnage
- Dans la zone d'asepsie, retirer le port d'échantillonnage du flacon d'éthanol et retirer le papier d'aluminium du flacon d'échantillonnage
- Introduire très rapidement l'embout de verre dans le flacon d'échantillonnage

- Attendre 30 s, pour laisser refroidir le port d'échantillonnage
- Desserrer la pince métallique
- Dans le cas où des cellules sont présentes dans le tuyau d'échantillonnage, souffler doucement dans le filtre PTFE du flacon d'échantillonnage afin de les remettre en suspension dans le bioréacteur et assurer un échantillon homogène.
- Ensuite, laisser écouler dans le flacon un volume de 30 mL de suspension cellulaire, suffisant pour les analyses ultérieures
- Resserrer la pince métallique, laisser écouler quelques minutes pour récupérer la suspension résiduelle dans le tuyau
- Sous la flamme, séparer l'embout de verre du flacon d'échantillonnage
- Introduire le port d'échantillonnage dans le flacon d'éthanol (n°20)
- Refermer le flacon d'éthanol contenant le port d'échantillonnage par un parafilm
- Noter la date et l'heure de prélèvement dans le tableau A.3 mis en section 9
- Peser le flacon après l'échantillonnage pour connaître la masse prélevée dans le bioréacteur et noter la masse de suspension dans le tableau A.3 mis en section 9

## **7.7 Elicitation**

### **7.7.1 Préparation de la solution de chitine**

- Remplir une éprouvette graduée de 100 mL de milieu de culture
- Moudre environ la moitié de la quantité totale de chitine pesée ( $\pm 1$  g) au pilon dans le mortier pendant 2 min
- Ajouter dans le mortier  $\pm 10$  mL de milieu de culture contenu dans l'éprouvette
- Moudre la suspension contenue dans le mortier pendant 2 min
- Verser cette suspension dans l'Erlenmeyer
- Moudre la poudre de chitine restante ( $\pm 1$  g) au pilon dans le mortier pendant 2 min
- Ajouter dans le mortier  $\pm 10$  mL de milieu de culture contenue dans l'éprouvette
- Verser la suspension et le restant de milieu de culture ( $\pm 280$  mL) dans l'Erlenmeyer
- Ajouter un barreau magnétique dans l'Erlenmeyer
- Mettre un bouchon d'aluminium et autoclaver le flacon pendant 30 min (cycle liquide) à 121 °C
- Laisser refroidir sous agitation jusqu'à température ambiante
- Filtrer la solution sous vide sur deux couches de Miracloth avec l'entonnoir magnétique de filtration

### **7.7.2 Injection de la solution de chitine dans le flacon d'alimentation**

- Connecter le tuyau de silicone à l'embout de sortie du flacon d'alimentation en Pyrex
- Fermer le tuyau par une pince métallique

- Verser 400 mL de solution de chitine dans le flacon
- Placer le coton dans le col du flacon
- Recouvrir le coton par un bouchon d'aluminium
- Connecter le tuyau de silicone au port d'alimentation du couvercle (n°2)

### **7.7.3 Injection de la solution de chitine dans le réacteur**

Au jour 4 de la culture, procéder à l'élicitation :

- Introduire le tuyau du flacon d'alimentation dans la tête de pompe
- Ouvrir la pince métallique du tuyau de silicone du flacon d'alimentation en Pyrex
- Ecouler lentement la solution dans le réacteur en activant la pompe
- Noter la date et l'heure d'injection de chitine dans le tableau A.3 mis en section 9

## **7.8 Suivi du pH et de l'O<sub>2</sub> dissous**

L'oxygène dissous est contrôlé à l'aide des contrôleurs massiques avec une fréquence d'acquisition de 30s. Le programme de contrôle agit chaque minute tel que la concentration en O<sub>2</sub> est toujours plus élevée que 60% sat. air

Le débit d'alimentation des gaz est composé d'un mélange d'air et d'O<sub>2</sub> pur:

- Valeur initiale du contrôleur massique d'air = 100 mL.min<sup>-1</sup>
- Valeur initiale du contrôleur massique O<sub>2</sub> = 0 mL.min<sup>-1</sup>
- Si déficit en O<sub>2</sub> (< 60% sat. air), augmentation débit air jusqu'à la valeur maximale de 200 mL.min<sup>-1</sup>
- Si débit air > 200 mL.min<sup>-1</sup>, ouverture du contrôleur massique d'O<sub>2</sub> pour enrichir l'air
- Si concentration = 50/50, augmentation du débit total à 400 mL.min<sup>-1</sup>
- La pression de 15 psi doit être vérifiée quotidiennement sur l'alimentation en air et en O<sub>2</sub>

## **8. CONSIGNES EN CAS DE PROBLÈMES**

- Porter un sarreau et des lunettes de protection
- Porter des gants lors de toute manipulation de produits corrosifs ou dangereux
- Respecter les conditions d'asepsie en travaillant sous la hotte ou sous le bec Bunzen comme indiqué dans le protocole
- Être prudent avec la manipulation du gaz, fermer l'alimentation après chaque utilisation

## **9. FORMULAIRES / ENREGISTREMENTS**

Tableau A.3 Tableau de prise de données lors d'une culture

<b>Stérilisation du bioréacteur</b>	Date	Heure	commentaires
<b>Inoculation</b>	Date	Heure	commentaires
	masse flacon rempli	masse flacon vide	biomasse flacon (= flacon rempli- flacon vide)
flacon 1			
flacon 2			
flacon 3			
flacon 4			
Somme totale			
<b>Echantillonnage</b>	Date	Heure	poids prélevé (g)
Jour 0			
Jour 1			
Jour 2			
Jour 3			
Jour 4			
Jour 5			
Jour 6			
Jour 7			
Jour 8			
Jour 9			
Jour 10			
<b>Injection de la solution chitine</b>	Date	Heure	commentaires

## **Annexe C** Protocole de laboratoire PL-CULT-006

Injection de résines XAD-7 dans une suspension d'*Eschscholtzia californica*  
élicitee en bioréacteur de 3-L

1	OBJECTIFS .....	136
2	CHAMPS D'APPLICATION ET D'UTILISATION.....	136
3	RESPONSABILITÉ .....	136
4	PRINCIPES.....	136
5	RÉFÉRENCES .....	136
6	MATÉRIEL, RÉACTIFS ET INSTRUMENTS .....	137
	6.1 PREPARATION DES RESINES .....	137
	6.2 PREPARATION DE LA SOLUTION CHITINE-RESINES .....	137
	6.3 INJECTION DE LA SOLUTION CHITINE-RESINES .....	137
7	MATÉRIEL, RÉACTIFS ET INSTRUMENTS .....	137
	7.1 PREPARATION DES RESINES .....	137
	7.2 INJECTION DE LA SOLUTION CHITINE-RESINES DANS LE FLACON	
	D'ALIMENTATION.....	138
	7.3 INJECTION DE LA SOLUTION DE CHITINE-RESINES .....	139
8	CONSIGNES EN CAS DE PROBLÈMES .....	139
9	FORMULAIRES / ENREGISTREMENTS.....	139

## 1. OBJECTIFS

Cette procédure d'opération a pour objectif de définir la marche à suivre pour injecter des résines contenues dans une solution élicitrice à une suspension d'*Eschscholtzia californica* en bioréacteur.

## 2. CHAMPS D'APPLICATION ET D'UTILISATION

S'applique à toute injection de résines contenues dans une solution élicitrice à une culture en suspension d'*Eschscholtzia californica* en bioréacteur.

## 3. RESPONSABILITÉ

Il est de la responsabilité de chacun de suivre les instructions de cette PON.

## 4. PRINCIPES

Une solution contenant les billes de résines XAD-7 et l'agent éliciteur (la chitine) est injectée dans le bioréacteur après 4 jours de culture, tel que la concentration soit de 50 g.L<sup>-1</sup> en résines, et de 160 mL.L<sup>-1</sup> en extrait de chitine (Lamboursain, 2004).

## 5. RÉFÉRENCES

Les documents suivants seront requis :

LAMBOURSAIN, L. 2004. «Études des liens entre le statut nutritionnel des cellules de plantes et leur capacité à produire des métabolites secondaires». 212p. Thèse de doctorat en Génie Chimique. Ecole Polytechnique de Montréal.

Les protocoles d'opération normalisés (PON) suivants seront requis :

PL-ANA-001  
PL-ANA-005  
PL-CULT-002  
PL-CULT-004  
PL-CULT-005

## **6. MATÉRIEL, RÉACTIFS ET INSTRUMENTS**

### **6.1 Préparation des résines**

#### **6.1.1 Conditionnement des résines**

- 1 Erlenmeyer de 1 L (Corning, Fisher, No. 10-040K)
- 300 g sec d'Amberlite XAD-7 (Sigma, No. XAD-7)
- 700 mL de méthanol pur (Fisher, No. A452-4)
- Parafilm (Fisher, No. 13-374-10)
- Shaker (New Brunswick Scientific Co., No. G10)

#### **6.1.2 Filtration des résines**

- 1 Erlenmeyer de 1 L (Corning, Fisher, No. 10-040K)
- 1 bécher de 1 L (Corning, Fisher, No. 02-540P)
- Grillage en nylon de 400  $\mu$ m d'ouverture (Spectrum Laboratories, No. 145564)

#### **6.1.3 Stockage des résines**

- Autoclave (STERIS, amsc century medium steam sterilizers)
- Autocollant indicateur de stérilité (Fisher, No. 11-875-50)
- Papier d'aluminium

### **6.2 Préparation de la solution chitine-résines**

- 400 mL de solution chitine (voir préparation de la solution de chitine dans la procédure de laboratoire PL-CULT-005-R0)
- 1 flacon en Pyrex de 500 mL contenant un tube de sortie (Corning, VWR, No. 16331-303)
- 1 pince métallique de serrage (Cole-Parmer, No. A08028-00)
- Tuyau de silicone (1/4" I.D. et 3/8" O.D., Fisher, No. 14-169-15)
- 1 pipette pasteur en verre (Fisher, No. 13-678-20E)
- Papier d'aluminium
- Coton

### **6.3 Injection de la solution chitine-résines**

- 1 pompe péristaltique (Masterflex, Cole-Parmer, No. A77521)
- 1 tête de pompe Easy load II (Masterflex, Cole-Parmer, No. 77390-00)

## **7. MATÉRIEL, RÉACTIFS ET INSTRUMENTS**

### **7.1 Préparation des résines**

### **7.1.1 Conditionnement des résines**

- Peser 300g sec de résines dans l'Erlenmeyer
- Ajouter le méthanol de façon à recouvrir les résines d'une épaisseur de 2.5 - 5 cm
- Fermer l'Erlenmeyer avec du parafilm
- Déposer l'Erlenmeyer sur le shaker et laisser agiter 24 h minimum
- Laisser décanter les résines et enlever le méthanol en le transvasant
- Recommencer les 4 dernières étapes 4 fois avec de l'eau déionisée, de façon à éliminer toute trace de méthanol
- Ne pas retirer l'eau distillée lors de la dernière opération
- Garder les résines contenues dans l'eau de l'Erlenmeyer pour l'étape de filtration

### **7.1.2 Filtration des résines**

- Etendre le grillage au dessus du bécher
- Filtrer par gravité la solution de résines sur le grillage
- Mettre les résines retenues par le filtre dans un Erlenmeyer. Les résines contenues dans le filtrat sont inutiles pour le procédé, car trop fines
- Ajouter de l'eau déionisée de façon à recouvrir les résines d'une épaisseur de 2.5 - 5 cm
- Stocker les résines dans l'eau deionisée

### **7.1.3 Stockage des résines**

- Placer un autocollant indicateur de stérilité et un bouchon d'aluminium sur l'Erlenmeyer contenant les résines filtrées et conditionnées
- Autoclaver l'Erlenmeyer pendant 30 min (cycle liquide) à 121 °C
- Vérifier si l'autocollant a changé de couleur sinon recommencer la stérilisation
- Vérifier sur l'indicateur de l'autoclave si le cycle s'est correctement déroulé, sinon recommencer la stérilisation
- Conserver les résines contenues dans l'eau de l'Erlenmeyer à température ambiante jusqu'à leur utilisation

## ***7.2 Injection de la solution chitine-résines dans le flacon d'alimentation***

- Connecter le tuyau de silicone à l'embout de sortie du flacon Pyrex d'alimentation
- Fermer le tuyau par une pince métallique
- Verser 400 mL de solution de chitine dans le flacon d'alimentation
- Éliminer l'eau contenue dans l'Erlenmeyer contenant les résines conditionnées et filtrées
- Prélever 125 g de résines humides en utilisant une pipette pasteur pour éliminer l'excès d'eau
- Injecter les résines dans le flacon d'alimentation, par transvasement

- Placer le coton dans le col du flacon
- Recouvrir le coton par un bouchon d'aluminium
- Connecter le tuyau de silicone au port d'alimentation du couvercle (n°2)

### ***7.3 Injection de la solution chitine-résines dans le réacteur***

Au jour 4 de la culture, procéder à l'injection de la solution chitine-résines

- Introduire le tuyau du flacon d'alimentation dans la tête de pompe
- Ouvrir la pince métallique du tuyau de silicone
- Ecouler lentement la solution dans le réacteur en activant la pompe
- Noter la date et l'heure d'injection de la solution chitine-résines dans le tableau A.4 mis dans le section 9 (formulaires/ enregistrements)

## **8. CONSIGNES EN CAS DE PROBLÈMES**

- Porter un sarreau et des lunettes de protection
- Porter des gants lors de toute manipulation de produits corrosifs ou dangereux

## **9. FORMULAIRES / ENREGISTREMENTS**

**Tableau A.4** Tableau de prise de données lors de l'injection des résines

Injection de la solution chitine-résines	date	heure	commentaires

**Annexe D** Tableau complet de prise de données lors des échantillons

Tableau A.5 Tableau complet de prise de données lors des échantillons

**ECHANTILLON J0**

<b>date</b>	
<b>heure</b>	
<b>poids prélevé</b>	
<b>pH</b>	
<b>Observation</b>	
<b>mesures</b>	<b>résultats [g]</b>
poids humide Al	
poids humide	
poids nacelle	
poids sec total	
poids sec	

**ECHANTILLON J1**

<b>date</b>	
<b>heure</b>	
<b>poids prélevé</b>	
<b>pH</b>	
<b>Observation</b>	
<b>mesures</b>	<b>résultats [g]</b>
poids humide Al	
poids humide	
poids nacelle	
poids sec total	
poids sec	

**Annexe E**    Résultat de la deuxième culture en mode perfusé

Une seconde culture en mode perfusé a été réalisée afin de comparer les résultats obtenus au niveau de la production par rapport à la première culture perfusée. Cette culture a été interrompue au jour 8, à cause d'une fuite de liquide occasionnée par le colmatage d'une colonne de résines.

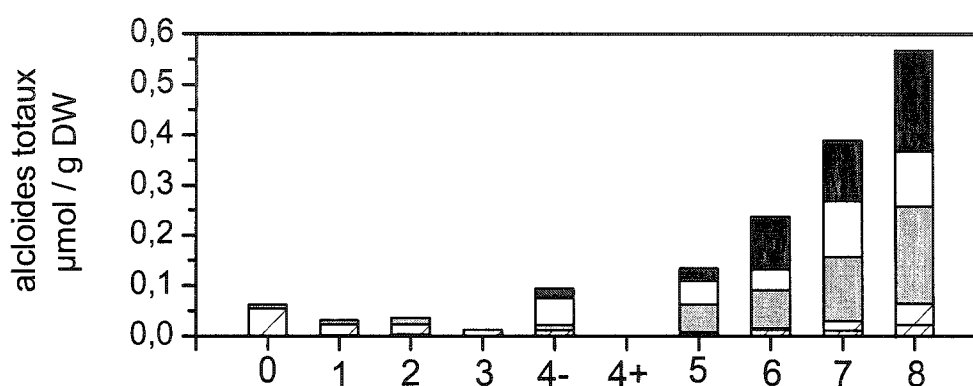
## 1. Méthodes

Les méthodes utilisées durant cette culture ont été identiques à la première culture, mis à part au niveau de l'extraction. En effet, pour cette culture, les résines des colonnes d'extraction étaient compactées et non fluidisées. De plus, quatre colonnes cylindriques en verre de même configuration (17 mm I.D.) ont travaillé simultanément. Chaque colonne de sédimentation était directement reliée à une colonne de résines. Les quantités de résine introduites dans les quatre colonnes étaient de 41 g, 41 g, 44 g et 45 g. La totalité des résines a été retirée des colonnes et analysée à la fin de la culture (jour 8).

## 2. Résultats

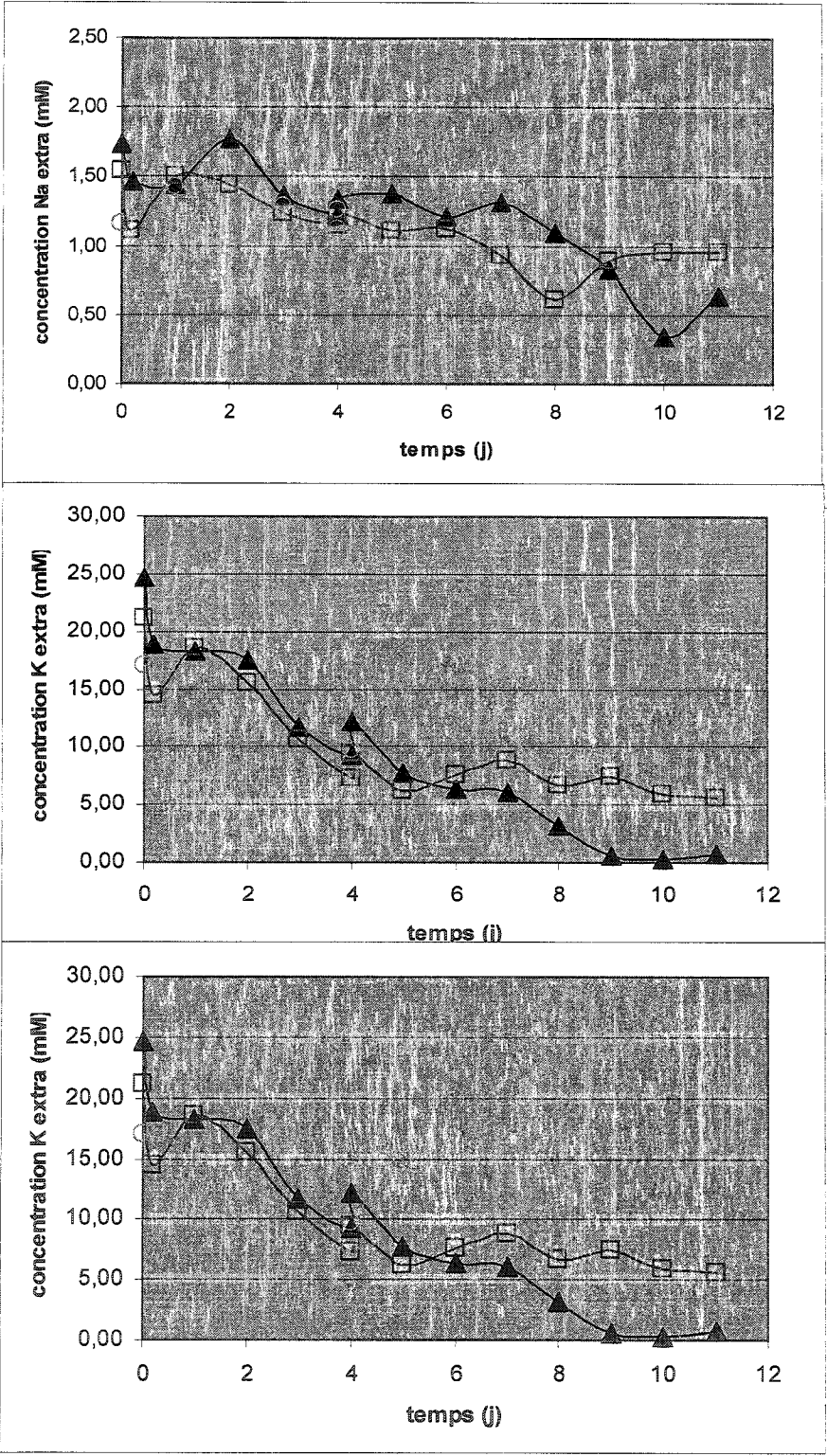
Les niveaux de production ont été fort semblables malgré la différente conception d'extraction. Les productions d'alcaloïdes au niveau intracellulaires sont données au cours du temps à la Figure A.3. Le dernier jour, la concentration intracellulaire était de  $0.57 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$  alors que  $0.39 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$  ont été obtenus dans le cas de la première culture pour le jour 8. Une concentration de 1.39

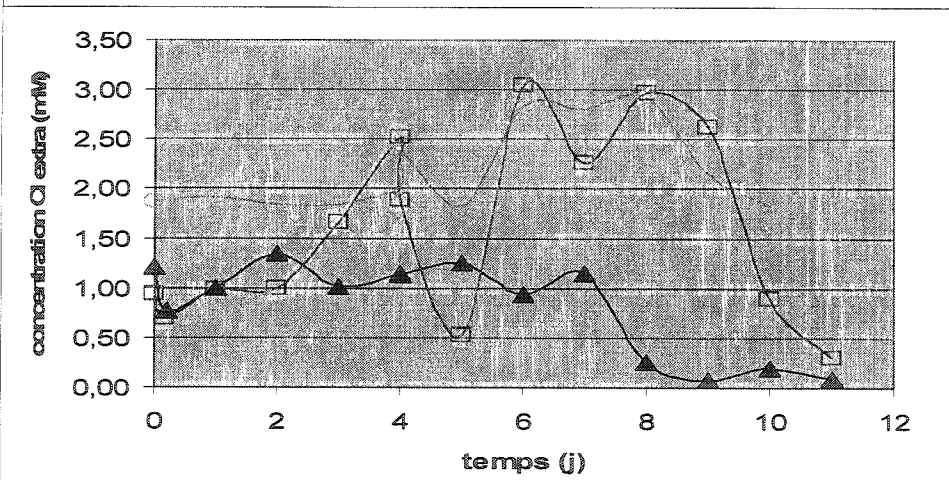
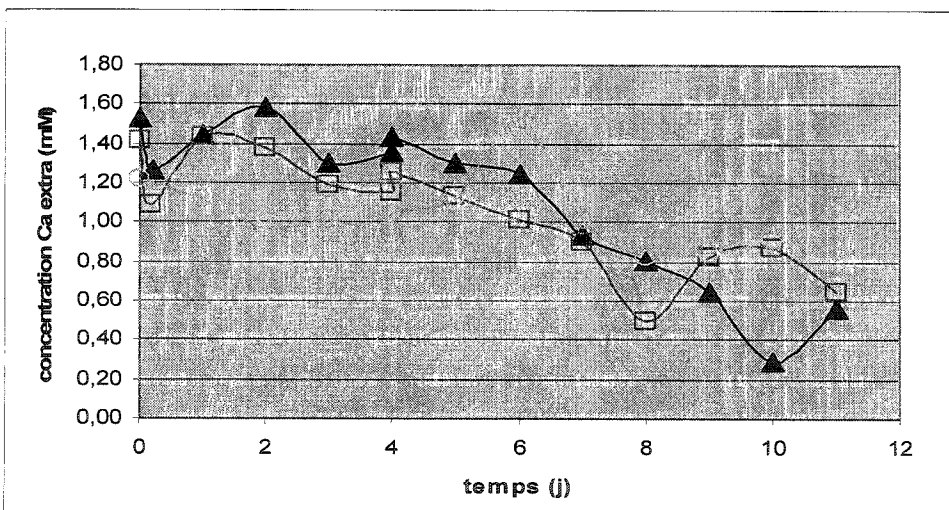
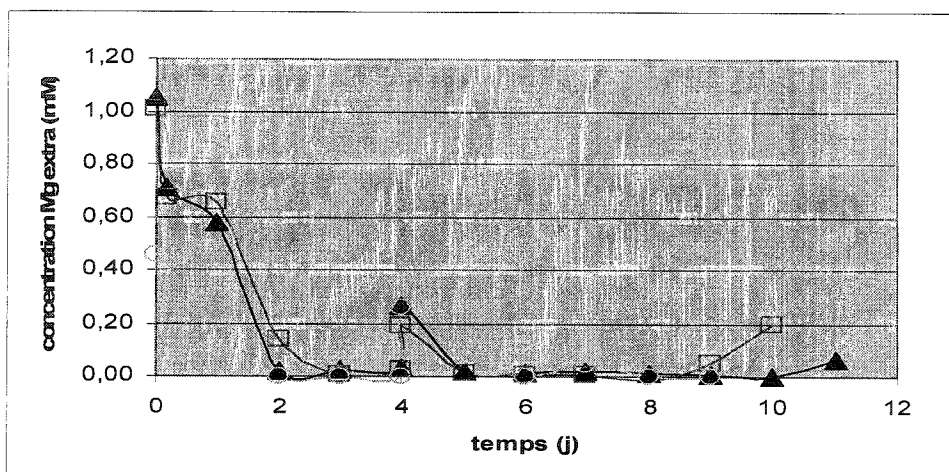
$\mu\text{mole.gDW}^{-1}$  a été atteinte dans les résines. Résultat également du même ordre de grandeur que la première culture où la concentration était de  $1.41 \mu\text{mole.gDW}^{-1}$ . Cette culture montre ainsi la reproductibilité des cultures en mode perfusé.

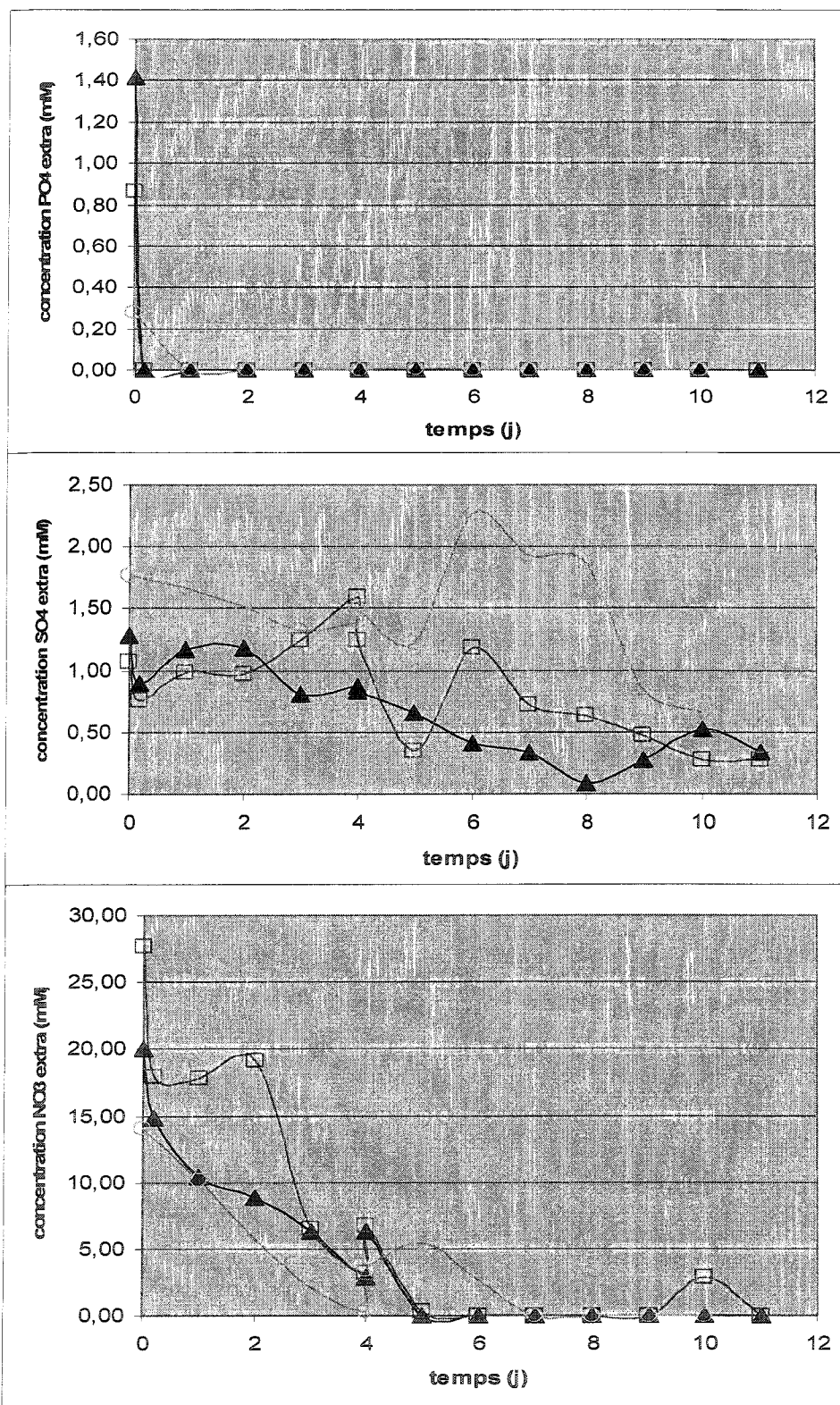


**Figure A.3** Production d'alcaloïdes intracellulaires au cours du temps pour la deuxième culture en mode perfusé. Jour 0 = jour d'inoculation, jour 4- = jour 4 avant l'éllicitation (30 min) et jour 4+ = jour 4 après l'éllicitation (30 min). Hachuré dense vers la droite = sanguinarine, hachuré large vers la gauche = chelerythrine, gris clair = chelerythrine, blanc = chelilutine, gris foncé = macarpine.

**Annexe F**    Nutriments et sucres extracellulaires au cours du temps pour  
différentes conditions opératoires de cultures







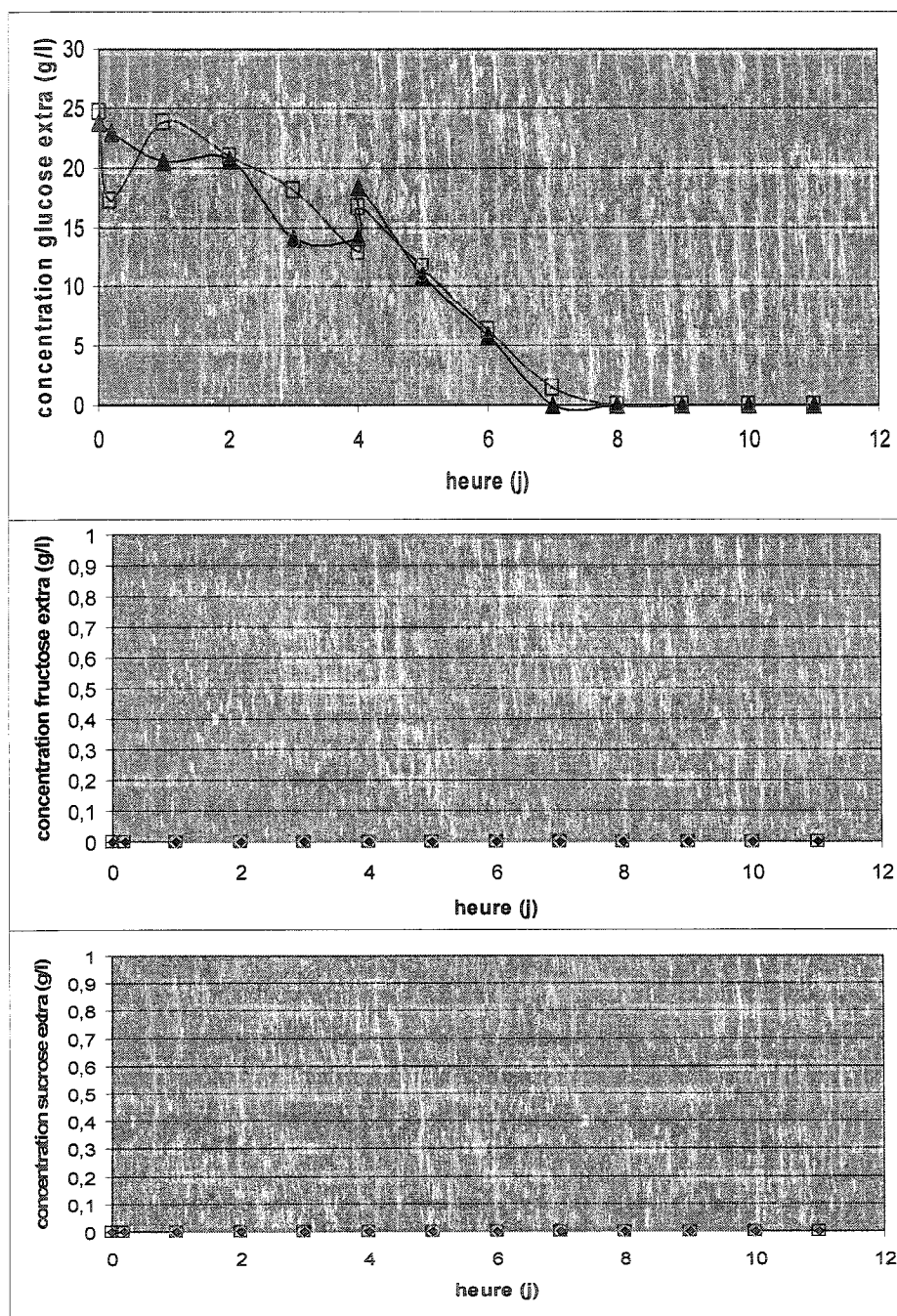
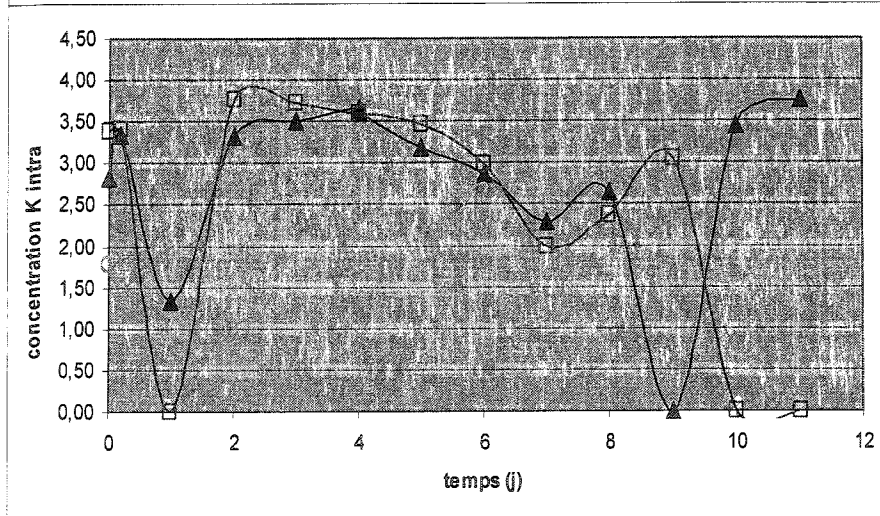
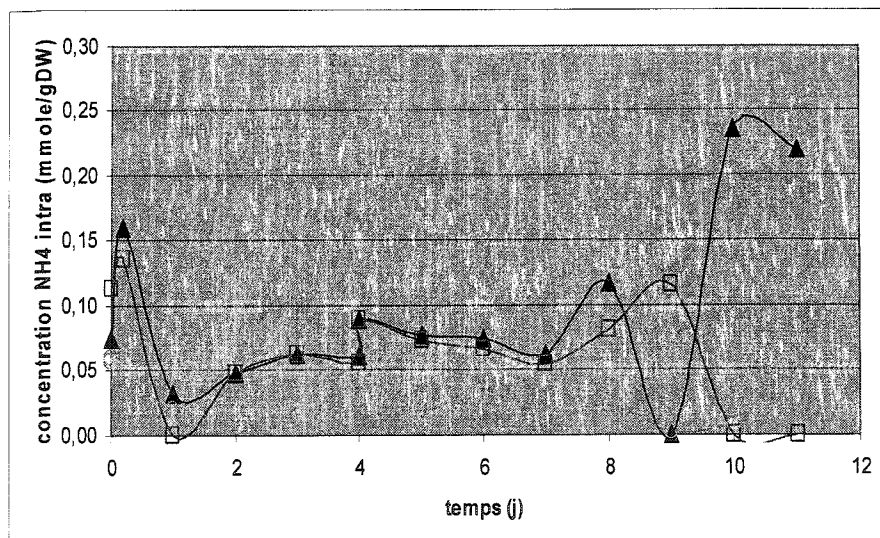
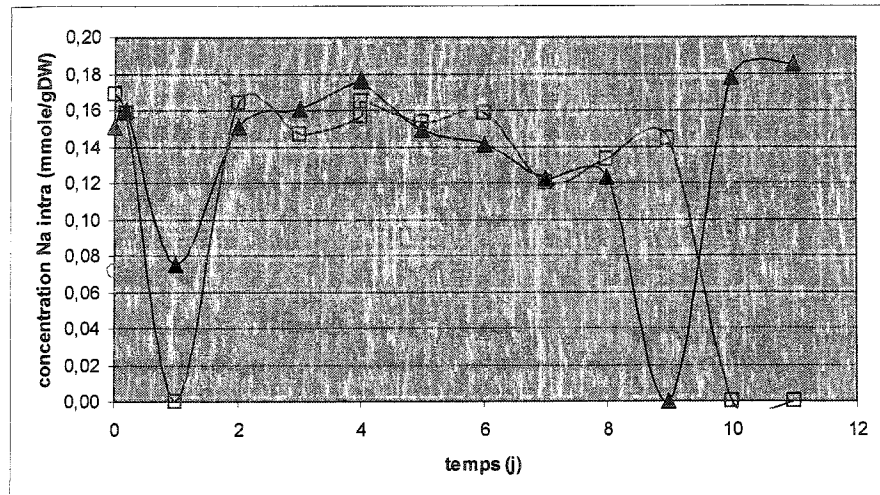
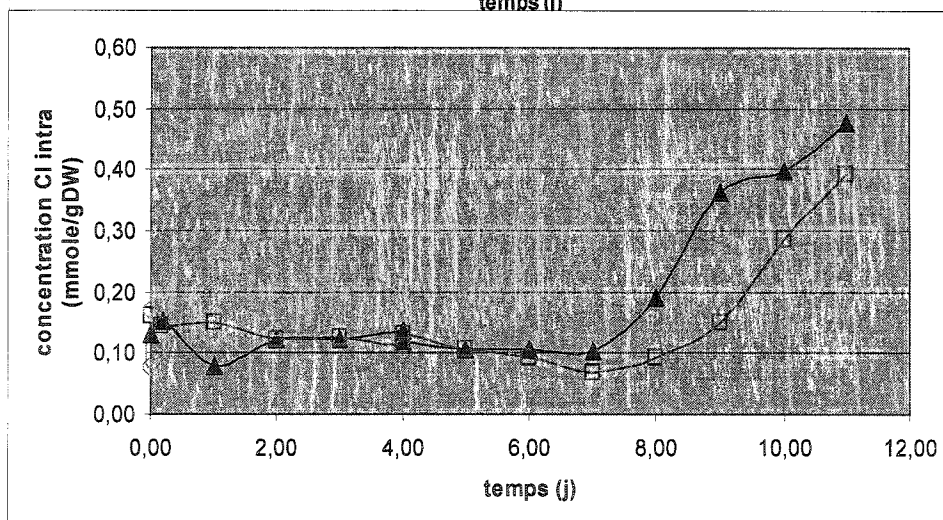
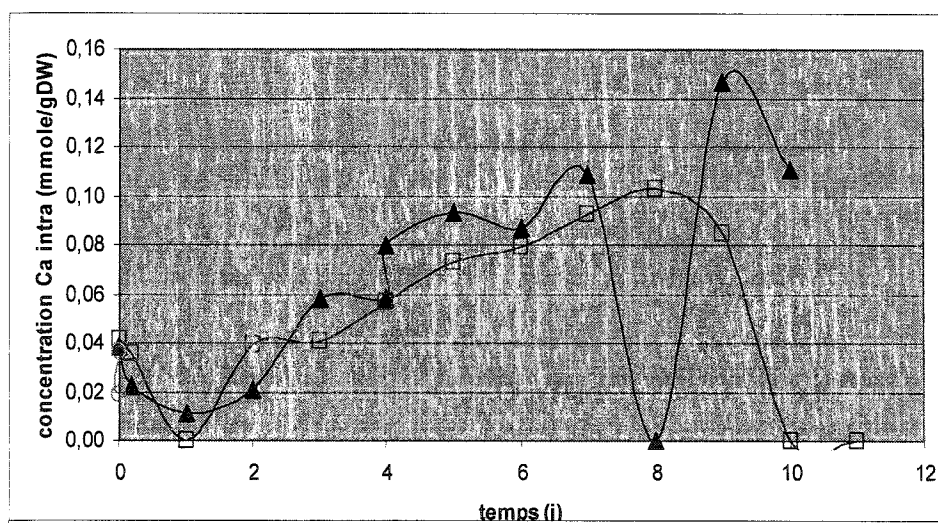
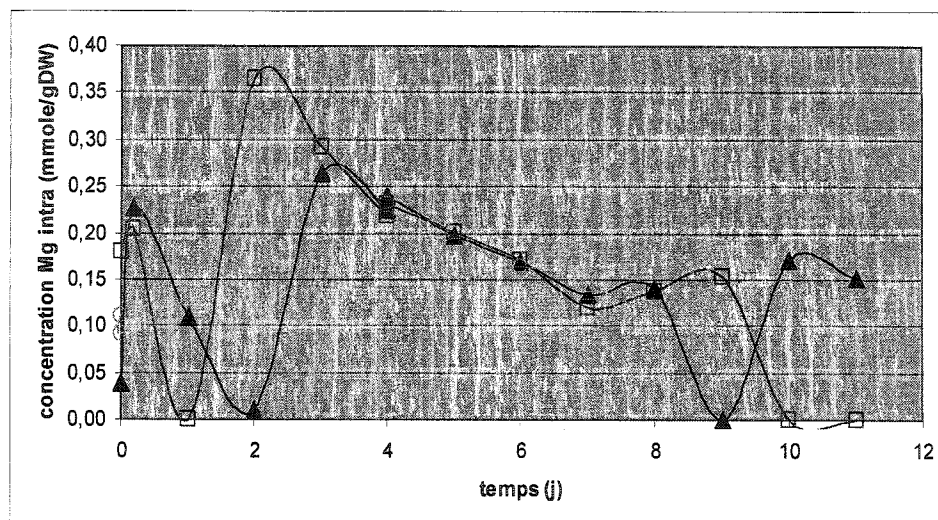
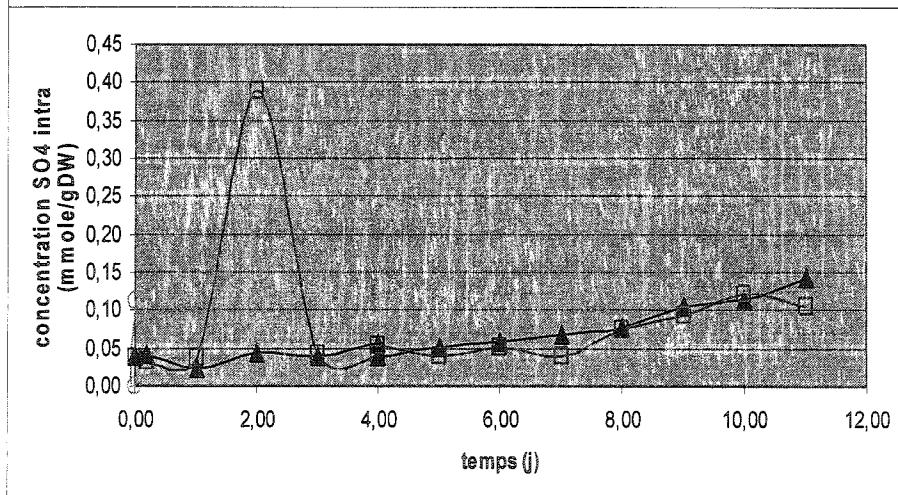
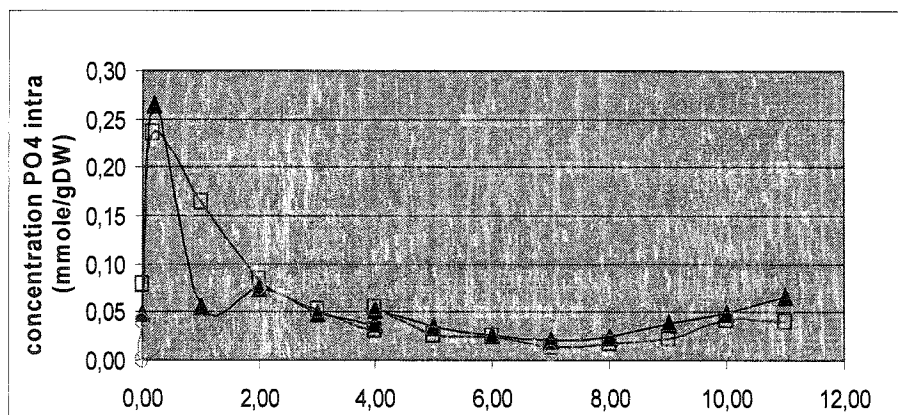
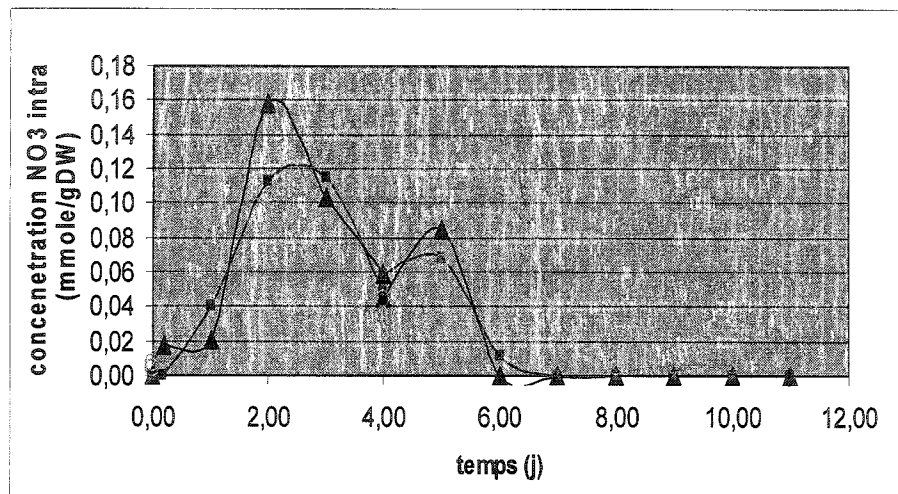


Figure A.4 Nutriments et sucres extracellulaires au cours du temps pour différentes conditions opératoires de culture. (■) bioréacteur sans phase d'extraction; (♦) bioréacteur contenant des résines en suspension; (-) bioréacteur perfusé.

**Annexe G**    Nutriments et sucres intracellulaires au cours du temps pour  
différentes conditions opératoires de cultures







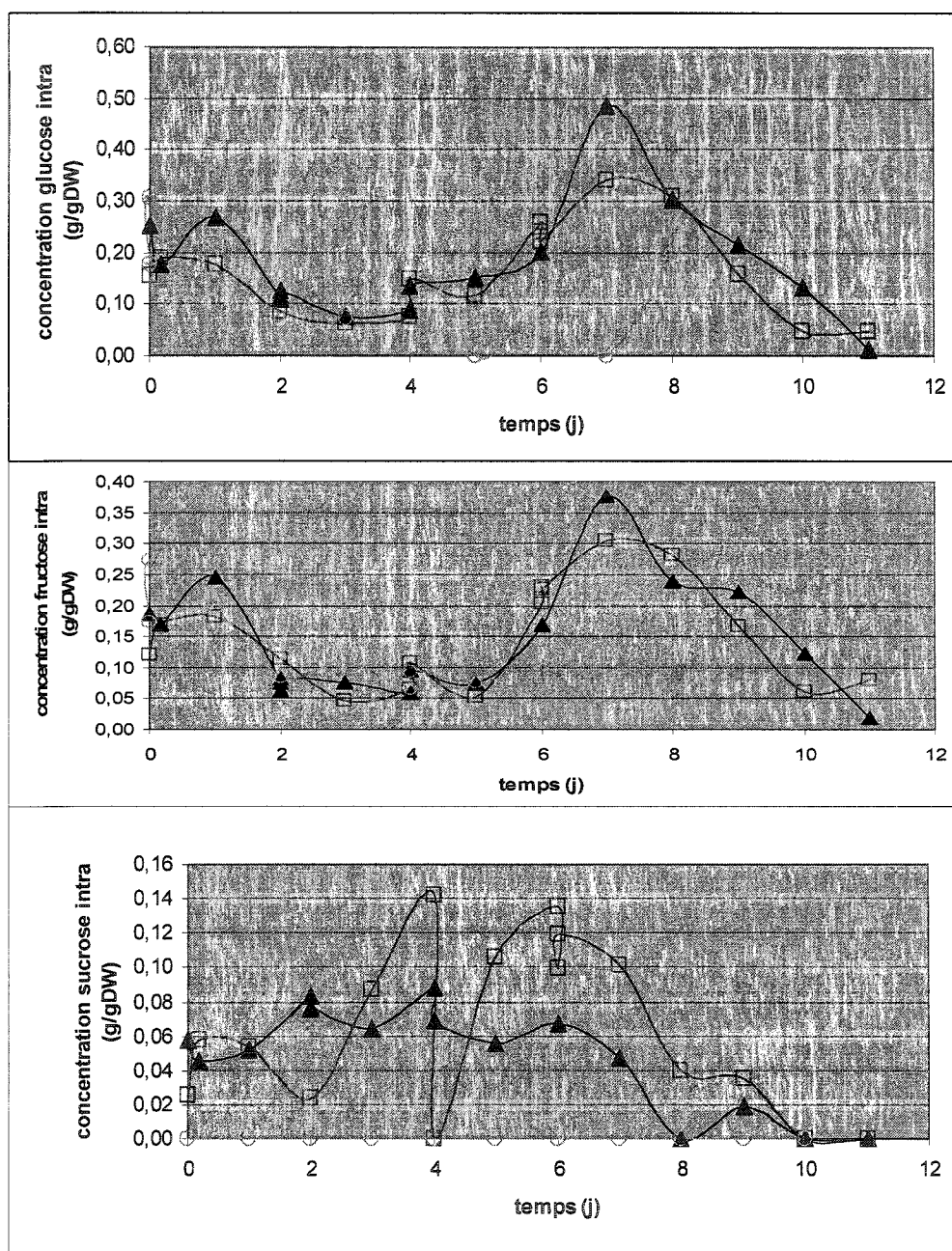


Figure A.5 Nutriments et sucres intracellulaires au cours du temps pour différentes conditions opératoires de culture. (■) bioréacteur sans phase d'extraction; (◆) bioréacteur contenant des résines en suspension; (○) bioréacteur perfusé.