UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DES LIENS ENTRE LE STATUT NUTRITIONNEL DES CELLULES DE PLANTE ET LEUR CAPACITÉ À PRODUIRE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES

LAURENCE LAMBOURSAIN
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE CHIMIQUE)
AOÛT 2004

©Laurence Lamboursain, 2004.

Library and Archives Canada

Published Heritage Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et Archives Canada

Direction du Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 0-612-98181-9
Our file Notre référence
ISBN: 0-612-98181-9

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 protège 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.

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

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

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

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

ÉTUDE DES LIENS ENTRE LE STATUT NUTRITIONNEL DES CELLULES DE PLANTE ET LEUR CAPACITÉ À PRODUIRE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES

présentée par : LAMBOURSAIN Laurence

en vue de l'obtention du diplôme de: Philosophiae Doctor

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

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., président

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

M. AUBIN Yves, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre

M. PLAXTON William C., Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le professeur Mario Jolicoeur pour sa patience tout au long de cette thèse ainsi que pour m'avoir permis de diversifier mon expérience au travers d'activités d'enseignement et d'encadrement d'étudiants.

Je remercie également M. Yves Aubin, mon codirecteur qui m'a donné une formation de base en RMN. Merci à Caroline Hoemann et au professeur Michael Buschmann de m'avoir ouvert la porte de leur laboratoire et de m'avoir acceptée comme auditeur libre dans un de leur cours. J'ai découvert grâce à eux plusieurs techniques utilisées en culture de cellules animales qui m'ont particulièrement inspirée.

Merci à mes collègues et amis étudiants rencontrés au détour d'une centrifugeuse ou d'un lyophilisateur, tout particulièrement à Karine Labour compagne de galère, de délires et de muffin double chocolat.

Merci à toute l'équipe de soutien technique et administratif de l'École Polytechnique, qui, au cours des années, s'est révélée être d'un précieux secours, dans le désordre : Gino, Jean, Carol, Louise, Lyne, Chantal, Chantal (non, je ne begaye pas !) et tous les autres....

Un remerciement tout particulier à toute ma famille, notamment à Sylvain sans lequel cette thèse n'aurait jamais été finie. Je la lui dédie car elle est finalement sienne presque autant que mienne (enfin si je ne l'ai pas c'est la sienne). Et merci à ma sœur Séverine, pour son aide psychologique, logistique et orthographique. Heureusement que vous étiez la tous quand j'en avais besoin...

Pour la dernière ligne droite : merci au soleil du sud de la Franc et au bon vin rosé.

Merci enfin au pavot de Californie et à ses cellules, fidèles au poste bien que toujours aussi capricieuses. Décidément les voies du métabolisme secondaire sont impénétrables mais doucement on avance ! ;-)

RÉSUMÉ

La culture de cellules de plante *in vitro* est une source potentielle de phytomolécules à haute valeur ajoutée. Cependant malgré plus de 40 ans de recherches dans le domaine de la biotechnologie végétale seulement une poignée de molécules sont aujourd'hui produites commercialement à partir de culture de cellules de plantes. Cet échec au niveau industriel est en parti attribuable au manque de reproductibilité de la production et à la perte de capacité de production des cellules de plantes lors de la culture à long terme. Le but de ce travail était d'étudier l'influence du statut nutritionnel des cellules de plantes sur leur capacité à produire des métabolites secondaires. Nous voulions entre autre vérifier si le manque de reproductibilité au niveau de la production pouvait être attribuable à des variations du statut nutritionnel des cellules.

Nous avons utilisé lors de cette étude une suspension cellulaire *d'Eschscholtzia californica* (EC) générée il y a plusieurs années mais qui a conservé sa capacité à produire des alcaloïdes au fil des repiquages. Dans un premier temps nous avons développé plusieurs outils pour caractériser l'état physiologique et le statut nutritionnel des cellules végétales. Un respiromètre spécifiquement adapté aux cellules végétales a été développé et caractérisé. Une nouvelle méthode de mesure de la concentration cellulaire utilisant un colorant spécifique de l'ADN et un lecteur de plaque multi-puits a également été développée. Cette méthode à permis de réduire les temps d'analyse par 10 et de généraliser les mesures de concentrations cellulaires lors de nos expériences. Un système de perfusion visant à maintenir des cellules de plante en vie dans un tube de RMN a été mis au point afin de permettre des analyses de RMN *in vivo*.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à dégager des liens entre le statut nutritionnel des cellules de EC et leur capacité à produire des alcaloïdes. Pour ce faire nous avons cultivé ces cellules à long terme dans 3 milieux de culture ayant des concentrations en N et P différentes. Les trois suspensions cellulaires obtenues ont alors été caractérisées en détail aussi bien au niveau des concentrations intra- et extra-

cellulaires en nutriments qu'au niveau de la prolifération cellulaire et de la capacité de production des alcaloïdes. Dans les milieux ayant une concentration réduite en N ou en P, moins de cellules ont été formées au bout de 10 jours comparé à la suspension témoin (cellules poussant dans du milieu contenant 100% de N et de P). Cependant les nutriments du milieu de culture ont été stocké au niveau intracellulaire, ce qui a eu pour effet d'augmenter très significativement la capacité de production de ces cellules lorsqu'elles ont été elicité (induction de la production des métabolites secondaires).

Les cellules poussant sur le milieu à teneur réduite en N ont ainsi produit 39 fois plus d'alcaloïdes que les cellules témoin lors du test d'élicitabilité effectué 10 jours après inoculation. La masse cellulaire, concentration en amidon, en glucose intracellulaire et P intracellulaire étaient également 36 %, 473 %, 1629 % et 40 % plus élevés respectivement. Il apparaît donc que la concentration en nutriments intracellulaires au moment de l'induction des voies métaboliques secondaires (élicitation) a un impact direct sur la capacité de production des métabolites secondaires (MS). De plus sur un milieu pauvre en N ou P, la phase de croissance des cellules dure moins longtemps (moins de cellules formées au final) et les nutriments non utilisés pour la croissance sont alors re-localisés dans les réserves internes. Ces réserves sont alors directement disponibles lors de l'élicitation pour fabriquer des métabolites secondaires, ce qui résulte en une capacité de production élevée.

Inversement, lorsque les cellules de EC étaient cultivées dans du milieu standard (100 % P et N), la phase de croissance des cellules était plus longue et en conséquence plus de cellules étaient formées au final. Ainsi, la majorité des nutriments présents dans le milieu de culture a été utilisée pour fabriquer des composants cellulaires et les réserves internes en C et P sont restées basses, ce qui a résulté en une capacité de production faible après élicitation.

Des ajouts ponctuels de nutriments ont également été effectués dans les 3 suspensions cellulaires au 5ème jour après inoculation. Un ajout de glucose a

significativement augmenté la formation de biomasse et de cellules dans la suspension témoin mais n'a eu aucun effet sur les cellules poussant dans les milieux pauvres en N et P. L'ajout de PO_4^{3-} (P_i) a provoqué une augmentation de 145 % de la capacité à produire des alcaloïdes dans le cas des cellules cultivées dans le milieu initialement pauvre en Pi. La capacité de production des cellules poussant sur le milieu pauvre en N a augmenté de 95 et 39 % après un ajout de Pi et NO_3^- respectivement. Au contraire la capacité des cellules cultivées sur le milieu standard à produire des MS est restée basse quel que soit l'ajout effectué.

Les ajouts ont donc eu un effet différent sur la capacité de production en fonction de l'état nutritionnel des cellules au moment de l'ajout. Par exemple faire un ajout sur des cellules dont les réserves carbonées sont basses au moment de l'ajout n'a pas eu d'effet sur la production d'alcaloïdes. Par contre un ajout ciblé et ponctuel sur des cellules déjà limitées nutritionnellement (et ayant donc des réserves carbonées) a provoqué une augmentation de la production de MS après élicitation. Ainsi il est possible de manipuler le statut nutritionnel des cellules végétales avant élicitation afin de maximiser la production. Dans le cas de nos cellules de EC, le meilleur taux de production a été obtenu en cultivant les cellules à long terme sur un milieu pauvre en NO3 puis en effectuant un ajout de PO_4^{3-} 5 jours avant élicitation.

Dans le cas de nos cellules d'*Eschscholtzia californica* il existe donc un lien direct entre le statut nutritionnel des cellules et leur capacité à produire des métabolites secondaires. Dans nos conditions de culture, des concentrations intracellulaires en glucose et phosphate élevées au moment de l'élicitation ont résulté en une production d'alcaloïde accrue. Ce lien entre statut nutritionnel et production pourrait expliquer dans certains cas le manque de reproductibilité et la perte de productivité souvent rapportés en culture de cellule de plante. De plus il permet également d'expliquer les résultats contradictoires reportés dans la littérature concernant l'effet de la composition du milieu de culture sur la capacité de production des cellules.

Un suivi de routine des concentrations intracellulaires lors des cultures de cellules végétales pourrait donc permettre de gagner en reproductibilité et de dépasser le goulot d'étranglement qui limite pour le moment l'exploitation industrielle des procédés de biotechnologie végétale. De plus l'ajout d'une phase de stockage des nutriments avant l'élicitation pourrait permettre d'augmenter significativement la capacité de production des cellules de plantes.

ABSTRACT

Plant secondary metabolites represent an important source of bioactive compounds and are widely present in the human pharmacopoeia. In recent years, the demand for high value phytochemicals has increased dramatically and *in vitro* cell culture has been of great interest as a potential supply. A considerable amount of research has been done in the past decades to produce phytochemicals from in vitro cultivated plant cells. However, bioprocesses using plant cells are still seldom economically viable today due to the low and unreliable production yields obtained.

The aim of this study was to investigate the influence of intracellular nutrient concentrations on the alkaloid production ability in *Eshscholtzia californica* (EC, California popy) cells. We wanted to assess if fluctuating nutritional states could explain the lack of reproducibility observed in plant cell culture. Firstly, we developed several tools and techniques in order to better characterize plant cells physiological and nutritional state. A very simple off-line respirometer was developed to measure oxygen consumption rates of low respiring and shear-sensitive plant cell suspensions. A fast and simple method to evaluate cell concentration in plant cell suspension using a fluorescence microplate reader is also presented. The time needed to perform the microplate counting was 10 % that needed for the microscopic enumeration thus allowing the determination of cell concentration as a routine analysis during our experiments. A perfusion system was also developed in order to maintain plant cells alive in a 10 mm NMR tube, thus allowing *in vivo* NMR measurements.

Growth kinetics, alkaloid production, nutrients uptake and nutrient accumulation rate were studied in three different culture media differing in their PO_4^{3-} and NO_3^- content. In addition, EC cells were subjected to various medium alterations during the culture process to investigate the effect on internal nutrient reserves and SM production. Results showed that intra-cellular nutrient concentrations were intimately linked to SM production in EC cells.

Secondly, we tried to elucidate if there was a link between EC cells nutritional status and their capacity to produced alkaloids. EC cells were cultivated on a long-term basis on three different culture media differing in their PO_4^{3-} (Pi) and NO_3^- content. Extra-cellular as well as intra-cellular nutrients concentrations were monitored as well as growth kinetics and alkaloid production ability. In the low- NO_3^- medium, starch, glucose and phosphate content in the biomass 10 days after inoculation was increased by 473, 1629 and 40 % respectively compared to the control cells (high NO_3^-). Cell concentration was significantly reduced from 10.3 to 8.6 millions cell·ml^{-1} on this low-N medium compared to the control although alkaloid production was multiplied by 39 when cells were elicited. N- and P-limited cells accumulated 83 and 188 % more carbon than control cells after 10 days. This intra-cellular C was mainly stored in the form of starch in P-limited cells and in the form of glucose in N-limited cells. In both N- and P-limited cells, alkaloid production was shown to be strongly dependent on the intra-cellular glucose and phosphate concentrations at elicitation time.

Some nutrient additions were also made on the 3 cells suspension 5 days after inoculation to assess the effect on cells' production capacity at day 10. The addition of glucose resulted in a significant increase in cell number and biomass concentration at day 10 in the control cell suspension (cells growing in standard B5 medium) but had no effect on P- and N-limited cells. The addition of Pi at day 5 in the P-limited cell suspension resulted in a 145 % increase in the cells production capacity at day 10. Similarly a 95 % and 39 % increase was reported when Pi and NO_3^- (respectively) was added in the N-limited cell suspension. The production capacity stayed stable and low in the control cell suspension whatever nutrient addition was done.

Nutrient addition had a different effect on SM production capacity depending on cells nutritional state at the time of the addition. For example when nutrients were added to cells having a low C content at day 5, there was little or no effect on the production capacity at day 10. On the other hand when the same addition was made on cells having a high C content at day 5, the production level was significantly increased after cells were

elicited at day 10. By using a combination of nutrient stress and targeted nutrient addition it was therefore possible to manipulate the nutritional status of EC cells to increase their SM production capacity.

In our *Eschscholtzia californica* cell suspension there was a direct relationship between cells nutritional state at elicitation time and their ability to produce alkaloids. High intracellular glucose and Pi concentrations at the end of the proliferation phase resulted in a significantly higher production capacity when cells were elicited. This relationship between nutritional state and SM production was mainly overlooked up to now and may explain the low reproducibility and loss of productivity that were frequently reported in plant cell culture. Moreover, fluctuation in cell's nutritional state may also explain the contradictory results obtained in the literature about medium optimisation.

Evaluation of plant cells nutritional state on a routine basis in plant cell culture may allow a considerable gain in reproducibility in the future. Moreover the addition of a nutrient accumulation phase at the end of the proliferation phase in plant cell culture could allow a significant increase in productivity in plant cell-based bioprocesses.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **IV**

RÉSUMÉ ..... **V**

ABSTRACT ..... **IX**

TABLE DES MATIÈRES ..... **XII**

LISTE DES TABLEAUX ..... **XIX**

LISTE DES FIGURES ..... **XX**

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS ..... **XXIV**

LISTE DES ANNEXES ..... **XXIX**

INTRODUCTION **1**

CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE **5**

1.1. L'ÉCHEC COMMERCIAL DES BIOTECHNOLOGIES VÉGÉTALES **5**

1.2. POURQUOI CE MANQUE DE REPRODUCTIBILITÉ EN CULTURE DE CELLULES DE PLANTE ? **7**

1.3. OPTIMISATION DES MILIEUX DE CULTURE: DES RÉSULTATS CONTRADICTOIRES. **8**

1.3.1. Influence de la composition du milieu sur la morphologie des cellules de plantes cultivees. 9

1.3.2. Influence de la composition du milieu de culture sur la production de métabolites secondaires 10

1.4. RÔLE DES MACRO-ÉLÉMENTS VIS À VIS DU MÉTABOLISME SECONDAIRE 14

1.4.1. Le métabolisme du carbone en relation avec la production de métabolites secondaires 15

1.4.2. Interactions Carbone / phosphate / azote 17

1.5. ABSORPTION ET GESTION DES MACRO-ÉLÉMENTS PAR LES CELLULES VÉGÉTALES 22

1.5.1. gestion du carbone 23

1.5.2. gestion du phosphate 25

1.5.3. Gestion du nitrate 30

1.6. REVUE DES MÉTHODES EMPLOYÉES POUR MESURER LES CONCENTRATIONS INTRACELLULAIRES DES DIFFÉRENTS NUTRIMENTS. 32

1.6.1. Comparaison des différentes méthodes de mesure des concentrations intracellulaires : cas du Pi 32

1.6.2. RMN du phosphate in vivo 33

1.6.3. Les possibilités de la RMN du phosphate 34

1.6.4. RMN du carbone 35

CHAPITRE 2. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE ET STRATÉGIES EMPLOYÉES 38

2.1. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE 38

2.2. OBJECTIF PRINCIPAL ET OBJECTIFS SECONDAIRES 38

2.3. CHOIX DES CELLULES 39

2.4. CHOIX DU MODE DE CULTURE 40

CHAPITRE 3. PRÉSENTATION DES ÉTAPES DE TRAVAIL 42

CHAPITRE 4. MÉTHODOLOGIE 44

4.1. MILIEUX DE CULTURE 44

4.1.1. Milieux de culture 44

4.1.2. Milieu de production 44

4.1.3. Stérilisation des milieux 45

4.2. MATÉRIEL VÉGÉTAL 46

4.2.1. Obtention des cellules en suspension 46

4.2.2. sub-cultures des suspensions cellulaires 47

4.3. COURBES DE CROISSANCE 47

4.4. TEST D'ÉLICITABILITÉ 47

4.5. ANALYTIQUE 48

4.5.1. Mesure du la biomasse seche et humide. 49

4.5.2. Concentration cellulaire 49

4.5.3. Lyophilisation des cellules 51

4.5.4. Analyses extracellulaires 52

4.5.5. Analyses intracellulaires 53

4.6. RMN IN VIVO 56

4.6.1. Système de perfusion des cellules 56

4.6.2. Préparation de l'échantillon 59

4.6.3. Spectromètre et paramètres d'acquisition 60

CHAPITRE 5. MISE AU POINT D'UN RESPIROMÈTRE SPÉCIALEMENT ADAPTÉ AUX CELLULES DE PLANTES ET AUX CELLULES ANIMALES. 63

5.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 63

5.2. A LAB-BUILT RESPIROMETER FOR PLANT AND ANIMAL CELL CULTURE 64

5.2.1. Abstract 65

5.2.2. Introduction 65

5.2.3. Material and Methods 69

5.2.4. Results and discussion 79

5.2.5. Conclusion 93

5.2.6. Acknowledgments 95

5.2.7. References 95

CHAPITRE 6. ÉVALUATION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE DANS UNE SUSPENSION DE CELLULES VÉGÉTALES A L'AIDE D'UN LECTEUR DE PLAQUE MULTI-PUITS. 100

6.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 100

6.2. DETERMINATION OF CELL CONCENTRATION IN A PLANT CELL SUSPENSION USING A FLUORESCENCE MICROPLATE READER 102

6.2.1. Abstract 103
6.2.2. Introduction 103
6.2.3. Material and methods 106
6.2.4. Results 110
6.2.5. Discussion 118
6.2.6. Conclusion 122
6.2.7. Acknowledgements 123
6.2.8. References 123

CHAPITRE 7. INFLUENCE DU STATUT NUTRITIONEL DES CELLULES D'*ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA* SUR LEUR CAPACITÉ À PRODUIRE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES 128

7.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 128

7.2. CRITICAL INFLUENCE OF INTERNAL NUTRIENT CONCENTRATION ON SECONDARY METABOLITE PRODUCTION IN CULTIVATED ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA CELLS 129

7.2.1. Abstract 130
7.2.2. Introduction 130
7.2.3. Material and methods 132
7.2.4. Results and discussion 139
7.2.5. Conclusions 155
7.2.6. Acknowledgements 156
7.2.7. References 156

CHAPITRE 8. EFFET D'UNE MODIFICATION NUTRITIONELLE PONCTUELLE SUR LA PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES 160

8.1. DESCRIPTION DE L'EXPÉRIENCE 160

8.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION 161

8.2.1. Effet des ajouts sur la prolifération cellulaire 161

8.2.2. Effet des ajouts sur la concentration en biomasse sèche 163

8.2.3. Effet des ajouts sur la production d'alcaloides 165

8.3. CONCLUSION CONCERNANT LES AJOUTS PONCTUELS 167

CHAPITRE 9. DISCUSSION GÉNÉRALE 168

9.1. LE CONCEPT DE «BOITE NOIRE» A ATTEINT SES LIMITES EN BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE 168

9.2. UN BESOIN URGENT D'OUTILS DE CARACTÉRISATION FIABLES 169

9.3. L'ALLOCATION DES RESSOURCES CARBONÉES : UN ÉQUILIBRE ENTRE CROISSANCE ET STOCKAGE 170

9.4. UN LIEN ENTRE LE STATUT NUTRITIONNEL, LE MANQUE DE REPRODUCTIBILITÉ ET LA PERTE DE CAPACITÉ DE PRODUCTION 172

9.5. LIEN ENTRE LE STATUT NUTRITIONNEL DES CELLULES DE PLANTES ET LES RESULTATS CONTRADICTOIRES EN OPTIMISATION DE MILIEU. 174

9.6. CONTRÔLE DE LA CAPACITÉ DE PRODUCTION DE MS PAR MODIFICATION DU STATUT NUTRITIONNEL 175

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS **176**

RÉFÉRENCES **179**

ANNEXES **207**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1: Composition des milieux de culture. 45

Table 5.1 : Oxygen uptake rates of the enzymatic reaction, measured in the respirometer as well as determined by spectrometry. Error intervals represent the 95% confidence interval for n=4. 85

Table 5.2: Percentage of broken plant cells in the respirometer as a function of magnetic bar shape and respirometric test length. A) polygonal shape, B) crosshead shape, C) cross shape and D) spectroscopy cuvet shape 89

Table 5.3: Percentage of broken plant cells in the respirometer as a function of magnetic bar shape and respirometric test length. A) polygonal shape, B) crosshead shape, C) cross shape and D) spectroscopy cuvet shape 90

Table 7.1 : Characteristics of the 3 cell suspensions 10 days after inoculation. 141

Table 7.2 : Cells composition 10 days after subculture 142

Tableau 8.1 : Récapitulation des concentrations des ajouts ponctuels 161

LISTE DES FIGURES

Figure 4.1 : Système de perfusion utilisé in RMN in Vivo.A) Flacon de recirculation du milieu de perfusion. B) Tube de RMN muni de son insert. C) Pompe péristaltique. 57

Figure 4.2 : Système de perfusion des cellules dans un tube de RMN de 10 mm. A) Insert dans le tube de RMN. B) Insert hors du tube. Les flèches indiquent le sens de circulation du milieu de perfusion.....58

Figure 4.3 : Vue d'ensemble du système de perfusion et d'acquisition des spectres de RMN in vivo. A) système de perfusion inséré dans le spectromètre. B) Tubes d'alimentation. C) Pompe et flacon de recirculation du milieu. D) Système d' acquisition des spectres.....60

Figure 4.4 : Spectre de ^{31}P-RMN in Vivo 62

Figure 5.1 : Respirometer and oxygen enrichment chamber scheme (not to scale). I) Respirometer: A: polarographic pO_2 probe, B: 10 ml syringe, C: black butyl rubber gasket, D: magnetic stirring bar, E: Luer-lock valve. II) Oxygen enrichment chamber.....72

Figure 5.2 : Background oxygen fluxes as a function of DO concentration. Negative fluxes refer to an inward O2 diffusion in the respirometer, positive fluxes refer to O2 consumption and/or O2 diffusion out of the respirometer chamber. Error bars represent the 95% confidence interval for n=4. The vertical dotted line indicates air saturation concentration.....82

Figure 5.3 : Two views of the four magnetic bars tested during the cell integrity test. A: polygonal shape (Micro stir bar, 10 x 3 mm, Fisher Scientific, ref. 14-511-69); B: crosshead shape (10 mm diameter, Sigma-Aldrich ref. Z16215-9); C: cross shape (9.5 mm diameter, Sigma-Aldrich ref. Z18984-7); D: spectroscopy cuvet shape (10 mm diameter, Sigma-Aldrich ref. Z36354-5). 88

Figure 5.4 : OUR dependence versus DO concentration for a plant cell suspension. Each different symbol corresponds to a different aliquot of the same suspension. 92

Figure 6.1: Influence of Tris and NaCl concentrations on the fluorescence of Hoechst stained plant cells. Two TRIS concentrations and Two NaCl concentrations were tested (see insert). The Hoechst dye concentration in the sample as well as buffer pH were maintained constant at 60 $\mu g \cdot ml^{-1}$ and 7.5 respectively. 111

Figure 6.2: Standard curves obtained using the microplate counting at 5 different dye concentrations (final dye concentration in the sample - see insert). All assays were conducted with fixed plant cells in 1 M TRIS buffer pH 7.5 containing 1 M NaCl. Error bars represent the 95% confidence interval at p=0.05 between the readings from the four wells corresponding to the same sample. 112

Figure 6.3 : Determination of the linear range of the microplate counting method for EC cells. All assays were conducted in 1 M TRIS buffer pH 7.5 containing 1 M NaCl and 60 $\mu g \cdot ml^{-1}$ of Hoechst 33258. The solid line and the equation refer to the linear regression curve for concentrations ranging from 0.20 to $10.0 \times 10^{6} \cdot ml^{-1}$ cells. Error

bars represent the 95% confidence interval for the four wells corresponding to a given cell concentration. 114

Figure 6.4 : Comparative data obtained using both the microscopic (◇) and microplate counting (○) methods during the course of a 12 days plant cell culture. The solid line represents the polynomial fit obtained for microscopic counting data by the least square method. Error bars represent the standard deviation with n=3. 115

Figure 6.5 : Growth kinetics of cultivated *Eschscholtzia californica* cells during the course of a 12 days plant cell culture. ○ Cell concentration (evaluated with the microplate counting method), ◇ Fresh weight concentration, ▲ Dry weight concentration. Error bars represent the 95 % confidence interval with n=4..... 117

Figure 6.6 : Cell water content (◎) and cell dry mass (□) during a 12-day plant cell culture. Solid lines represent the polynomial fit for the corresponding data. Cell concentration has been evaluated using the microplate counting method. 118

Figure 7.1 : Growth, elicitability and medium nutrient concentrations in CS3 during a 12 days culture. Each data point represents the average value obtained from triplicate flasks. Sampling was destructive, meaning that a whole 500 ml flask was used to perform complete analysis. 144

Figure 7.2 : Growth kinetics, elicitability and intracellular nutrient concentrations in CS3 during a 12 days culture. Each data point represents the average value obtained from triplicate flasks. Sampling was

destructive, meaning that a whole 500 ml flask was used to perform complete analysis. 146

Figure 7.3: Vacuolar phosphate concentration in CS3 cells as measured by in vivo NMR 147

Figure 7.4 : Correlation between elicitability and intracellular glucose concentration in CS2 and CS3. Each point represents the average value from of 3 different shake flasks. 150

Figure 8.1 : Effet d'un ajout ponctuel à I+5 sur la concentration cellulaire à I+10 162

Figure 8.2 : Effet d'un ajout ponctuel à I+5 sur la concentration en poids sec à I+10 164

Figure 8.3 : Effet d'un ajout ponctuel à I+5 sur la capacité à produire des alcaloides à I+10 166

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

1D	Unidimensionnelle
2,4-D	Acide dichlorophenoxy-acétique
3-PGA	Acide 3-phosphoglycerique
^{31}P	Phosphore ayant une masse atomique de 31
^{12}C	Carbone ayant une masse atomique de 12
^{13}C	Carbone ayant une masse atomique de 13
$^{13}C_1$-glucose	Molécule de glucose marquée au ^{13}C en carbone #1
^{13}C-malate	Molécule de malate marquée au ^{13}C
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AGPase	ADPglucose pyrophosphorylase
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
C	Carbone
C_{18}	Silice greffée avec de longues chaînes Octadécyle
C_{crit}	Concentration critiqueen oxygène
Cell.	Cellules

I	Temps d'inoculation
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
CNB	Carbon nutrient balance
CS1	Cell susoension1 = cellules de EC cultivée sur du milieu B5
CS2	Cell suspension 2 = cellules de EC cultivée sur du milieu B5 avec 2/3 de la concentration en Pi
CS3	Cell suspension 3 = cellules de EC cultivée sur du milieu B5 avec 1/2 de la concentration en NO_3^-
CS	gène codant pour le citrate synthase
DO	Dissolved oxygen ou Oxygène dissout
DO_{cor}	Corrected dissolved oxygen ou Oxygène dissout corrigé
DO_{raw}	Raw dissolved oxygen ou Oxygène dissout brute
D_2O	Eau deutérée
DNA	acide Désoxyribonucléique
DMEM	Milieu de culture utilisé en culture de cellules animales
ds-DNA	Double stranded DNA – ADN double brin
DW	Dry weight – poids sec
EC	*Eschscholtzia californica*
EDTA	Acide éthylènediamine-tétracétique
EtOH	Ethanol
F_{exch}	Flux d'oxygène sortant ($mM \cdot h^{-1}$)
F_{probe}	Consommation en Oxygène de la sonde ($mM \cdot h^{-1}$)

$F_{background}$	Flux d'oxygène total
FCS	Fetal calf serum - Serum d'embryon de veau
FDA	diacetate de fluoresceine
FW	Fresh weigth ou poids humide
G2/M	Phases de la division cellulaire – G2 =période qui précède la mitose, M = mitose
HALC	Système à haute-affinité / basse capacité
ID	Diamètre interne
INC	Internal nutrient concentrations – Concentrations intracellulaires
OD	Diamètre externe
K_m	Constante d'affinité
$K_L a$	Coefficient de transfert de masse
LAHC	Système basse-affinité / haute capacité
MeOH	Méthanol
MS	Métabolites secondaires
N	Azote
N^K	Azote Kjeldahl
nia	gène codant pour la nitrate réductase
NR	Nitrate réductase
NMR	Nuclear magnetic Resonance
NS0	lignée de cellules animales
OAA	Acide oxaloacétique

O_2	Oxygène
OUR	Oxygen uptake rate – taux de consomation en oxygène
OUR_{ap}	apparent Oxygen uptake rate – taux de consomation en oxygène apparent
OUR_{max}	maximum Oxygen uptake rate – taux de consomation en oxygène maximum
Pi	Phosphate inorganique
PKc	gène codant pour le pyruvate kinase cytosolique
PEPcase	Phosphoenolpyruvate carboxylase
PPi	pyrophosphate
PPC	gène codant pour la PEPcase
ppm	parti par million
pO_2	pression partielle en oxygène
q_{O2}	specific oxygen uptake rate – taux spécifique de consommation en oxygène
SOUR	specific oxygen uptake rate – taux spécifique de consommation en oxygène
q_{O2max}	maximum specific oxygen uptake rate – taux spécifique de consommation en oxygène maximum
RFU	relative fluorescence units – unités de fluorescence relative
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SPS	Sucrose-phosphate syntase
SS	Starch syntase

τ_r	probe response time – temps de réponse de la sonde
TCA	Trichloroacetic acid
tpm	tour par minute
V_{max}	Vitesse maximale de la réaction
VPP	Voie oxydative des pentoses phosphate

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Composition des milieux MS et B5.....207

ANNEXE 2 : Voies de biosynthèse des alcaloides chez *Opium popy* 208

ANNEXE 3: Suivi de la suspension CS1 pendant la durée d'une sous-culture 209

ANNEXE 4: Suivi de la suspension CS2 pendant la durée d'une sous-culture 211

INTRODUCTION

La culture de cellules de plantes non-différenciées en flacons agités ou en bio-réacteur a connu un grand intérêt dans les années 80 et 90. Cet intérêt a été suscité par la capacité des cellules de plantes à produire des phytomolécules d'intérêt pharmaceutique et alimentaire à haute valeur ajoutée. De nombreux travaux visant à optimiser les procédés de culture et à évaluer la faisabilité commerciale de ces procédés ont été publiés. Pourtant seulement une poignée de molécules est aujourd'hui encore produite commercialement à partir de procédés utilisant les biotechnologies végétales. Ce relatif échec est attribuable entre autres à la faible productivité et au manque de reproductibilité constatés lors de la culture de cellules de plantes. En effet, la quantité de produit obtenu en culture de cellules est souvent 10 à 100 fois plus faible par rapport à ce qu'on peut retrouver dans la plante entière. De grandes variations de productivité ont de plus été reportées d'une culture à l'autre sans apparente raison. Il est également fréquent que les cellules de plantes perdent peu à peu leur capacité à produire la molécule d'intérêt au fil des sous-cultures. Or, contrairement aux cellules animales et microbiennes, les cellules de plantes supportent très mal la congélation. Cette caractéristique implique qu'elles doivent être maintenues en culture pendant de longues périodes, ce qui augmente d'autant les risques de perte de production.

Différentes stratégies ont été envisagées afin d'augmenter la productivité des cellules de plantes en culture *in vitro*. Par exemple des bio-réacteurs respectant la grande sensibilité au cisaillement des cellules des plantes ont été développés. Les molécules produites ont été extraites en continu lors de la culture afin d'augmenter la productivité et de simplifier la procédure de purification. On a également fait appel au génie métabolique pour élucider les voies biochimiques impliquées dans la production des molécules d'intérêt et étudier leur régulation. On a aussi tenté de modifier génétiquement les cellules de plante afin d'augmenter la productivité. Certaines de ces stratégies comme l'extraction en ligne des produits d'intérêt ont parfois permis de réels gains de productivité. Cependant le problème du manque de reproductibilité et de l'instabilité des cellules de

plantes en matière de production reste entier et explique en grande partie la faible exploitation industrielle des biotechnologies végétales constatée aujourd'hui.

L'instabilité des cellules de plantes au niveau de la production a souvent été attribuée à des dérives génétiques provoquées par la culture *in vitro* à long terme. Notamment certaines études ont démontré que le nombre de chromosomes par cellule augmente très rapidement quant les cellules de plantes sont mises en culture. Des variations du niveau de polyploïdie ainsi que des mutations génétiques spontanées au sein de la population cellulaire pourraient expliquer la perte progressive de la capacité de production. Cependant cette théorie n'explique pas pourquoi certaines suspensions cellulaires pourtant stables au niveau du caryotype présentent des taux de production très variables dans le temps, et ce malgré des conditions de culture standardisées. Pour notre part nous avons voulu explorer l'influence du statut nutritionnel des cellules de plantes sur leur capacité à produire des métabolites secondaires.

Il existe de nombreuses études traitant de l'optimisation de la composition des milieux lors de la culture de diverses espèces de cellules de plantes. Ces études ont démontré que la composition du milieu a une influence directe sur le taux de croissance et le taux de production des cellules de plantes. Cependant les résultats obtenus lors de ces travaux sont très contradictoires. Par exemple chez *Catharanthus roseus* (Pervenche de Madagascar), certaines publications prouvent qu'une augmentation de la concentration en phosphate (Pi) provoque une augmentation de la production des alcaloïdes. Cependant d'autres études ont également démontré que la production est positivement affectée par une diminution de la concentration en Pi alors qu'une dernière publication rapporte que la modification du niveau de phosphate dans le milieu de culture n'a eu aucun effet sur le taux de production. Des résultats tout aussi contradictoires ont été obtenus sur l'influence de la concentration en nitrate, ammonium, sucres et autres nutriments sur différentes suspensions cellulaires. En conséquence aucune tendance générale n'a pu être dégagée jusqu'à présent quant à l'influence de la composition des milieux de culture sur la production de MS lors de la culture de cellules de plante.

Toutefois les plantes sont capables d'accumuler certains nutriments au niveau intracellulaire. Cette stratégie leur permet de survivre en période de disette lorsque le sol est appauvri en un élément essentiel à leur croissance. Elles fonctionnent alors grâce à leurs réserves jusqu'à ce que les racines s'étendent assez loin pour retrouver une source de l'élément manquant. C'est d'ailleurs pour cette raison que les études sur la fertilisation des plantes se basent essentiellement sur la composition des tissus végétaux pour détecter des limitations et les carences nutritionnelles. Néanmoins, en culture de cellules de plante, cette capacité des cellules à stocker les nutriments a été largement ignorée jusqu'a présent. Pourtant les réserves intracellulaires constituent une source de nutriments non négligeable qui tamponne l'effet de toute modification du milieu de culture. Par exemple le fait de diminuer ponctuellement la concentration en Pi du milieu de culture n'aura que peu d'influence sur les cellules si leur concentration intracellulaire de Pi est élevée. La cellule compensera alors la faible concentration du milieu de culture en puisant dans ses réserves intracellulaires et de ce fait la modification du milieu de culture n'aura que peu d'impact sur la croissance et la production.

Le but de ce projet de recherche était de dégager d'éventuels liens entre le statut nutritionnel des cellules de plante et la production de métabolites secondaires. Pour ce faire nous avons tout d'abord mis en place plusieurs outils nous permettant de caractériser les cellules de plantes. Un respiromètre spécifiquement adapté aux cellules de plantes a été développé et caractérisé. D'autre part, une technique de détermination de la concentration cellulaire utilisant un colorant à ADN spécifique et un lecteur de micro-plaque à été mise au point afin de permettre une étude précise de la prolifération cellulaire. Enfin un micro-bioréacteur permettant de maintenir des cellules en vie dans un tube de spectrométrie RMN a été développé afin de pouvoir procéder à des mesures de RMN *in vivo*. Ces outils ont été utilisés en conjonction avec diverses méthodes de détermination des concentrations intra- et extra-cellulaires pour étudier des cellules de plante modèles. Des cellules d'*Eschscholtzia californica* (Pavot de Callifornie) mises en suspension depuis plusieurs années ont été cultivées à long terme dans 3 milieux de

culture ayant des concentrations en Pi et nitrate différentes. Pour chaque suspension ainsi créée, nous avons étudié la cinétique de croissance et de consommation ainsi que la production en alcaloïdes et l'évolution des concentrations intracellulaires. Des modifications ponctuelles du milieu de culture ont aussi été effectuées sur les 3 suspensions cellulaires afin d'observer leur influence sur les paramètres mesurés.

CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1. L'ÉCHEC COMMERCIAL DES BIOTECHNOLOGIES VÉGÉTALES

Près de 30 % des médicaments que nous utilisons sont dérivés de métabolites secondaires végétaux, c'est à dire de molécules synthétisées par les plantes pour se protéger des agressions environnementales. L'aspirine, la morphine, la digitaline et le paclitaxel sont parmi les plus connus. Beaucoup de ces molécules étant difficilement synthétisables, elles sont extraites des végétaux puis transformées jusqu'à leur formulation finale. Cependant, avec l'arrivée dans les années 50 des techniques de culture de cellules végétales *in vitro*, de nouvelles portes se sont ouvertes vers la production de nouvelles molécules d'intérêt pharmaceutique et agro-alimentaire.

Dans les années 80, plusieurs compagnies ont donc investi dans les biotechnologies végétales. La culture des cellules de plantes constituait alors une technique prometteuse qui devait permettre de produire de nouvelles molécules à haute valeur ajoutée. En effet, au fil de l'évolution, les cellules de plantes ont acquis un réseau de voies métaboliques complexe qui leur permettent de produire des molécules élaborées que l'on ne peut obtenir par synthèse chimique. De plus les cellules de plantes peuvent être cultivées sur des milieux complètement définis (synthétiques) et peu coûteux. L'absence de serum dans ces milieux diminue les risques de contamination par des virus pathogènes pour l'homme. La culture in vitro permet également de standardiser les conditions de culture et de simplifier les procédures de purification des molécules obtenues. La culture *in vitro* permet aussi de se libérer des aléas climatiques, sociaux-économiques et de l'attaque des insectes et pathogènes qui influent sur la récolte des plantes entières. De plus certaines des plantes récoltées pour leur contenu en molécules à haute valeur ajoutée sont rares ou poussent lentement. De ce fait la culture de cellules pourrait constituer une bonne source

alternative pour l'obtention de ces phyto-molécules et permettrait de préserver les populations végétales fragiles.

Cependant malgré le grand nombre d'études traitant de biotechnologies végétales menées depuis 30 ans, la culture *in vitro* de cellules de plantes ne semble pas avoir tenu ses promesses. A ma connaissance, seulement deux ou trois molécules produites par biotechnologie végétale ont été jusqu'à ce jour mises sur le marché. Pourquoi un tel échec ? En fait, plusieurs facteurs peuvent expliquer le peu de succès de la biotechnologie végétale par rapport à l'essor spectaculaire de l'utilisation des micro-organismes et cellules animales. D'une part, les cellules de plante poussent très lentement par rapport aux bactéries et aux levures (temps de doublement de 2 h pour certaines bactéries contre plusieurs jours pour les cellules de plantes). La durée des cultures est donc plus longue (quelques jours pour les bactéries contre quelques semaines pour les cellules de plantes et jusqu'à plusieurs mois pour les racines transformées) et les risques de contamination sont plus importants. De même, la culture des cellules de plantes requière des bioréacteurs spécialement adaptés en raison de la grande sensibilité de ces cellules au cisaillement. Finalement, la productivité des cellules de plantes est souvent faible, ce qui limite leur application à la production de molécules à très haute valeur ajoutée. Enfin, les résultats obtenus lors de la culture de cellules de plante sont extrêmement peu reproductibles d'une culture à l'autre, et cela ralentit considérablement la mise en place de bio procédés fiables suscpetibles de mener à des applications industrielles. Il est fréquent par exemple que les cellules perdent peu à peu leur capacité à produire la molécule d'intérêt au fil des sub-cultures. Ceci pose un réel problème, d'autant plus que les cellules de plantes supportent mal la congélation et doivent donc être maintenues en croissance sur de longues périodes.

Ces limitations font que peu d'applications industrielles utilisant les biotechnologies végétales sont économiquement viables à long terme. Des solutions ont cependant été trouvées au niveau bio procédé pour cultiver les cellules de plantes et augmenter les taux de production. Par exemple l'élicitation et l'extraction en continu des molécules produites

augmentent significativement les taux de productions dans certains cas. Cependant le manque de reproductibilité et le problème de l'instabilité des cellules au niveau de leur capacité de production sur le long terme restent une barrière apparemment insurmontable, qui limite l'utilisation à l'échelle commerciale des biotechnologies végétales comme source de phyto-molécules.

1.2. POURQUOI CE MANQUE DE REPRODUCTIBILITÉ EN CULTURE DE CELLULES DE PLANTE ?

Les cellules de plantes sont souvent très instables au niveau de la production des métabolites d'intérêt. Très souvent des cellules qui présentaient à l'origine un taux de production acceptable en début de mise en culture perdent peu à peu cette capacité au fil des sub-cultures. De même, des taux de production très variables peuvent être obtenus d'une culture à l'autre à quelque jours d'intervalle sans cause apparente.

La diminution progressive de la capacité de production au fil des sub-cultures a souvent été attribuée à une instabilité génétique des cellules de plantes cultivées. En effet plusieurs études ont démontré que lors de la mise en culture des explants végétaux, le nombre de chromosomes par cellule augmente très rapidement pendant les premières semaines de culture *in vitro*. Il est donc fréquent de dénombrer 4 paires de chromosomes ou plus au sein des cellules de plante cultivées sur une longue période. Le phénomène d'endo-réplication (c'est à dire le doublement du nombre de chromosomes sans que la cellule ne se divise) est courant chez les plantes et serait stimulé en culture par le régime hormonal auquel les cellules sont soumises.

Certaines études ont établi un lien entre le degré de ploïdie des cellules végétales et la silenciation de certains gènes. Par exemple chez *Arabidopsis thaliana* et *Brassica*, des plantes possédant différents niveaux de ploïdie présentent un profil d'expression génétique différent (Scheid et al., 1996, Song et al., 1995). En culture de cellules, la perte de la capacité de production des métabolites secondaires (MS) a souvent été corrélée

avec l'augmentation de la ploïdie des cellules. Cependant il n'existe pas de preuve directe à notre connaissance de l'influence du nombre de chromosome sur la capacité de production des cellules en culture. La perte de la capacité de production pourrait aussi être attribuée à une mutation génétique spontanée dans un des gènes clefs des voies du métabolisme secondaire ou à des variations épi-génétiques. Comme les suspensions de cellules végétales sont hétérogènes (constituées de cellules ayant des degrés de différentiation différents) on a aussi émis l'hypothèse que les cellules moins différentiées (donc ayant un taux de croissance plus important et une capacité de production moindre) seraient sélectionnées dans la suspension au dépend des cellules productrices au fil des sub-cultures.

Cependant aucune de ces hypothèses ne permet d'expliquer le fait que le taux de production des cellules cultivées diminue puis augmente aléatoirement et ce a quelques semaines d'intervalle. Il apparaît clairement que les causes du manque de reproductibilité observé en culture de cellules sont très mal comprises encore à ce jour.

1.3. OPTIMISATION DES MILIEUX DE CULTURE: DES RÉSULTATS CONTRADICTOIRES.

L'optimisation des milieux de culture a souvent donné d'excellents résultats pour optimiser la croissance et la production de molécules d'intérêt lors de la culture de cellules microbiennes. Cette stratégie a aussi été tentée en culture de cellules de plantes mais avec des résultats plus mitigés. En effet si de nombreux travaux ont mis en lumière une influence directe de la composition du milieu de culture sur la physiologie des cellules de plante cultivées, des résultats extrêmement contradictoires ont été reportés.

1.3.1. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU SUR LA MORPHOLOGIE DES CELLULES DE PLANTES CULTIVEES.

De nombreux auteurs ont étudié l'influence des hormones sur la forme, la taille et la différenciation des cellules de plantes. Cependant, il existe peu de travaux traitant de la morphologie des cellules en relation avec leur statut nutritionnel.

En 1991, Jan Schripsema a publié une des rares publication où la morphologie des cellules est reliée aux nutriments présents dans le milieu de culture. Il a ainsi constaté que la taille, la forme, le nombre de plastes, la composition intracellulaire (concentration en sucre, type d'acides aminés, présence ou non d'amidon) et la production d'alcaloïde des cellules de *Tabaernaemontana divaricata* varient selon la source de carbone et d'azote du milieu de culture.

Certaines publications ont établi une relation entre l'apport de phosphate et la morphologie des plantes entières ou de certains organes des plantes (feuilles, racines). On a par exemple constaté une modification de l'architecture des racines en limitation de phosphate chez de nombreuses espèces comme par exemple *Arabidopsis thaliala,* (Trull et col., 1999) et *Lupinus albus L.* (le lupin blanc, Gilbert et col., 1999). Ainsi, en période de stress phosphaté, le ratio surface sur volume des racines augmente de façon à ce que la surface d'échange avec le milieu extérieur soit maximale. Ceci se traduit par des racines plus fines et plus longues (Blevins et Reinbott, 1999, Raghothama et col., 1999). Cependant, ces travaux ne permettent pas de conclure sur le véritable rôle du Pi dans le contrôle de l'élongation des cellules (Rodriguez et col., 1999).

1.3.2. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES

1.3.2.1. Cas des plantes entières

Les plantes synthétisent des métabolites secondaires (MS) essentiellement pour se défendre contre les insectes, champignons et herbivores ou pour tenir à distance les autres plantes. Cependant chez la plante entière, l'orientation de la plante vers un métabolisme primaire (croissance) ou secondaire (gestion du stress et mise en place des mécanismes de défense) est en partie fonction du statut nutritionnel de la plante. En effet face à un stress biotique (attaque d'un agresseur), les plantes adoptent une réaction différente selon leur statut nutritionnel. Si le sol fournit un apport suffisant en éléments minéraux (notamment azote et phosphore) et que la plante est en croissance active la production de métabolites secondaires est souvent faible. Par contre en cas de stress nutritionnel, la réponse de défense face à l'attaque est beaucoup plus importante et la plante produit alors des quantités importantes de MS (Harborne, 1997).

Ceci s'explique en partie par le fait que le métabolisme primaire et secondaire se partagent les mêmes ressources carbonées. Les voies du métabolisme secondaire sont essentiellement alimentées à partir de quelques composés carbonés comme l'acide pyruvique et le phosphoenol pyruvate (Conn, 1995) qui sont aussi des intermédiaires importants au sein des voies biochimiques primaires (Cycle du TCA, fixation anapleurotique du carbone, etc.). De ce fait si le flux de ces intermédiaires carbonés dans les voies primaires est important au moment de la stimulation des voies de défenses de la plante, le flux sera forcément réduit dans les voies du métabolisme secondaire. Inversement si la croissance de la plante est ralentie par une limitation nutritionnelle au moment de l'attaque (ex limitation de phosphore ou d'azote), la réponse au niveau de la synthèse de MS sera bien plus importante du fait de la plus grande disponibilité des ressources carbonées.

1.3.2.2. Influence de la concentration en sucre sur la production de MS

Les suspensions cellulaires utilisées en culture *in vitro* sont pour la plupart hétérotrophes, c'est à dire que les cellules dépendent pour leur croissance de la présence dans le milieu de culture d'une source de carbone. Dans les milieux couramment utilisés en culture de cellules de plantes, ce carbone est presque uniquement fourni sous forme de sucres (sucrose, glucose ou fructose) à une concentration variant de 2 à 3%.

Une augmentation de la concentration en sucre dans le milieu de culture a été corrélée avec une augmentation de la production des MS dans plusieurs études (Bhatt et coll., 1983, Davis 1972, Knobloch et Berlin 1980, Mantell et Smith, 1983). Cette stimulation de la production a parfois été expliquée par un arrêt de la croissance cellulaire provoqué par une augmentation du stress osmotique (Do et Cormier, 1990).

Inversement, certains auteurs ont rapporté une diminution de la production de divers métabolites secondaires lorsque la concentration en sucre du milieu était augmentée (Carew et Krueger 1977, Edleman et Hanson 1971, Ikeda et al. 1976). Dans une autre publication, c'est la diminution de la concentration en sucrose qui a stimulé la production de scopoletine chez *Nicotia tabacum* (Okazaki et al 1982). Il semble donc difficile de tirer un tendance générale quant à l'influence de la concentration en sucre sur la production de MS à partir de ces résultats.

1.3.2.3. Influence de la concentration en azote

Dans plusieurs études, une diminution de la concentration en azote des milieux de culture a été corrélée avec une augmentation de la productivité en MS (Chandler et Dodds, 1983, Knobloch et al. 1982). Dans le même ordre d'idée, une diminution de la productivité a été constatée après une augmentation de la concentration en azote dans le milieu de culture lors de la culture de plusieurs suspensions cellulaires (Amorin et al 1977, Davies 1972, Do et Cormier, 1991, Knobloch et al. 1982, Mizukami et al. 1977)

Mais des résultats complètement inverses ont aussi été rapportés. Par exemple chez *Panax notoginseng*, l'augmentation de la concentration en nitrate de 5 à 60 mM a provoqué une augmentation de la production de saponine de 150 %. Chez *Phytolacca americana*, une augmentation de la concentration en azote dans le milieu de culture a également provoqué une augmentation de la production de betacyanine (Sakuta et al, 1987). Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres espèces végétales (Okazaki et al., 1982, Tal et al., 1982,). Enfin dans d'autres études, la diminution de la concentration en azote a entraîné une diminution de la production (Abe et Ohta 1983, Sasse et al. 1982).

Il est donc encore une fois très difficile de dégager une tendance générale quant à l'effet de la concentration en azote des milieux sur la production des MS de par le peu d'homogénéité rencontré entre les différentes études.

1.3.2.4. Influence de la concentration en phosphate

Comme dans le cas des autres nutriments, il est difficile de cerner l'effet de la modification de la concentration en phosphate (Pi) des milieux de culture sur la production de métabolites secondaires (voir en annexe 3 un tableau recapitulatifs des resultats contradictoires relevés dans la littérature sur l'influence du phosphate sur la production de metabolites secondaires). Le cas des cellules de *Catharanthus roseus* est à ce titre très typique (voir annexe 3): Une publication rapporte un accroissement de la production à la suite d'une augmentation de la concentration en Pi dans le milieu de culture (Carew et Krueger 1977). Mais une autre équipe a démontré la relation inverse, c'est à dire que la diminution de la concentration en Pi dans le milieu de culture a été suivie d'une augmentation de la production en alcaloïdes (Knobloch et Berlin 1980, Knobloch et al., 1982). Enfin une autre publication n'a décelé aucun effet significatif sur la production de MS suite à une augmentation de la concentration en Pi (Doller 1978).

Il existe pléthore d'autres articles contradictoires en la matière, la moitié démontrant un effet stimulant du phosphate et l'autre moitié rapportant un rôle inhibiteur (voir Dicosmo et Towers 1984 pour une revue de la littérature à ce sujet).

1.3.2.5. Production de MS en relation avec une limitation de la croissance cellulaire

En parcourant les différentes publications portant sur l'optimisation des milieux de culture pour la production *in vitro* de métabolites secondaires, on est surpris de constater à quel point les résultats sont souvent contradictoires. Quelques tendances générales se dégagent malgré tout. Il semble notamment exister un lien entre le taux de croissance des cellules au moment de l'induction des voies métaboliques secondaires (élicitation) et la production de MS. De nombreux auteurs ont ainsi constaté que la production de métabolites secondaires est stimulée lorsque les cellules de plantes sont soumises à une limitation nutritionnelle en azote ou phosphore qui réduit leur taux de croissance (Collin 1987, Dougall et Weyrauch 1980, Knobloch et Berlin 1981, Yamakawa et al., 1983, Yeoman 1987). Lors de différentes études, la production de métabolites secondaires a été augmentée lorsque le taux de croissance des cellules de plantes était ralenti par une limitation en phosphate (cellules *in vitro* de soja (Malboobi et col., 1999), de café, de vigne, etc.).

De même, une réduction de la concentration en phytohormone dans le milieu de culture a été corrélée à plusieurs reprises avec une augmentation de la production des métabolites secondaires. Modifier l'équilibre hormonal du milieu de culture a également eu le même effet à plusieurs reprises. Par exemple des calli (amas cellulaires) de *Nicotiana tabacum* qui ne produisaient pas d'alcaloïdes sur un milieu gélosé contenant du 2,4-D (Acide 2,4-Dichlorophenoxyacetique) se sont mis à en produire quand cette hormone a été remplacée par du IAA (Acide Indole Acetique, Furuya et al., 1971). Encore une fois l'augmentation de production a été corrélée avec un taux de croissance cellulaire faible. Inversement lorsque la concentration en hormone est augmentée, on

observe souvent une réduction de la production des métabolites secondaires (Van der Plas et coll. 1995).

Dans les plantes entières, les cellules méristématiques qui se divisent rapidement (indifférenciées) sont incapables de produire des métabolites secondaires. Seules les cellules différenciées qui ont cessé de se diviser ont cette capacité. Par analogie certains auteurs ont émis l'hypothèse que les cellules cultivées ayant un taux de division élevée ne possèderaient pas un niveau de différentiation suffisant pour produire des métabolites secondaires. Inversement les cellules dont la croissance est ralentie sont souvent plus vacuolée et plus riches en amyloplastes. Elles seraient donc donc plus différenciées d'ou leur capacité accrue à produire des MS.

Cependant il existe énormément de résultats contradictoires concernant cette théorie de la limitation de la croissance et encore une fois il est impossible de tirer une conclusion claire.

1.4. RÔLE DES MACRO-ÉLÉMENTS VIS À VIS DU MÉTABOLISME SECONDAIRE

Pour résumer, la composition du milieu de culture a une influence directe sur la production des métabolites secondaires chez les cellules de plantes cultivées. Pourtant il semble impossible de dégager des tendances générales quant à l'influence des différents macro-nutriments présents dans le milieu de culture sur la production. Afin de mieux comprendre ce phénomène, il semblait donc important de se replonger dans les connaissances de base, à savoir de comprendre le rôle métabolique de ces différents nutriments et les interactions que ces éléments exercent entre eux au niveau physiologique.

1.4.1. LE MÉTABOLISME DU CARBONE EN RELATION AVEC LA PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES

Il existe des centaines de milliers de métabolites secondaires végétaux différents mais ils sont pour la plupart issus de 3 grandes voies métaboliques : la voie impliquant le shikimate (shikimate pathway, dont sont issus la majorité des alcaloïdes végétaux et des composés phénoliques, voir en annexe 2), la voie impliquant l'isoprènoïde (isoprenoid pathway, dont sont issus les terpènes et certains alcaloïdes) et la voie impliquant le polyketide (polyketid pathway, dont sont issus des composés à chaîne carbonées linéaires comme des acides gras et certains phénols). Bien que la structure et la composition des différents métabolites secondaires soient très diverses, tous ces composés sont cependant dérivés de seulement une poignée d'intermédiaires carbonés comme l'acide pyruvique et le phosphoenol pyruvate (Conn, 1995).

Les voies métaboliques primaires et secondaires se partagent donc les mêmes substrats carbonés. Cette situation implique des interconnections très nombreuses entre ces deux ensembles de voies métaboliques. En conséquence, il est impossible d'étudier l'influence des nutriments sur les voies métaboliques secondaires seules. Le métabolisme cellulaire doit être étudié comme un tout car toute modification des flux métaboliques dans les voies primaires peut potentiellement avoir une influence sur la production de métabolite secondaire, et ce quelque soit la composition de ce métabolite.

Par exemple chez les plantes entières, il a été démontré que lorsque la concentration cellulaire en sucres est basse, l'activité du gène NIA (qui encode pour la nitrate reductase) diminue de façon significative. De ce fait la réduction du nitrate en ammonium diminue lorsque les cellules sont pauvres en sucre. Cela implique que ces cellules sont limitées à la fois en azote et en carbone. Cette double limitation résulte chez *Nicotiana tabacum* en une diminution significative du taux de production des alcaloides, prouvant par le fait même que la concentration en sucre a un effet direct et multiple sur la production de métabolites secondaires (Stitt et al., 2002).

Chez les cellules de plantes hétérotrophes, le métabolisme des sucres est composé de 3 voies métaboliques : la voie oxydative des pentoses (VPP), la glycolyse et le cycle des acides tricarboxyliques (cycle du TCA). Ces trois voies métaboliques génèrent donc tous les précurseurs carbonés des métabolites secondaires. La VPP et la glycolyse ont lieu dans le même compartiment cellulaire (majoritairement le cytoplasme – mais chez les plantes ces 2 voies métaboliques sont aussi présentes dans les plastes) et se partagent les mêmes intermédiaires carbonés. Elles sont donc en compétition directe mais ont des fonctions bien différentes vis à vis des voies métaboliques secondaires.

La VPP fournit la majorité des squelettes carbonés servant à la synthèse des acides aminés aromatiques et car elle alimente la voie de synthèse du shikimate en erythrose 4-P. La voie du VPP est également la principale source de NADPH chez les cellules non photosynthétiques (la 2ème source étant la photo-respiration). Or le NADPH est le carburant privilégié des réactions de biosynthèse (y compris de la biosynthèse des métabolites secondaires). Parallèlement la glycolyse et le cycle du TCA génèrent l'acide pyruvique et l'acetyl coenzyme A qui constituent les «briques» des métabolites secondaires.

Le ratio glycolyse / VPP serait donc un indicateur de l'état physiologique des cellules. En effet plus la VPP est active et plus les voies de biosynthèses (primaires et secondaires) sont actives en raison de la production de NADPH. Ce ratio est en partie régulé par l'activité de la phospho-fructokinase (qui contrôle le flux métabolique dans la glycolyse) et du glucose 6-P deshydrogenase (qui contrôle le flux métabolique dans la VPP). Le flux dans la VPP augmente quand l'activité de la glucose 6-P deshydrogenase est stimulée, c'est à dire quand la concentration cytoplasmique en NAD+ est élevée. Par extension toute réaction biochimique qui produit du NAD+ (comme par exemple la réduction du nitrate en ammonium) stimule la VPP.

On commence donc déjà à entrevoir un réseau complexe d'inter-connections entre les différentes voies métaboliques qui aboutissent la formation des métabolites

secondaires. De plus il semble que la disponibilité de certains macro-nutriments peut avoir un effet direct sur la régulation de ces voies métaboliques (comme le nitrate dans la cas de la VPP). Dans les paragraphes suivants, nous allons donc revenir en détail sur le rôle métabolique des différents macro-éléments présents dans le milieu de culture.

1.4.2. INTERACTIONS CARBONE / PHOSPHATE / AZOTE

1.4.2.1. Rôle global du phosphate dans le fonctionnement des cellules

Les cellules doivent pouvoir stocker l'énergie issue des réactions exergonique (dégradation des substrats) afin de pouvoir la réutiliser lors des réactions endergoniques (synthèse de nouvelles molécules). Pour ce faire, elles utilisent des intermédiaires phosphatés riches en énergie: les nucléotides triphosphatés et notamment l'ATP. Les nucléotides triphosphatés, qui possèdent 2 liaisons phosphate de haute énergie, permettent aux cellules de stocker de l'énergie qui pourra ensuite être utilisée pour faire fonctionner les voies métaboliques et pour assurer le transport de molécules à travers les membranes.

Le phosphate entre aussi dans la composition de nombreuses molécules organiques qui font partie de la structure des cellules, comme les acides nucléiques et les phospholipides (qui composent la membrane plasmique). Il agit également sur l'activité protéique des cellules et le contrôle du métabolisme. En fait, le phosphate joue un rôle clef dans quasiment toutes les voies métaboliques des cellules végétales, comme par exemple la respiration et la photosynthèse. En effet, la phosphorylation et la déphosphorylation des protéines sont primordiales pour la régulation du métabolisme et jouent un rôle central dans la transmission des signaux au sein de la cellule. Le phosphate inorganique (PO_4^{3-} ou P_i) est donc non seulement le substrat de nombreuses enzymes (i.e.

phosphatases, kinases, etc.) mais aussi un modulateur de leur activité (Touchette et Burkholder, 1999, Walker, 1999).

On sait que le phosphate possède également une action au niveau de l'expression des gènes (transcription des ARN à partir de l'ADN). Ainsi, lorsque la concentration en phosphate diminue dans le milieu extérieur, des ARN sont produits pour permettre la fabrication de nouveaux transporteurs membranaires et de phosphatases. Jusqu'à présent, on connait environ une centaine de gènes dont l'expression est liée à la concentration en phosphate du milieu extérieur ou du cytoplasme (Raghothama, 1999). Cependant, on ne sait pas exactement comment le phosphate agit sur la transcription (Malboobi et coll., 1997).

1.4.2.2. Influence du phosphate sur le métabolisme du carbone

De façon surprenante, malgré l'arrêt de la croissance provoqué par le manque de Pi, plusieurs auteurs ont constaté que la synthèse d'amidon, de sucrose ou de fructanes augmente chez les plantes en limitation de phosphate (Avigad et Dey, 1997, Wang et Tillberg, 1997). En effet, le Pi joue un rôle de modulateur de l'activité de nombreuses enzymes du métabolisme des sucres. Beaucoup de ces enzymes possèdent une régulation allostérique par le phosphate (elles ont une forme active à l'état libre et une forme inactive lorsqu'elles sont phosphorylées) (Avigad et Dey, 1997, Huber et Huber, 1992, Plaxton, 1999).

Ainsi, en limitation de phosphate, certaines enzymes de la glycolyse (enzymes qui catalysent des réactions où l'ATP intervient) sont inhibées. Des enzymes annexes du métabolisme des sucres n'utilisant pas d'ATP (enzymes à pyrophosphate, PPi) sont alors mises en place afin de contourner les enzymes régulières qui sont inhibées par le manque d'ATP. La concentration de Pi a aussi une influence sur la fixation du CO_2 par les cellules de plantes. En fait, la fixation obscure du CO_2 est stimulée lorsque les cellules sont en limitation de Pi (Gilbert et coll., 1999).

La concentration en Pi joue donc un rôle direct sur le métabolisme du carbone. Parallèlement, la concentration en sucre du milieu a aussi une influence sur le métabolisme du phosphate. Lors de leurs travaux publiés en 1999, Touchette et Burkholder ont constaté que l'activité des phosphatases (phosphomonoesterases) dans les parties enterrées (non photosynthétiques) d'une plante aquatique (*Zostera marina* L.), augmente lorsque la concentration en sucrose est basse.

1.4.2.3. Influence du phosphate sur le métabolisme de l'azote

Il existe peu de travaux traitant de l'influence du Pi sur le métabolisme de l'azote. De part la diminution de la contribution du cycle des acides tricarboxyliques (cycle du TCA ou cycle de Krebs) en limitation de Pi (due à l'inhibition de la chaîne respiratoire), la production de squelettes carbonés utilisés pour la synthèse des acides aminés diminue. De ce fait, la consommation en azote des plantes chute en limitation de Pi.

Certains auteurs travaillant plus précisément sur l'assimilation du nitrate ont pu dégager quelques tendances reliant l'activité de la nitrate réductase et la disponibilité en phosphate. Par exemple, Kaiser et Spill (1991) ont démontré que la nitrate réductase est inhibée *in vitro* par l'ATP et réactivée en présence d'AMP. Huber et coll., (1992) ont quant à eux suggéré que la nitrate réductase des tissus photosynthétiques posséderait une régulation allostérique par le phosphate (c'est à dire que l'enzyme serait réversiblement inactivée par phosphorylation). Chez *Zostera marina* L. (une plante aquatique), l'activité de la nitrate réductase des feuilles après une période d'enrichissement en nitrate est directement liée à la concentration en Pi de l'eau (Touchette et Burkholder, 1999).

1.4.2.4. Influence de l' azote sur le métabolisme du carbone

Les voies du métabolisme de l'azote et du carbone sont profondément interconnectées chez la cellule végétale, et ce à plusieurs niveaux. Tout d'abord en présence de nitrate on constate une augmentation du flux métabolique de carbone dans la

glycolyse, la VPP, le cycle de Krebs et la chaine respiratoire en raison de la synthèse accrue d'acides aminés. Les acides aminés sont produits à partir de précurseurs carbonés issus de la VPP (Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane), de la glycolyse (Cystéine, Glycine, Alanine, Valine, Leucine) et du cycle de Krebs (Asparagine, Aspartate, Lysine, Méthionine, Thréonine, Isoleucine, Glutamine, Glutamate, Arginine, Proline). Les métabolismes de l'azote et du carbone sont interconnectés au niveau de l'incorporation de NH_4^+ dans le Glutamate et l'asparagine. Le glutamate transfère ensuite l'azote aux autres acides aminés par trans-amination. Le NH_4^+ est toxique à haute concentration car il joue le rôle de navette à proton à travers les membranes du fait de la diffusion passive du NH_3 de part et d'autre de ces membranes. De ce fait le NH_4^+ formé par réduction du nitrate doit être incorporé rapidement dans des molécules carbonées pour contourner cette toxicité.

Chez les plantes, l'incorporation du NH_4^+ dans le glutamate est majoritairement catalysée par la glutamine synthase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) (Lea et coll., 1992, Miflin et Lea, 1980). Une voie alternative catalysée par la glutamate deshydrogénase (GDH) existe également mais ne peut se substituer complètement à la voie précédente chez les plantes (Lam et coll., 1996). Contrairement à ce qui a été observé chez les levures et les champignons, chez les plantes la GDH servirait essentiellement à oxyder le glutamate pour alimenter le cycle de Krebs (Robinson et coll., 1991), sauf si la concentration cellulaire en NH_4^+ est très élevée. L'ammonium cellulaire peut aussi être intégré dans du carbamoyl phosphate par la Carbamoyl phosphate synthetase (CPSase) et être ensuite intégré dans les nucléotides à noyau pyrimidine et l'arginine (Sheri et coll., 1998) mais cette voie implique la fixation du NH_4^+ sur une molécule de HCO_3^- et non pas sur un précurseur issu du métabolisme primaire donc n'intervient pas directement dans l'interconnexion du métabolisme azote / carbone.

L'activité de la GS est rétro inhibée de façon cumulative par la Glycine, Alanine, Sérine, Histidine, Tryptophane, carbamoyl-P, glucosamine-6-P et l'ATP. L'α-ketoglutarate et la glutamine ont aussi un effet sur l'inactivation de la GS par adenylation.

Une concentration élevée en lumière et azote stimule l'activité de la voie GS-GOGAT (donc favorise la formation de Glutamate, Pajuelo et coll., 1997) mais inhibe l'activité de l'Asparagine synthase (AS). La régulation opposée de ces deux voies compétitrices permet de moduler l'interconnection entre le métabolisme de l'azote et du carbone chez les cellules de plantes (Lam et Col. 1996). Lorsque la disponibilité des sucre est élevée, la synthèse de glutamate (composé riche en carbone) est stimulée. Par contre lorsque l'apport de sucres est faible (faible luminosité), c'est plutôt de l'asparagine (riche en azote) qui sera produite pour stocker l'azote.

La réduction du nitrate en NH_4^+ augmente également la fixation anapleurotique du carbone en stimulant la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPcase). Cette enzyme catalyse une réaction de carboxylation avec formation d'acide oxaloacétique (OAA) à partir d'acide phosphoénol pyruvique. Cet OAA va ensuite alimenter le cycle du TCA, ou bien est accumulé sous forme de malate (Guy et coll., 1989, Melzer et O'Leary, 1987). Or l'activité de la PEPCase est stimulée quant on fournit du nitrate aux cellules de plantes (Duff et Chollet 1995; Murchie et coll., 2000a, Van Quy et coll. 1991a). Au niveau transcriptionnel, le nitrate a un rôle direct sur plusieurs gènes du métabolisme carboné comme par exemple le gène *PPC* (qui encode pour la PEPcase), *PKc* (qui encode pour la pyruvate kinase cytosolique) et *CS* (qui encode pour la citrate synthase mitochondriale). Cette re-programmation de l'expression génétique aboutit à l'accumulation de 2-oxoglutarate, malate et divers acides organiques (Stitt et coll., 2002). La synthèse de malate permet entre autre à la cellule de contrôler le pH cytoplasmique qui tend à monter lors de l'assimilation du nitrate.

Certains auteurs ont également observé une réduction de la synthèse de sucrose par inhibition de la sucrose-phosphate syntase (SPS) en présence de nitrate (Foyer et coll., 1994, Sugiharto and Sugiyama, 1992, Van Quy et coll., 1991b), et également une réduction de la formation d'amidon par inhibition de l'ADP-Glucose pyrophosphatase (Scheible et coll., 1997). Il apparaît donc que le nitrate a un effet direct sur la formation des réserves carbonées dans les tissus végétaux.

Comme on l'a vu plus haut, le ratio VPP / Glycolyse est en partie régulé par l'activité de la Glucose 6-P deshydrogenase (qui contrôle le flux métabolique dans la VPP). Or cette enzyme est régulée par la concentration cytoplasmique en $NADP^+$. Par extension la réaction de réduction du nitrate en ammonium stimule donc la VPP puisqu'elle produit du $NADP^+$. Le taux d'assimilation du nitrate a donc un impact direct sur le flux métabolique en direction de la voie de synthèse du shikimate (précurseur des alcaloïdes).

1.4.2.5. Influence des molécules carbonées sur le métabolisme de l'azote

Le taux de réduction du nitrate en ammonium est essentiellement régulé par l'activité du nitrate reductase (NR). Or l'activité du *NIA* (gène codant pour la NR) est quant à elle profondément régulée par la concentration de diverses molécules carbonées. Par exemple le malate, le glutamate, la cystéine et l'asparagine diminuent le taux de transcription du gène *NIA*. Une concentration basse en sucre semble avoir le même effet (Voir Stitt et coll., 2002 et ses références). Cet effet de rétro-inhibition permet de limiter la production d'ammonium quand les squelettes carbonés se font rares ou quand le métabolisme en amont (utilisation des acides aminés) ralentit.

1.5. ABSORPTION ET GESTION DES MACRO-ÉLÉMENTS PAR LES CELLULES VÉGÉTALES

Il apparaît donc clairement que phosphate et le nitrate ont tout les deux un rôle de régulation vis à vis du métabolisme du carbone. Inversement, le métabolisme du carbone a aussi une influence sur l'assimilation du nitrate. Toutes ces voies métaboliques sont inter-reliées, ce qui complique énormément la compréhension de la régulation métabolique de la production des métabolites secondaires. De plus un autre problème se pose : celui de l'absorption et du stockage des macro-nutriments par les cellules

végétales. En effet, la présence ou l'absence des divers nutriments dans le milieu de culture n'est pas un gage de la disponibilité de ces nutriments au niveau métabolique comme nous allons le voir plus loin.

1.5.1. GESTION DU CARBONE

1.5.1.1. Absorption du glucose extracellulaire

Il y a 2 mécanismes d'absorption des sucres chez les cellules végétales : le premier implique le transport direct du sucrose à travers la membrane plasmique (Madore et Lucas, 1989 et références associées), le 2ème passe par l'hydrolyse du sucrose par des invertases présentes sur la paroi pecto-cellulosique suivie par l'absorption du glucose et fructose libérés (Eschrich 1989 et références associées). Dans les 2 cas, l'absorption se fait par l'intermédiaire de protéines trans-membranaires (transporteurs du sucrose et des hexoses) par un mécanisme de symport actif impliquant un proton.

L'absorption du sucrose et des hexoses est le résultat d'un équilibre entre l'influx et l'efflux de ces molécules de part et d'autre de la membrane plasmique. L'influx est régi à la fois par des transporteurs à haute et basse affinité. Dans les feuilles de *Vicia faba*, le K_m et V_{max} du système à haute-affinité / basse capacité (HALC) ont été mesurés à 2.7 mM et 0.71 nmol cm^{-2} min^{-1} respectivement. Pour le système basse-affinité / haute capacité (LAHC) un K_m of 25.8 mM et un V_{max} of 3.6 nmol cm^{-2} min^{-1} ont été rapportés (Delrot and Bonnemain, 1981). L'efflux se fait par transport passif à travers la membrane plasmique et joue un rôle important lors du contrôle de la concentration cytosolique en sucres. Ainsi lorsque le milieu extérieur est riche en sucres, l'efflux de sucre augmente ce qui contribue à maintenir l'homéostasie cellulaire.

1.5.1.2. Stockage et mobilisation des réserves

Une fois qu'ils ont été absorbés, les sucres sont soit oxydés par l'intermédiaire de la glycolyse ou de la VPP, soit stockés sous forme d'amidon, glucose, sucrose, lipides et / ou protéines. L'amidon, les protéines de réserve et les lipides de réserve sont produits et accumulés dans les plastes alors que les autres composés sont majoritairement stockés dans la vacuole.

Chez l'ananas, le sucrose serait importé dans la vacuole par un uniport, et serait ensuite hydrolysé en glucose et fructose dans la vacuole (McRae et al. 2002). L'efflux de sucrose hors de la vacuole se fait également par transport actif ATP-dépendant (Echeveria et Gonzalez, 2000).

Lorsqu'une suspension cellulaire de *Chenopodium rubrum* est alimentée en glucose, l'accumulation d'amidon est très rapide (Hatzfeld et coll. 1990). La synthèse d'amidon a lieu dans les plastes et se fait par polymérisation d'unités ADP-glucose catalysée par la starch syntase (SS). L'ADP-glucose est lui-même synthétisé à partir de glucose 1-P et d'ATP par l'ADPglucose pyrophosphorylase (AGPase) (Preiss, 1991). L'activité de l'AGPase est activée par la concentration en acide 3-phosphoglycerique (3-PGA) et inhibée par le Pi (Preiss et Sivak 1998).

Les lipides sont présents sous deux formes dans les cellules végétales : une forme constitutive (phospholipides des membranes plasmiques) et une forme de réserve (triglycerides). Les acides gras sont synthétisés dans les leucoplastes à partir majoritairement d'acétate ou de malate (Ohlrogge et Jaworski 1997) et peuvent parfois constituer jusqu'à 40 % du poids sec des tissus végétaux. Le mécanisme d'importation de l'acétate dans les plastes est encore mal connu. Le malate, lui, est importé dans le stroma par un antiport malate/phosphate (Eastmond et coll., 1997). La synthèse d'acide gras nécessite un approvisionnement important des plastes en NADPH et ATP. Dans les tissus non photosynthétiques, cette synthèse nécéssite donc une contribution importante de la glycolyse et de la VPP (Kang and Rawsthorne 1996).

Les cellules de plantes peuvent aussi accumuler des protéines de réserves dans les protéoplastes. Les plastes sont alimentés en nitrite et glucose 6-P qui est alors métabolisé par le biais de la VPP platidique en CO_2 et triose-P tout en générant des NADPH. Ce NADPH est ensuite utilisé pour réduire le nitrite en ammonium et synthétiser les acides aminés. De ce fait le métabolisme de l'azote et du carbone sont intimement liés dans les plastes (Neuhaus et Emes 2000 et références associées).

L'amidon, glucose, sucrose, lipides et / ou protéines stockés dans les différents compartiments cellulaires sont ensuite utilisés quand l'absorption de sucres extracellulaires devient insuffisante pour soutenir les besoins métaboliques de la cellule.

1.5.2. GESTION DU PHOSPHATE

1.5.2.1. absorption du phosphate extracellulaire

L'absorption du Pi est lui aussi le résultat d'un équilibre entre l'influx et l'efflux de part et d'autre de la membrane plasmique. Le taux d'absorption du Pi varie considérablement d'une espèce à l'autre, entre les différents tissus d'une même plante et également en fonction du statut nutritionnel des cellules étudiées. En limitation de Pi, la capacité d'absorption du Pi des cellules de plantes augmente considérablement.

L'influx du P_i semble régi par un système double comprenant des transporteurs à haute affinité (en action lorsque les concentrations extracellulaires en P_i sont de l'ordre du µM) et des transporteurs à basse affinité (concentrations de l'ordre du mM). La plupart des auteurs suggèrent l'existence de plusieurs systèmes de transporteurs qui entreraient en action à tour de rôle selon le statut phosphaté de la cellule et la concentration extracellulaire en P_i.

L'influx de P_i est également lié au gradient de pH de part et d'autre de la membrane plasmique (Raghothama et coll., 1999). Cette dépendance suggère que le transport du Pi

dans les cellules de plantes est probablement du à un symport nH^+/PO_4^{3-} (Reid et coll., 1999).

L'efflux du Pi par fuite passive à travers la membrane plasmique et par l'intermédiaire des transporteurs semble également jouer un rôle important lors du contrôle de la concentration cytosolique en phosphate. Ainsi lorsque le milieu extérieur est riche en phosphate, la membrane plasmique devient plus perméable au P_i. L'efflux de P_i compense alors l'influx ce qui permet à la cellule de maintenir son homéostasie (Raghothama, 1999). Plusieurs auteurs ont par ailleurs suggéré que l'augmentation de l'absorption globale du P_i serait due à une diminution de l'efflux plutôt qu'à une augmentation de l'influx (voir par exemple Bieleski, 1973).

1.5.2.2. Stockage vacuolaire

Lorsqu'on place des cellules de plantes dans un milieu de culture contenant du P_i, on observe que ce phosphate disparaît très rapidement du milieu (en quelques heures dans certains cas). Les cellules absorbent rapidement le phosphate extracellulaire puis poursuivent leur croissance grâce au phosphate stocké au niveau intracellulaire. Les plantes ont développé ce mécanisme afin de s'adapter à la faible disponibilité du phosphate dans le sol. Elles ont donc acquis des moyens performants pour absorber le phosphate inorganique extracellulaire, le stocker dans leurs différents compartiments cellulaires puis le déstocker lorsque le milieu extérieur ne leur permet plus de s'approvisionner correctement.

Ce mécanisme complexe permet aux cellules de plantes de maintenir leur concentration cytosolique en P_i à une valeur fixe même lorsque le milieu extérieur ne contient plus de phosphate. En effet, le P_i jouant un rôle fondamental et central dans la régulation du métabolisme des plantes, la concentration de P_i dans le cytosol doit être contrôlée. La cellule se trouve donc face à un dilemme: elle doit emmagasiner du P_i dans l'espace intracellulaire sans que la concentration cytosolique en P_i en soit affectée.

Les cellules de plantes ont donc mis en place des mécanismes qui leurs permettent de rendre une partie du P_i intracellulaire momentanément indisponible à des fins métaboliques. Parmi ces mécanismes, les plus courants sont l'estérification du P_i sur des molécules organiques (comme les sucres phosphatés), la polymérisation du P_i en molécules contenant plusieurs phosphates (PP_i ou polyphosphates) et la compartimentation du phosphate.

La compartimentation du phosphate constitue une façon ingénieuse pour la cellule de stocker du P_i tout en assurant l'homéostasie des compartiments métaboliques (cytosol, mitochondries et plastes). Le P_i est ainsi stocké sous forme de $H_2PO_4^-$ dans un compartiment de stockage (la vacuole), et ce pour des coûts énergétiques minimes (voir paragraphe suivant). Il pourra ensuite être redistribué au cytosol au fur et à mesure des besoins cellulaires.

La membrane vacuolaire doit constamment réagir aux besoins cellulaires ainsi qu'à la disponibilité du phosphate dans le milieu extérieur. C'est en quelque sorte le magasinier de la cellule, elle doit gérer les stocks malgré des influx incertains tout en s'assurant que l'approvisionnement aux clients est adéquat et constant. Pourtant, bien que ce rôle central de la vacuole soit maintenant bien établi au sein de la communauté scientifique, on sait encore bien peu de choses sur les mécanismes de régulation qui sont impliqués à ce niveau.

1.5.2.3. Transport du Pi à travers la membrane vacuolaire

L'homéostasie (i.e. le maintient d'une concentration en P_i stable du cytoplasme) est assurée par une combinaison de transports membranaires et d'échanges entre les différentes sources de phosphate, c'est à dire principalement : le milieu extérieur, la vacuole, le phosphate constitutionnel (i.e. le phosphate contenu dans les membranes, le noyau, etc.) et le phosphate insoluble (acide phytique). Chez les plantes supérieures, 95 % du phosphate inorganique est contenu dans la vacuole lorsque les cellules ne sont pas limitées en P_i extracellulaire, (Plaxton et coll., 1999).

Le Transport du P_i du cytoplasme vers la vacuole est thermodynamiquement très diffèrent du transport à travers la membrane plasmique. En effet, les concentrations en Pi du cytoplasme et de la vacuole sont du même ordre de grandeur (concentrations de l'ordre du mM). Comme de plus le potentiel membranaire de la vacuole est légèrement positif, le transport du Pi à travers la membrane ne nécessite théoriquement pas d'énergie.

Les résultats de Mimura et coll. publiés en 1990 indiquent que l'influx en P_i dans la vacuole est contrôlé par plusieurs mécanismes dont l'action est modulée par le statut phosphaté des cellules. Il semble donc exister au niveau de la membrane vacuolaire au moins deux systèmes de transporteurs. Le premier, peu efficace et non dépendant de l'ATP, entrerait en action lorsque l'apport en Pi des cellules est suffisant. Le second, plus performant et dépendant de l'ATP, serait seulement actif en réponse à une limitation en P_i.

1.5.2.4. Mobilisation du stock vacuolaire

Contrairement au stockage, le déstockage du phosphate hors de la vacuole est essentiellement un processus actif c'est à dire qu'il implique une consommation d'ATP (Raghothama, 1999). L'efflux du phosphate de la vacuole vers le cytoplasme semble être directement lié aux besoins en Pi de la cellule. Ainsi, l'efflux vacuolaire de P_i semble être très faible pour des cellules non limitées en P_i extracellulaire. Plusieurs études indiquent

que la perméabilité du tonoplaste au P_i augmente rapidement en condition de stress phosphaté. En fait, le déstockage dépend de l'importance du stress phosphaté, c'est à dire de la disponibilité du P_i extracellulaire et des besoins de la cellule (Plaxton et coll., 1999). D'autres expériences indiquent que lorsque les cellules sont en manque d'oxygène, du P_i fuit passivement hors de la vacuole (Mimura, 1999).

1.5.2.5. Stress sévère en Pi : mise en place des mécanismes adaptatifs de survie

Lorsqu'il n'y a plus de phosphate dans le milieu extérieur et que les réserves vacuolaires s'amenuisent, des processus adaptatifs se mettent en place afin d'économiser et de recycler le phosphate cellulaire. Dans un premier temps, la perméabilité au P_i de la membrane plasmique diminue afin d'éviter la fuite du phosphate dans le milieu extérieur. En même temps, l'affinité des transporteurs membranaires pour le P_i augmente afin de maximiser l'influx (Malboobi et coll., 1999).

La cellule modifie également son métabolisme afin de faire des économies de P_i. Certaines voies métaboliques très gourmandes en P_i mais non vitales à court terme sont inhibées (i.e. la photosynthèse). D'autre part, la cellule récupère le P_i contenu dans les esters (i.e. sucres phosphatés) ce qui le rend à nouveau disponible pour le fonctionnement de base. Pour ce faire, la cellule fait appel aux voies métaboliques qui lui permettent de synthétiser des macromolécules à partir de molécules phosphatées.

Par exemple, la synthèse d'une molécule d'amidon à 30 glucoses permet de récupérer les 30 P_i contenus dans 30 molécules de glucose 6-P. La synthèse de noyaux aromatiques (synthèse des anthocyanes, flavonoïdes, alcaloïdes à noyau indole, etc.) permet également de remettre en circuit le P_i immobilisé sur les intermédiaires phosphatés. Ainsi, plusieurs enzymes clefs de la formation des métabolites secondaires aromatiques sont hyperstimulées en manque de P_i (Plaxton et coll., 1999). Les voies du

métabolisme secondaire permettent donc de remobiliser le P_i contenu dans les esters phosphatés issus du métabolisme primaire.

De plus, tout un réseau de voies métaboliques alternatives faisant intervenir des molécules de pyrophosphate (PP_i) viennent remplacer les voies tributaires du P_i. En période de stress phosphaté, le PP_i est utilisé dans le métabolisme des sucres et au niveau de la membrane vacuolaire afin d'économiser l'ATP cytoplasmique. En dernier recours, la cellule doit aller puiser dans son phosphate constitutionnel pour survivre.

1.5.3. GESTION DU NITRATE

1.5.3.1. Absorption du nitrate extracellulaire

Comme dans le cas du phosphate, l'absorption du nitrate est le résultat d'un équilibre entre l'influx et l'efflux de part et d'autre de la membrane plasmique. Le transport du nitrate dans les cellules de plantes est du à un symport nH^+/NO_3^- (avec n=2 ou 3). L'influx est régi par un système double comprenant des transporteurs à haute et basse affinité (Aslam et coll., 1992, Doddema et Telkamp 1979, Hole et coll., 1990). Une partie des transporteurs à haute affinité sont constitutifs (présents sur la membrane même si le nitrate est absent du milieu extérieur), l'autre partie est inductible (synthétisés lorsque la concentration en nitrate atteint 0.2 mM et saturés à une concentration supérieure à 0.5 mM). Au-dessus de 0.5 mM, ce sont les transporteurs à basse affinité qui prenne le relais, avec des taux de transports pouvant aller jusqu'à 700 $\mu mol\ h^{-1}\ g^{-1}$ de poids humide (Doddema et Telkamp 1979). L'efflux quant à lui se fait par transport passif à travers la membrane plasmique. Certaines études ont suggéré que ce système de transport serait saturable, sélectif pour le nitrate et inductible (Aslam et coll., 1996, Grouzis et coll., 1997).

L'absorption du nitrate est régulée par le statut azoté des cellules. Ainsi chez les plantes déficientes en azote, le taux d'absorption de l'azote est significativement

supérieur à celui de cellules non limitées en azote. Après un contact prolongé avec une source de nitrate, le taux d'absorption diminue. Cet effet de rétro-inhibition a aussi été observé vis à vis de la concentration cytoplasmique en nitrite et ammonium (Aslam et coll., 1992, Doddema et Telkamp 1979). Cette modulation de l'absorption de nitrate en fonction du statut azoté serait reliée à la concentration intracellulaire en glutamine et asparagine.

Une fois que le nitrate est absorbé, il est soit réduit en ammonium, soit ré-exporté (efflux), soit stocké dans la vacuole.

1.5.3.2. Stockage vacuolaire et mobilisation des réserves

Lorsqu'on fournit à une plante une source illimitée en nitrate, la concentration intracellulaire en nitrate peut atteindre jusqu'à 100 mM, dont la plus grande partie se situe dans la vacuole. La concentration cytoplasmique en nitrate semble varier selon le statut nutritionnel des cellules. Dans les plantes entières d'orge, la concentration cytoplasmique varie de non mesurable pour les cellules limitées en azote à 35 mM pour une concentration en NO_3^- de 1 mM dans la solution d'alimentation (Siddiqi et coll., 1991). Cependant dans une autre étude utilisant des micro-électrodes, la concentration cytoplasmique de nitrate était plutôt stable à entre 4 et 5 mM (toujour chez l'orge) pour des concentrations dans la solution nutritive variant de 0.1 à 10 mM (Miller et Smith 1996).

Plusieurs autres publications semblent prouver que la concentration en nitrate cytoplasmique est sous contrôle homéostasique de la vacuole, c'est à dire qu'il est maintenu constant par déstockage du nitrate vacuolaire (Martinoia et coll., 1981, Van der Leif et coll., 1998). L'ammonium est également stocké dans la vacuole, mais les concentrations rapportées varient énormément selon les techniques de mesure utilisées (de 3 à 11 mM, Miller et coll., 2001). Chez le maïs, les valeurs obtenues par RMN *in vivo* indiquent une concentration cytoplasmique en NH_4^+ de 1.5 mM et une concentration

vacuolaire de 8 mM (Kawamura et coll., 1996, Lee et Ratcliffe 1991), ce qui semble indiquer une fois de plus que la vacuole joue le rôle de réserve et tamponne la concentration cytoplasmique. Carroll et coll., (1994) ont aussi indiqué que plusieurs acides aminés peuvent être stockés dans la vacuole de cellules de carotte.

1.6. REVUE DES MÉTHODES EMPLOYÉES POUR MESURER LES CONCENTRATIONS INTRACELLULAIRES DES DIFFÉRENTS NUTRIMENTS.

1.6.1. COMPARAISON DES DIFFERENTES METHODES DE MESURE DES CONCENTRATIONS INTRACELLULAIRES : CAS DU PI

Quand on consulte la littérature, on est surpris de constater à quel point les données concernant les concentrations intracellulaires en nutriment sont variables d'une étude à l'autre. Par exemple les valeurs de concentration en Pi du cytoplasme et de la vacuole de plusieurs cellules de plantes diffèrent énormément selon les auteurs, les cellules étudiées et la méthode de mesure employée (pour plus de détails, se référer à la revue de littérature de Mimura parue en 1999).

Différentes méthodes sont disponibles pour obtenir des données de compartimentation (c'est à dire les concentration en nutriments dans les différents compartiments), comme l'extraction de vacuole, l'utilisation de micro-électrodes, de colorants, de traceurs radioactifs ou la RMN in vivo. Lorsqu'on compare les données recueillies grâce à ces différentes méthodes, on constate que les valeurs de la concentration cytoplasmique en P_i obtenues en ^{31}P-RMN sont toujours inférieures à celles obtenues par les méthodes extractives. Les concentrations obtenues en ^{31}P-RMN sont généralement inférieures à 10 mM et entre 10 et 30 mM avec les autres méthodes impliquant l'extraction de vacuoles. Ces différences sont dues d'une part au fait qu'une partie du P organique est hydrolysée et passe sous forme inorganique lors de l'extraction.

De plus, avec les méthodes extractives, il faut évaluer le volume des différents compartiments cellulaires afin de passer en concentration molaire (les résultats sont obtenus en concentration massique). Or, le volume cellulaire et vacuolaire des cellules de plante change énormément en cours de culture et il est très difficile d'en faire une évaluation fiable lors des cultures de routine.

En ce qui concerne la vacuole, la concentration en P_i est intimement liée à la disponibilité du Pi dans le milieu de culture et peut donc varier de façon considérable. Les valeurs maximales recueillies par ^{31}P-RMN sont de l'ordre 40 mM de P_i mais peuvent atteindre 120 mM pour des vacuoles extraites (vacuoles issues de protoplastes de *Hordeum vulgare* placés dans un milieu contenant 40 mM de Pi, Mimura, 1999). Ici encore, les concentrations mesurées par extraction de vacuoles sont beaucoup plus élevées que celles mesurées par ^{31}P-RMN.

1.6.2. RMN DU PHOSPHATE IN VIVO

Le phosphore joue un rôle clef dans l'équilibre énergétique et métabolique des cellules. De ce fait, il est l'objet d'une attention toute particulière de la part de la communauté scientifique. Les études traitant de la dynamique de répartition du phosphate dans les plantes ou les cellules de plantes s'appuient sur des méthodes visant à quantifier la concentration en phosphate dans des cellules et les tissus. Il existe plusieurs méthodes pour y parvenir, qui peuvent être grossièrement scindées en deux catégories, selon qu'elles nécessitent ou pas l'extraction du phosphate des cellules. Parmi les méthodes extractives, on peut par exemple citer l'extraction de vacuoles et d'organites cellulaires.

La spectroscopie par résonance magnétique (RMN) est aujourd'hui la technique de choix en ce qui concerne l'étude des molécules phosphatées *in vivo*. Dans les paragraphes suivants, nous verrons les avantages et les limitations de cette technique.

1.6.3. LES POSSIBILITES DE LA RMN DU PHOSPHATE

La RMN possède de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes permettant d'évaluer le métabolisme du phosphate. Tout d'abord, la RMN permet d'étudier des cellules vivantes, dont le métabolisme n'est pas perturbé. C'est en effet une méthode non invasive et non destructive qui permet d'observer la répartition du phosphate dans les différents compartiments de la cellule sans l'endommager.

Deuxièmement, cette technique ne nécessite pas d'extraction ce qui limite d'autant les erreurs de quantifications. La RMN du phosphate permet d'évaluer en une seule mesure la concentration en Pi cytoplasmique et vacuolaire ainsi que la concentration de plusieurs molécules organiques contenant du P comme les nucléotides triphosphatés et le glucose 6-P. Avec cette même technique, on peut de plus évaluer précisément le pH cytoplasmique et suivre son évolution en fonction par exemple d'une modification des conditions de culture des cellules.

La RMN du phosphate permet également d'évaluer des flux métaboliques *in vivo*. On utilise alors la technique de la RMN en deux dimensions. Dans leur publication parue en 1998, Roscher et ses collaborateurs ont ainsi pu suivre l'activité de quatre enzymes importantes du métabolisme des sucres (l'UDP-glucose pyrophosphorylase, la phosphoglucomutase, l'hexose phosphate isomérase et l'énolase) dans des extrémités vivantes de racines de maïs.

Cependant, le temps d'acquisition des spectres RMN *in vivo* est souvent long (de 2 à 4 heures) car le signal de résonance est tellement faible que l'on doit accumuler un grand nombre de mesures afin d'obtenir une résolution acceptable. La RMN *in vivo* ne permet donc pas d'obtenir des spectres instantanés du statut phosphaté des cellules. On ne peut obtenir que des signaux moyens acquis sur des périodes de plusieurs heures (Ratcliffe, 1996).

Un des principaux problèmes rencontrés en RMN *in vivo* consiste à maintenir les cellules dans un état physiologique donné pendant toute la durée de l'acquisition de

données et ce alors qu'elles sont confinées dans un petit tube de quelques mm de diamètre à l'intérieur de l'appareil de RMN (les sondes les plus grosses acceptent des tubes de 15 mm de diamètre). Certains auteurs ont mis au point des systèmes de perfusion qui permettent d'alimenter les cellules en continu en nutriments et en oxygène. Cependant, du fait que les cellules doivent être maintenues à très haute concentration cellulaire dans le tube, il est difficile de s'assurer que l'alimentation est uniforme et que toutes les cellules sont soumises aux même conditions de culture.

De plus, le P_i insoluble précipité sous forme de sels est invisible (non détecté) en ^{31}P-RMN en phase liquide. Chez les plantes inférieures, ce phosphate insoluble constitue pourtant une forme de réserve de Pi non négligeable et est resolubilisé lorsque la cellule en a besoin.

Pour finir, mentionnons que si le pH du cytoplasme diminue (par exemple lorsque la cellule manque d'oxygène) ou si le pH vacuolaire augmente (par exemple en cas de stockage massif de NH_4^+), le pic du Pi cytoplasmique se confond avec celui du Pi vacuolaire ce qui peut fausser l'interprétation des résultats.

1.6.4. RMN DU CARBONE

Le ^{12}C, qui constitue l'isotope du carbone le plus abondant dans la nature, ne peut pas être étudié par RMN car il ne possède pas de spin. Cependant, de plus en plus d'auteurs utilisent la RMN du carbone afin d'étudier plus en détails le métabolisme de diverses cellules. Pour ce faire, ils utilisent des précurseurs marqués au ^{13}C comme par exemple du glucose ou du CO_2 marqués. Les cellules de plantes métabolisent ce glucose et le ^{13}C est incorporé dans les différents métabolites. La RMN du ^{13}C permet d'une part de caractériser des voies métaboliques ou biosynthétiques et d'autre part de quantifier le flux de carbone dans ces voies métaboliques.

1.6.4.1. Caractérisation de voies métaboliques et mesure de flux métaboliques

La RMN du ^{13}C permet de caractériser des voies métaboliques ou biosynthétiques, c'est à dire qu'elle permet d'identifier les différents intermédiaires de ces voies. Cette technique a par exemple été employée chez les cellules de plantes pour élucider la voie de biosynthèse de divers métabolites secondaires.

Pour découvrir quels sont les intermédiaires d'une voie biosynthétique, les cellules sont placées dans un milieu contenant un précurseur marqué au ^{13}C (par exemple du $^{13}C_1$-glucose). Les métabolites intracellulaires sont ensuite extraits et identifiés par RMN. On a ainsi pu élucider quelques voies biosynthétiques des cellules de plantes comme celle de la hyoscamine (Rhodes et coll., 1997). Une fois que les intermédiaires de la voie biosynthétique sont connus, il faut identifier les points ou la voie se divise et où se situent les nœuds critiques. Cette approche implique la mise en place de bilans de masse et de bilans énergétiques pour l'ensemble de la voie biosynthétique. Cette démarche permet ainsi de dégager les éléments qui contrôlent la voie de biosynthèse. Une revue bibliographique sur la régulation métabolique de la biosynthèse des anthocyanes a par exemple été publiée en 1995 (Holton et Cornish, 1995).

La publication de Dieuaibe-Noubhani et coll. parue en 1996 donne une idée de la puissance de la RMN du carbone pour estimer les flux métaboliques. Ils ont ainsi pu déterminer que dans leurs conditions expérimentales, 32 % du glucose consommé par leurs racines de maïs était stocké sous forme d'amidon, 47 % était dirigé vers la glycolyse et 21 % vers la voie oxydative des pentoses phosphates.

1.6.4.2. RMN du carbone in vivo

La RMN permet également de déterminer la concentration de certains métabolites *in vivo*. Dans leur dernière publication parue en 1999, Rijhwani, Ho et Shanks ont ainsi quantifié les concentrations intracellulaires en glucose, pyruvate, glutamine, malate et glucanes (sucres complexes entrant dans la composition de la paroi pectocellulosique). Le spectre RMN qu'ils ont obtenu est présenté en annexe 2. En étudiant l'enrichissement du pyruvate en ^{13}C, ils ont également réussi à évaluer le ratio glycolyse / VOPP.

La RMN du carbone *in vivo* permet aussi d'évaluer le pH vacuolaire. Par exemple, le pic de résonance du ^{13}C-malate se déplace en fonction du pH. On peut donc quantifier la valeur du pH vacuolaire en suivant la position du pic du malate vacuolaire (Roberts et jardetzky, 1981).

CHAPITRE 2. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE ET STRATÉGIES EMPLOYÉES

2.1. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Comme nous l'avons vu dans la revue de littérature, les données recueillies à ce jour concernant l'influence de la composition des milieux de culture sur la production des MS sont très contradictoires. Cependant il apparaît également que les cellules de plantes peuvent accumuler des quantités importantes de nitrate, phosphate et carbone au niveau intracellulaire et que cette source «invisible» de nutriments a été très peu exploitée jusqu'à présent dans les travaux publiés.

Ce travail est donc fondé sur l'hypothèse principale que les concentrations intracellulaires en nutriments peuvent tamponner l'effet d'une modification du milieu de culture sur la production de métabolites secondaires chez les cellules de plantes. Le fait que le « bagage nutritionnel » (concentrations intracellulaires en nutriments) des cellules de plantes ait été largement ignoré en biotechnologie végétale jusqu'à présent pourrait expliquer le manque de reproductibilité souvent reporté en culture de cellules de plantes. Le bagage nutritionnel des cellules pourrait également expliquer les résultats contradictoires publiés sur l'effet d'une modification du milieu de culture sur la production de métabolites secondaires.

2.2. OBJECTIF PRINCIPAL ET OBJECTIFS SECONDAIRES

L'objectif principal de ce travail était de dégager d'éventuels liens entre le statut nutritionnel des cellules de plante cultivées et leur capacité à produire des métabolites secondaires. Nous cherchions entre autre à expliquer le manque de reproductibilité dans la croissance et la production observée au laboratoire. Pour avoir une idée précise du statut nutritionnel des cellules de plantes, il fallait donc travailler sur des données extra-cellulaires mais aussi intracellulaires.

Nous possédions déjà au laboratoire une longue expertise en matière d'analyse de milieux de culture. Cependant, tout restait à développer au niveau intracellulaire. Le premier sous objectif de ce travail était donc de développer des techniques pour évaluer les concentrations intra-cellulaires en nutriments, et si possible d'obtenir également des données sur la compartimentation (c'est à dire savoir dans quel compartiment cellulaire ces nutriments sont stockés et à quelle concentration). Le deuxième sous objectif était de développer des outils pour caractériser le plus précisément possible les cellules de plantes lors de la culture. Enfin le dernier sous objectif était d'étudier l'influence de diverses modification du milieu de culture sur les concentration intra et extra-cellulaires en nutriments, la croissance cellulaire et la capacité à produire des MS.

2.3. CHOIX DES CELLULES

Nous possédons au laboratoire une suspension cellulaire d'*Eschscholtzia californica* (pavot de Californie) qui est maintenue en culture depuis plus de 10 ans mais continue à produire des métabolites secondaires. Ces cellules produisent des alcaloïdes benzophenanthridine, dont par exemple la sanguinarine qui a des propriétés antiseptique, anti-inflammatoire et anticancéreuse. Elle a notamment été incorporée dans des rince-bouches et des dentifrices pour son efficacité prouvée à prévenir la plaque dentaire.

Cet alcaloïde n'est plus utilisé commercialement aujourd'hui car certaines études ont prouvé qu'il est cancérigène. Cependant notre suspension cellulaire est utilisée depuis de nombreuses années dans le laboratoire en tant que suspension modèle. Le fait que le taux de croissance de ces cellules soit relativement rapide (temps de sub-culture de 10 jours en moyenne) et que leur capacité de production soit encore intacte après plusieurs années de culture en font de bonnes cellules modèles pour mener à bien nos expériences.

2.4. CHOIX DU MODE DE CULTURE

De par la grande instabilité des cellules vis à vis de la production et de la croissance, il nous semblait primordial de privilégier le nombre de réplicats lors des expériences. Pour cette raison nous avons choisi de travailler en flacons agités plutôt qu'en bioréacteur, bien que le laboratoire possède une grande expertise en conception et opération de bioréacteurs. Le flacon agité est un système de culture très simple qui ne permet pas d'études poussées sur les échanges de gaz. De plus la concentration en gaz dissous ne peut être contrôlée et on est limité à la culture en mode cuvée. Cependant les flacons agités ont un taux de transfert en oxygène supérieur à la majorité des bioréacteurs utilisés en culture de cellules végétales ($k_l \cdot a$ de 18 h^{-1} pour un flacon Erlemmeyer de 500 ml contre moins de 5 h^{-1} pour un bioréacteur à double hélice de 2 litres avec bullage et aération de surface), un bon taux de mélange et sont très simples à opérer. Les risques de contamination sont aussi considérablement réduits en flacon agité par rapport au bioréacteur et les difficultés d'opération sont considérablement diminuées. De part leur grande simplicité à opérer et le peu de place qu'ils requièrent, ils permettent de multiplier le nombre de réplicats.

De plus nous voulions également multiplier les points d'échantillonnage et le nombre important d'analyse sur chaque échantillon nécessitait 250 ml de suspension cellulaire pour chaque échantillon. Si les cellules avaient été cultivées en bioréacteur, les prélèvements combinés auraient totalisé presque 4 litres de suspension tout au long de la culture, ce qui aurait nécessité un bioréacteur d'au moins 20 litres (en fait 3 réacteurs de 20 L pour les 3 réplicats). La solution du flacon agité semblait donc la plus appropriée, permettant de limiter la quantité de biomasse à produire tout en maintenant un nombre de réplicats importants lors des expériences.

De plus au laboratoire, les cultures cellulaires sont maintenues à long terme dans des flacons agités de 500 ml. Ces mêmes flacons ont été retenus lors des expériences afin

de parfaitement caractériser les cellules lors de leur courbe de croissance (période entre 2 subcultures).

CHAPITRE 3. PRÉSENTATION DES ÉTAPES DE TRAVAIL

Dans un premier temps, il était nécessaire de développer des méthodes et des outils d'analyse fiables pour caractériser les cellules de plantes et évaluer les concentrations intracellulaires en nutriments. Nous avons commencé par chercher un moyen d'obtenir des données respirométriques fiables dans nos suspensions cellulaires. Cela posait un problème particulier en raison du faible taux de respiration des cellules végétales et de leur sensibilité au cisaillement. Un respiromètre spécialement adapté aux cellules de plantes a donc été développé ce qui a fait l'objet de notre première publication (chapitre 5). Nous avons en parallèle travaillé sur le développement d'une méthode d'évaluation de la concentration cellulaire dans les suspensions végétales. En effet le comptage microscopique est très fastidieux et long ce qui le rend peu adapté pour pratiquer des analyses de routine. Une méthode de mesure employant un colorant spécifique à l'ADN et un lecteur de micro-plaque a été développée et a fait l'objet d'une deuxième publication (chapitre 6). Dans le même ordre d'idée, nous avons également développé un système de perfusion afin d'alimenter des cellules de plantes vivantes à l'intérieur d'un tube de RMN ainsi que diverses méthodes analytiques pour mesurer les concentration intracellulaires en nutriment (voir dans la partie méthodologie).

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé ces techniques et outils sur nos cellules modèles d'*Eschscholtzia californica* afin de dégager des liens éventuels entre leur statut nutritionnel et la production de métabolites secondaires. Les cellules ont été cultivées à long terme sur 3 milieux de culture différant par leur concentration en nitrate et phosphate. Les 3 suspensions cellulaires ainsi obtenues ont été étudiées en détail le long de la durée d'une sub-culture afin de déceler des éventuelles différences dans le statut nutritionnel et la production de MS ($3^{ème}$ publication chapitre 7). De plus des modifications ponctuelles de la concentration en nutriments des milieux ont aussi été faites. Suite à ces ajouts ponctuels, les modifications du statut nutritionnel et de la capacité de production des MS des cellules ont été évaluées afin d'affiner notre

compréhension des phénomènes reliant le statut nutritionnel et la production chez les cellules de plantes (Chapitre 8).

CHAPITRE 4. MÉTHODOLOGIE

4.1. MILIEUX DE CULTURE

4.1.1. MILIEUX DE CULTURE

Les cellules ont été cultivées à long terme sur 3 milieux de culture différant par leur concentration en nitrate et phosphate. La concentration de ces milieux est récapitulée au tableau 1. Le pH de tous les milieux a été ajusté à 5,5 avant autoclavage à l'aide d'une solution concentrée de KOH. Tous les milieux ont été préparés avec de l'eau déionisée. Les 3 milieux ont été supplémentés avec 0,2 $mg.l^{-1}$ d'acide dichlorophenoxy-acétique (2,4-D, 0,9 mM) et 0,1 $mg.l^{-1}$ de kinétine.

4.1.2. MILIEU DE PRODUCTION

Le milieu de production des métabolites secondaires correspond aux concentrations en macro-nutriments du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962, voir tableau 1) avec 30 $g.l^{-1}$ de glucose. Le milieu de production ne contenait pas de phytohormones, vitamines et micro-nutriments car ces composés auraient de toute façon été adsorbés sur la résine extractive. La composition de ce milieu est résumée au tableau 1. Le pH a été ajusté à 5,5 avant autoclavage à l'aide d'une solution concentrée de KOH.

Tableau 4.1: Composition des milieux de culture.

	Medium 1	*Medium 2*	*Medium 3*	*Production medium*
Glucose (mM)	138	138	138	138
PO_4^{3-} (mM)	1.1	0.8	1.1	0
NO_3^- (mM)	25.0	25.0	12.5	39.4
NH_4^+ (mM)	2.0	2.0	2.0	20.6
K^+ (mM)	25.0	25.0	25.0	18.8
Other major ions	as in B5[a]	as in B5[a] except Na[b]	as in B5[a] except Cl[c]	as in MS[d]
Micronutrients	as in B5	as in B5	as in B5	none
Vitamins	as in B5	as in B5	as in B5	none
Hormones	Yes[e]	Yes[e]	Yes[e]	none

[a]: voir Gambord and al., 1968 et annexe 1. [b]: 0.8 mM Na^+ instead of 1.1 mM. [c]: 14.5 mM Cl^- instead of 2.0 mM. [d]: Murashige et Skoog, 1962 et annexe 1. [e] :0.2 mg·l^{-1} 2,4-D + 0.1 mg·l^{-1} kinetin.

4.1.3. STÉRILISATION DES MILIEUX

Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C et 1×10^5 Pa pendant 20 minutes.

4.2. MATÉRIEL VÉGÉTAL

4.2.1. OBTENTION DES CELLULES EN SUSPENSION

4.2.1.1. Mise en culture des callus

Des graines de pavot de Californie (*Eschscholtzia californica*) ont été placées pendant 2 minutes sous agitation dans une solution d'éthanol 70 %. Elles ont ensuite été stérilisées dans une solution de 20 % d'eau de Javel commerciale (contenant 5 % d'hypochlorite) sous agitation pendant 20 minutes, puis rincées à 3 reprises dans de l'eau distillée stérile. Les graines ont ensuite été placées dans des boites de pétri, sur une double couche de papier filtre pré-stérilisé et humidifié. La germination a eu lieu à l'obscurité à 26°C en environ 10 jours.

Un tronçon d'hypocotyle a été prélevé stérilement sur les plantules et placé sur du milieu d'induction gélifié avec 8 $g.l^{-1}$ d'agar (Sigma). A partir du deuxième mois, les calli à croissance rapide obtenus ont été repiqués sur le même milieu tous les mois.

4.2.1.2. Obtention des suspensions cellulaires

Environ 1 gramme (en poids humide) de callus a été placé dans un flacon Erlenmeyer de 125 ml contenant 10 ml de milieu B5 (Gamborg et coll. 1968). Le flacon a ensuite été placé sous agitation à 120 tpm, dans l'obscurité à 26°C (agitateur rotatif New Brunswick Scientifique Inc., série 25). Au bout de 2 semaines, 10 ml de milieu frais ont été rajoutés et la semaine suivante, la suspension cellulaire a été filtrée successivement sur deux filtres de 500 µm et 50 µm et rinçée avec une solution de 20 $g.l^{-1}$ de sucrose.

Les cellules retenues sur le filtre de 50 µm ont été remises en suspension à raison de 10 g (poids humide) par 100 ml de milieu d'induction dans des flacons erlenmeyer de 250 ou 500 ml (ratio [volume total du flacon / volume de milieu] de 2,5) placés sous agitation à 120 tpm, dans l'obscurité à 26°C. Après 2 semaines, les cellules ont été repiquées dans

des flacons Erlenmeyer de 500 ml à raison de 80 g de suspension par 160 g de milieu (milieu approprié pour chaque suspension cellulaire, voir § 4.1.1.). Les repiquages suivants ont eu lieu selon le même protocole à des intervalles d'environ 10 jours.

4.2.2. SUB-CULTURES DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Les 3 suspensions cellulaires ont été cultivées à (26 ± 2) °C sous un éclairage classique de laboratoire dans des flacons Erlenmeyer de 500 ml bouchés par 2 épaisseurs de papier aluminium. Les flacons étaient inoculés à raison de 80 g de suspension par 160 g de milieu approprié pour chaque suspension cellulaire. Au bout de 10 jours les suspensions étaient testées quotidiennement afin de déterminer le volume de cellules sédimentées. Les flacons étaient sortis de l'agitateur et laissés immobiles 5 minutes. La suspension était repiquée quant le volume de cellules sédimentées atteignait 80 % du volume total. (soit tous les 10 à 15 jours).

4.3. COURBES DE CROISSANCE

Pour chacune des 3 suspensions cellulaires, des courbes de croissance ont été obtenues (analyses cinétiques de la croissance, concentrations intra- et extra-cellulaires en nutriments et capacité à produire des alcaloïdes pendant la durée d'une sub-culture). Pour ce faire de 42 à 57 flacons ont été inoculés (à raison 80 g de suspension par 160 g de milieu approprié) au jour 0. Lors de chaque échantillonnage 3 flacons étaient retirés des agitateurs au hasard et utilisés complètement pour mener à bien les analyses (prélèvement destructif).

4.4. TEST D'ÉLICITABILITÉ

Le but du test d'élicitabilité était d'évaluer la capacité de production des cellules de l'échantillon. Pour ce faire, il fallait éliminer le milieu de culture présent dans l'échantillon afin que la composition de ce milieu n'influence pas le niveau de production des cellules.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, les cellules ont donc été transférées dans du milieu neuf et élicitées (induction des gènes de production des MS). Une résine extractive a aussi été utilisée pour maximiser la production comme décrit par Archambault et coll., (1996).

La solution d'élicitation a été obtenue comme suit: de la chitine brute (Sigma-Aldrich, # de catalogue C4666) a été réduite en poudre et tamisée sur un filtre en polypropylène de104 µm filter (Spectra mesh, Cole-Parmer, # de catalogue U-06630-52). Les particules de taille inférieure à 104 µm ont été mises en suspension dans de l'eau de-ionisée (20g l^{-1}) puis autoclavées à 121°C pendant 1 heure. La suspension de chitine a ensuite été filtrée stérilement sous vide sur 2 couches de tissus Miracloth (Corporation Calbiochem, La Jolla, CA, USA, # de catalogue 475855). Le filtrat a été utilisé pour éliciter les cellules.

La suspension cellulaire à tester a été filtrée stérilement sur un filtre en polypropylène de104 µm polypropylène (Spectra mesh, Cole-Parmer, # de catalogue U-06630-52). Les cellules (3.0 ± 0.2 g) ont ensuite été transférées dans 3 flacons Erlenmeyer de 75 ml contenant 10 ml de milieu de production (composition indiquée dans le tableau 1), 2 ml de solution d'élicitation (chitine) et (2.0 ± 0.1) g de résine XAD-7 humide (résine Amberlite, Sigma-Aldrich, # de catalogue XAD7). Les flacons ont été fermés avec une double couche de papier aluminium et placés sous agitation à 120 tpm pendant 7 jours.

4.5. ANALYTIQUE

Pour chaque échantillon on a mesuré la biomasse sèche et humide, la concentration cellulaire, la concentration en ions et glucose du milieu de culture, la concentration en ions, sucres solubles, amidon, carbone total, phosphore total et azote Kjeldhal des cellules. Un test respirométrique (voir chapitre 5) et un test d'élicitabilité en quadruplicat (voir 4.4.) ont aussi été effectués sur chaque échantillon. Une évaluation de la

concentration vacuolaire en phosphate inorganique (Pi) par RMN in vivo a également été menée sur certains échantillons.

4.5.1. MESURE DU LA BIOMASSE SECHE ET HUMIDE.

La suspension cellulaire (10 ml) a été filtrée sous vide sur un filtre de fibre de verre (47 mm diamètre Filtre de verre Microfibre GF/D, catalogue Whatman #1823 047). Les cellules ont été rincées immédiatement avec 3 fois 20 ml d'eau dé-ionisée puis prélevées du filtre avec précaution à l'aide d'une spatule et pesées immédiatement dans une nacelle en aluminium (Fisher Scientifique, #08-732). L'échantillon a été séché à 80°C jusqu'à poids constant puis refroidi dans un dessicateur pour obtenir le poids de la biomasse sèche.

4.5.2. CONCENTRATION CELLULAIRE

La concentration cellulaire a été déterminée soit par comptage microscopique soit grâce à une méthode en multi-plaque (voir chapitre 6)

4.5.2.1. Comptage microscopique

La suspension cellulaire (500µl) à été transférée dans un tube de micro-centrifugation de 1.5 ml contenant 1 ml de solution enzymatique fraîchement préparée (10 unités de cellulase (Sigma-Aldrich #C1184), 0.03 unités·ml^{-1} d'hemi-cellulase (Sigma- Aldrich #H2125) et 0.2 unités·ml^{-1} de pectinase (Sigma-Aldrich #P5146) dans un tampon citrate (200 mM, pH 4.5) fortifié avec 60 g·l^{-1} de sucrose.

Les tubes de micro-centrifugation ont été placés horizontalement sur un agitateur orbital à 120 tpm. Toutes les 30 minutes, l'échantillon était délicatement aspiré 3 fois avec une micropipette de 1000 µl. Si la suspension pouvait être aspirée facilement à travers un embout normal, la macération était arrêtée. Dans le cas contraire, l'échantillon était aspiré

3 fois à l'aide d'un embout coupé à 3 mm de l'extrémité et la macération était prolongée de 30 minutes additionnelles.

Une solution mère modifiée de carbol fuchsine a été préparée tel que décrit par Kao (1982). La solution de coloration a été préparée juste avant l'énumération en diluant 1 ml de solution mère de carbol fuchsine dans 100 ml de de sucrose (60 $g \cdot l^{-1}$). Un échantillon (10 µl) de cellules macérées a été ajouté à 200 µl de cette solution de coloration puis mélangé à plusieurs reprises à l'aide d'une pipette. L'échantillon (50 µl) a ensuite été transféré dans la chambre de comptage d'un hemacytomètre (Hausser Scientifique catalogue #3720, Horsham, PA, USA). Les cellules colorées ont été énumérées sous illumination normale en quadruplicata.

4.5.2.2. Comptage en multi-plaque

La suspension cellulaire (500µl) a été transférée dans un tube de micro-centrifugation de 1.5 ml et le milieu a été retiré soit par centrifugation (16000 × g, 15 minutes) ou par aspiration avec une pipette pasteur. Les cellules ont été re-suspendues dans une solution de fixation (méthanol: acide acétique 3:1 v/v tel que décrit par Cowell et Franks 1980, et Nicholoso et coll., 1994) jusqu'à un volume final de 1 ml. La période de fixation minimale était de 30 min. Une période de fixation prolongée (jusqu'à 6 mois) n'a eu aucun impact significatif sur la procédure de coloration.

Les cellules fixées (50 µl) ont été neutralisées avec 2 µl de 50 % NaOH et transférées dans 200 µl de solution de coloration (75 $\mu g \cdot ml^{-1}$ de colorant Hoechst dans un tampon de 1 M Tris pH 7.5 + 1 M NaCl). L'échantillon a été mélangé à plusieurs reprises à l'aide d'une pipette puis immédiatement transféré dans une plaque multi-puits opaque (plaque 96-puits en polystyrène noir à fond plat, Corning Costar, Cambridge, MA, USA, #3915). L'échantillon a été transféré dans quatre puits différents à raison de 50 µl par puits. La quantification par fluorescence a été complétée moins de douze minutes après le debut de la procédure de coloration à l'aide d'un lecteur de micro-plaques (Tecan GENios, Tecan

USA, Research Triangle Park, NC, USA). Les plaques étaient agitées pendant 10 secondes avec un mouvement linéaire immédiatement avant la lecture. La lecture était basée sur une mesure de la fluorescence des échantillons (lecture par le haut - longueur d'onde d'excitation / émission a 360 / 465 nm).

Pour chaque plaque, une courbe d'étalonnage a été traitée en même temps que les échantillons. Les mêmes solutions cellulaires standards ont été utilisées pour générer toutes les courbes d'étalonnage. Pour générer ces solutions cellulaires standards, une suspension de cellules de EC vieilles de 5 jours a été filtrée sous vide sur un filtre de fibre de verre (47 mm diamètre Glass Filtres Microfibre GF/D, Whatman Inc., 9 Bridewell Place, Clifton, New Jersey USA, # 1823 047). Les cellules (2 g) étaient immédiatement re-suspendues dans 5 ml de milieu B5 frais pour obtenir une suspension de cellules à haute densité. Le titre de cette suspension de cellules a été déterminé par comptage microscopique (voir plus haut). La suspension titrée a ensuite été diluée précisément avec du milieu B5 frais pour générer une suspension standardisée contenant 10.0×10^6 cellules·ml^{-1}. La concentration cellulaire de cette suspension standard a été re-vérifiée par comptage microscopique. Des dilutions en série dans du milieu B5 ont ensuite permis de générer les 4 autres solutions standards (2.0, 4.0, 6.0 et 8.0×10^6·ml^{-1} cellules, respectivement). Les 5 solutions cellulaires standards ont été fixées tel que mentionné pour les échantillons et ont ensuite été conservées à température ambiante jusqu'à utilisation. La fluorescence de ces solutions cellulaires standards était determinée en parallèle des échantillons pour chaque plaque multi-puits.

4.5.3. LYOPHILISATION DES CELLULES

La suspension cellulaire (10 ml) a été filtrée sous vide sur un filtre de fibre de verre (47 mm de diamètre, Filtre de verre Microfibre GF/D, catalogue Whatman #1823 047). Les cellules ont été rincées immédiatement avec 3 fois 20 ml d'eau dé-ionisée puis immédiatement congelées en les plaçant dans un mortier en céramique froid contenant

50 ml l'azote liquide. Les cellules congelées ont été réduites en poudre fine et stockées à -80°C. Les échantillons congelés ont ensuite été lyophilisés pendant 8 heures et placées dans un dessiccateur à une température de 6°C jusqu'à utilisation.

4.5.4. ANALYSES EXTRACELLULAIRES

4.5.4.1. Ions extra-cellulaires

Immédiatement après l'échantillonnage, la suspension cellulaire a été filtrée sur un filtre de nitrocellulose (0.2 µm). Le milieu de culture récupéré a été congelé à -18°C avant de procéder aux analyses. Les anions majeurs (NO_3^-, PO_4^{3-}, Cl^-, SO_4^{2-}) et les cations (Ca^{2+}, K^+, Na^+, Mg^{2+}) présents dans le milieu de culture ont été analysés sur un système d'HPLC (Dionex Canada Ltd, Oakville, Canada) muni d'un détecteur électrochimique à pulsation (Dionex, CD20) en mode conductivité. Les anions ont été séparés sur une colonne IONPAC AS-14 (4 mm x 250 mm, Dionex, # 046124) en utilisant un suppresseur d'anions immédiatement après la colonne (ASRS-ultra, Dionex, # 061561). La phase mobile était composée d'un tampon de bicarbonate (2 mM Na_2CO_3 et 1 mM $NaHCO_3$) au débit de 1.0 $mL.min^{-1}$. Les cations ont été séparés sur une colonne IONPAC CS-12A de 4 mm x 250 mm (Dionex, # 046073) en utilisant un suppresseur de cations (CSRS-ultra; Dionex, # 053948). La phase mobile était composée d'une solution d'acide n-methyl sulfonique (20 mM) au débit de 0.9 $mL.min^{-1}$.

4.5.4.2. Glucose extra-cellulaire

Le milieu de culture (10 µL) a été transféré directement dans une cuvette spectrométrique avec 500 µL de réactif de "Glucose Infinity" (Sigma, # 17-25). Après 15 minutes d'incubation à la température ambiante, 500 µL de tampon KH_2PO_4 (100 mM, pH 7.5) a été ajouté et l'absorbance a été mesurée à 340 nm.

4.5.5. ANALYSES INTRACELLULAIRES

4.5.5.1. Ions intra-cellulaires

Des cellules lyophilisées (env. 20 mg) ont été transférée dans un micro-mortier refroidi (type Potter-Elvehjem, volume de 2 ml, 100 µm d'espace entre le pilon et le mortier, verre sablé, Bellco glass Inc., # de catalogue 1983-10019) avec 1 ml de 5 % acide trichloroacetique (TCA) refroidi. L'homogénat a été centrifugé 5 minutes à 16 000 × g et le culot extrait 2 nouvelles fois avec 1 ml de 5 % TCA. Tous les surnageants ont été combinés pour la détermination de la concentration en ions intracellulaires. Les ions intracellulaires (anions et cations) ont été analysés par chromatographie ionique tel que décrit dans la section "analyses du milieu". Par contre, durant les analyses des anions, une injection de lavage était requise toutes les trois analyses pour évacuer l'excès de TCA accumulé sur la colonne analytique.

4.5.5.2. Sucres solubles intra-cellulaires

Les cellules lyophilisées (env. 20 mg) ont été transférées dans un micro-mortier refroidit (type Potter-Elvehjem, volume de 2 ml, 100 µm d'espace entre le pilon et le mortier, verre sablé, Bellco glass Inc., Cat. # 1983-10019) avec 1 ml d'éthanol 80 %. Les cellules ont ensuite été homogénéisées en faisant 20 rotations et 1 mouvement de bas en haut à chaque tour. L'homogénat a été centrifugé 5 minutes à 16 000 × g et le culot extrait 2 nouvelles fois avec 1 ml d'éthanol 80 %. Les phases éthanolées ont été combinées pour la détermination de la concentration en sucres solubles alors que le culot a été utilisé pour quantifier l'amidon intracellulaire.

Les extraits éthanoliques (1 ml) ont été filtrés à travers une membrane de nylon de 0.2 µm (Millipore, Billerica, Massachusets) et évaporés à sec à 40°C sous un flux d'azote. L'échantillon a ensuite été re-suspendu dans 200 µl de ACN:MeOH (4:1) et analysé par HPLC (Beckman Coulter Canada Inc, Mississauga, Canada. Modèle de pompe 126,

injecteur automatique modèle 508) muni d'un détecteur d'indice de réfraction. Les sucres solubles ont été séparés sur une colonne Prevail carbohydrates ES de 4 × 250 mm (Alltech associates, Deerfield, USA, # de catalogue 35101) chauffée à 40°C en utilisant ACN:MeOH (4:1) comme phase mobile au débit de 1 ml min^{-1}.

4.5.5.3. Concentration en amidon

Le culot cellulaire obtenu lors de l'extraction des sucres solubles a été re-suspendu dans 1 ml d'eau dé-ionisée et stérilisé à 121°C pendant 15 minutes. Les échantillons ont ensuite été refroidis et leur volume ré-ajusté à 1 ml avec de l'eau dé-ionisée si nécessaire. Une courbe d'étalonnage d'amidon de 0 to 6 $g \cdot l^{-1}$ a été préparée par dilution en séries d'une solution mère d'amidon gélatinisé (solution à 6 $g \cdot l^{-1}$ dans de l'eau dé-ionisée et autoclavée comme les échantillons). Les standards et les échantillons ont été dilués 1:1 avec une solution d'amyloglucosidase (Sigma St_Louis Missouri, # de catalogue S9144) et incubés 15 min. dans un bain à ultrason à 60°C. Les échantillons et les standards ont ensuite été centifugés pendant 10 minutes à 16000 × g. Le surnageant (10 µL) a été transféré dans une cuvette spectrométrique avec 500 µL de réactif de "Glucose Infinity" (Sigma, # 17-25). Après 15 minutes d'incubation à la température ambiante, 500 µL de tampon KH_2PO_4 (100 mM, pH 7.5) a été ajouté et l'absorbance a été mesurée à 340 nm.

4.5.5.4. Concentration en carbone total, phosphore total et azote Kjeldahl

Les concentrations en P total, C total et azote Kjeldhal des échantillons lyophilisés ont été déterminées en triplicata. Le phosphore total a été déterminé par la méthode Lachat (PON « for Total and Dissolved Phosphorous, Revision 1 », Grace Analytical Lab, 536 South Clark Street, Floor Chicago, IL 60605). Le carbone total a été determiné par combustion complète à 1000°C dans un analyseur élémentaire (Carlo Erba, EA1108). Les gaz générés ont été complètement oxydés en CO_2 et ce dernier a été quantifié avec un

détecteur de conductivité thermale (Methode 972.43. « Official Methods of Analysis of AOAC International, 16ème Edition (1997)", AOAC International, Arlington, VA). Le contenu en azote réduit des cellules (azote Kjeldhal) a été déterminé par une procédure de micro Kjeldahl en utilisant une digestion à l'acide sulfurique telle que décrite par Isaac et Johnson, 1976.

4.5.5.5. Quantification des alcaloïdes totaux

Plus de trente alcaloïdes différents ont été identifiés dans les extraits cellulaires d'*Eschscholtzia californica*. Cependant seulement une poignée de ces molécules sont disponibles commercialement. De ce fait la quantification individuelle des différentes molécules produites est difficile et de plus assez peu cruciale lors de notre étude. Nous avons donc choisi de quantifier la concentration en alcaloïdes totaux de nos extraits pour simplifier la méthode analytique. A la fin du test d'élicitabilité, le milieu de culture a été éliminé des échantillons. Les cellules et la résine ont été extraites 3 fois avec 20 ml de MeOH acidifié (0.5% HCl). Les alcaloïdes totaux ont été quantifiés par fluorescence (330/420 nm - détecteur Jasco, FP-1520).

Afin de quantifier les alcaloïdes totaux présent dans les extraits, une solution de calibration a été préparée en regroupant plusieurs extraits cellulaires (extraits méthanoliques obtenus comme décrit plus haut). Cet extrait a été concentré 10 fois et additionné de sulfate de sodium docecyl (2.0 %) puis extrait 3 fois avec du $CHCl_3$ (50 ml × 3) et évaporé à sec à 40°C sous vide (méthode modifiée de Fabre et coll., 2000). Les alcaloïdes semi-purifiés ont été re-suspendus dans 10 ml d'acide n-heptyl sulfonique (50 mM) et extraits sur une cartouche C_{18} (EPS) tel que décrit par Chauret et coll., 1990. Les alcaloïdes ont été récupérés avec du MeOH, séchés sur du Na_2SO_4 anhydre et évaporés à sec sous vide à 40°C. Le résidu sec (alcaloïdes totaux purifiés) a été pesé avec précision pour obtenir le titre en alcaloïde de la solution d'origine. La solution titrée à ensuite été

dilluée en série pour générer la droite d'étalonnage et quantifier la concentration en alcaloides totaux des échantillons.

4.6. RMN IN VIVO

4.6.1. SYSTÈME DE PERFUSION DES CELLULES

Un système de perfusion inspiré de celui de Roby et coll., (1987) a été mis au point pour alimenter les cellules en oxygène à l'intérieur du tube de RMN (Figure 1). Le montage a été construit de façon à ce que la mise en place des cellules se fasse très rapidement afin de limiter tout stress anaérobique. Pour ce faire nous avons conçu un insert qui peut être rempli de suspension cellulaire hors du tube de RMN (Figure 2). Cet insert est constitué d'une portion de doublure pour tube de RMN en plastique (doublure en PTFE / FEP, 9.0 mm de diamètre extérieur, Wilmad labGlass, Buena, USA, cat. # 6010) de 5 cm de long. Un tube d'HPLC en PEEK (1/8" OD, 0.062" ID, Alltech associates, Deerfield, USA, cat. # 35809) alimente la solution de perfusion par le haut de l'insert. La solution de perfusion pousse doucement sur le lit cellulaire qui est retenu en bas de l'insert par un filtre en tissus géotextile poreux de 1 cm (bande de tissus géotextile de 1 cm de haut enroulée en spirale – Géotextile hydrophile en polypropylène non tissé). L'insert est ensuite introduit dans le tube de RMN de 10 mm (tube à paroi fine). Une fois que le système de perfusion est mis en route, la solution de perfusion passe à travers le lit cellulaire puis le filtre et remonte contre les parois du tube jusqu'en haut où il est ensuite aspiré par un autre tube en PEEK puis re-circulé dans le flacon d'aération.

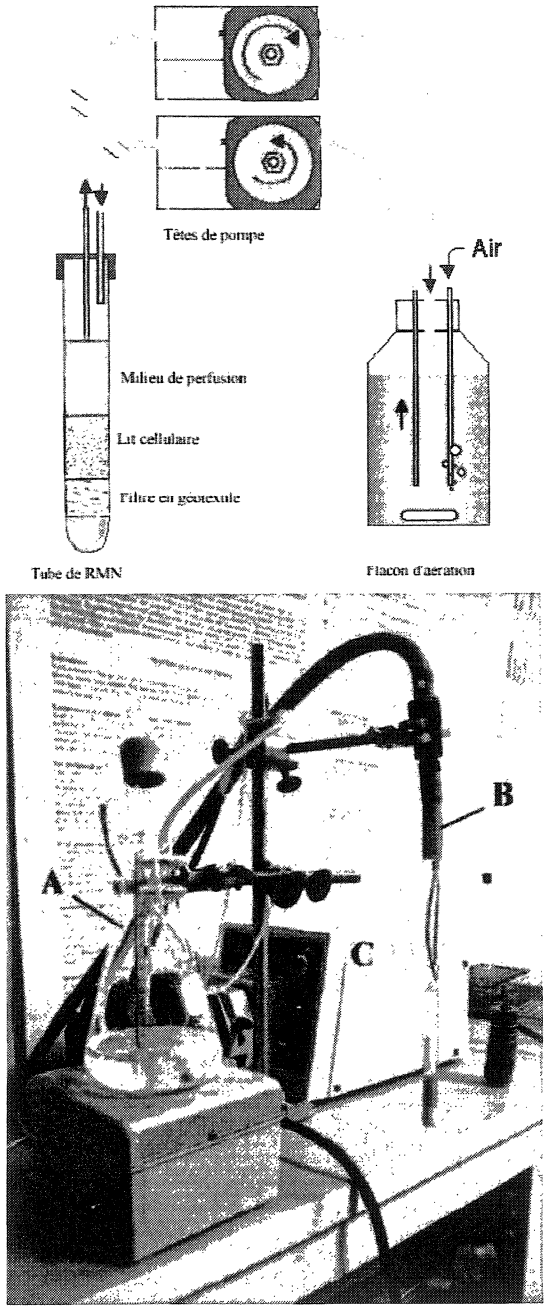


Figure 4.1 : Système de perfusion utilisé in RMN in Vivo.A) Flacon de recirculation du milieu de perfusion. B) Tube de RMN muni de son insert. C) Pompe péristaltique.

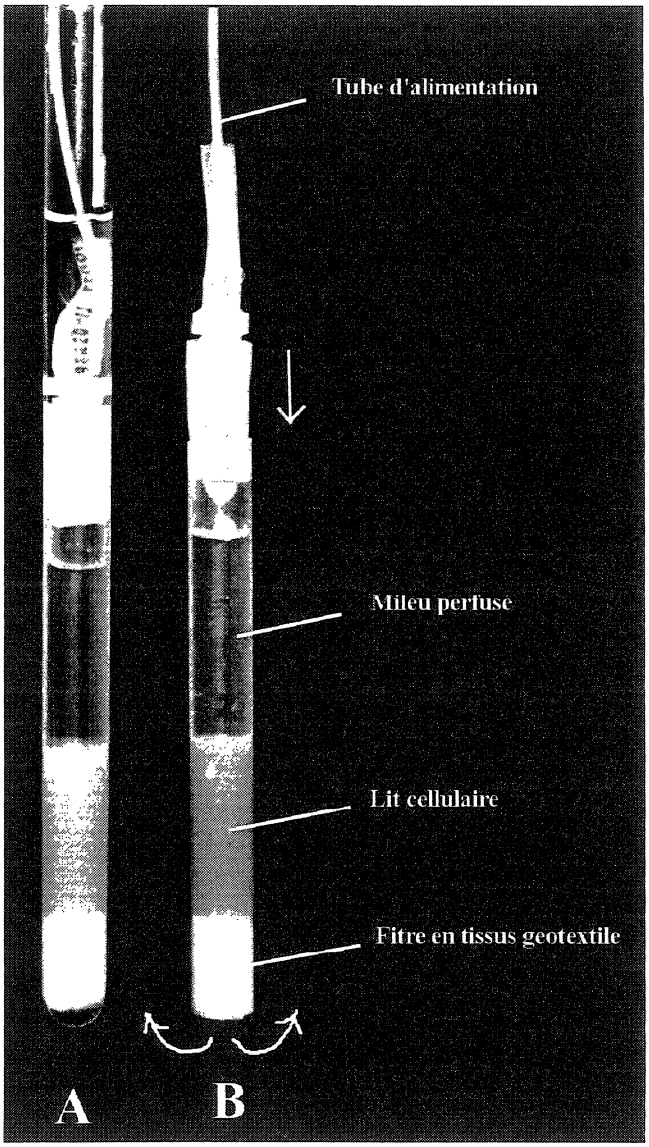


Figure 4.2 : Système de perfusion des cellules dans un tube de RMN de 10 mm. A) Insert dans le tube de RMN. B) Insert hors du tube. Les flèches indiquent le sens de circulation du milieu de perfusion.

Une pompe péristaltique haute précision multi-têtes circule le milieu de perfusion dans le système au débit d'entrée (dans l'insert) de 3 $ml \cdot min^{-1}$ (débit de sortie de 3.5 ml/min pour éviter toute fuite dans le spectromètre). Ce débit d'alimentation permet d'alimenter le lit cellulaire des cellules en oxygène de façon à maintenir une concentration

en O_2 dissout supérieure à la DO critique (C_{crit} = 0.105 mM O_2) dans le lit cellulaire, tout en diminuant les effets hydrodynamiques de paroi dans le tube. Le milieu de perfusion est constitué de Mannitol 30 g l^{-1} contenant 30 mM de KCl et 10 % D_2O et constamment saturé en air par bullage et agitation dans le flacon d'aération (flacon Erlenmeyer de 500 ml – voir Fig. 3 pour une vue d'ensemble du système de perfusion).

4.6.2. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

La suspension cellulaire à tester (25 ml) a été filtrée sous vide sur un filtre en fibre de verre (47 mm diamètre, Glass Microfiber filters GF/D, Whatman # de catalogue 1823 047) puis rincée 3 fois très rapidement avec 50 ml de solution de perfusion (Mannitol 30 g l^{-1} contenant 30 mM de KCl et 10 % D_2O) saturée en air. Les cellules ont ensuite été suspendues dans la solution de perfusion à raison de 3.0 g dans 10 ml. Cette suspension a été placée dans l'insert (3 ml) et le filtre en géotextile a été mis en place. L'insert a ensuite été installé dans le tube de RMN et la pompe a été mise en route pour débuter la perfusion. Les cellules étaient perfusées au moins 30 minutes avant la prise de mesure.

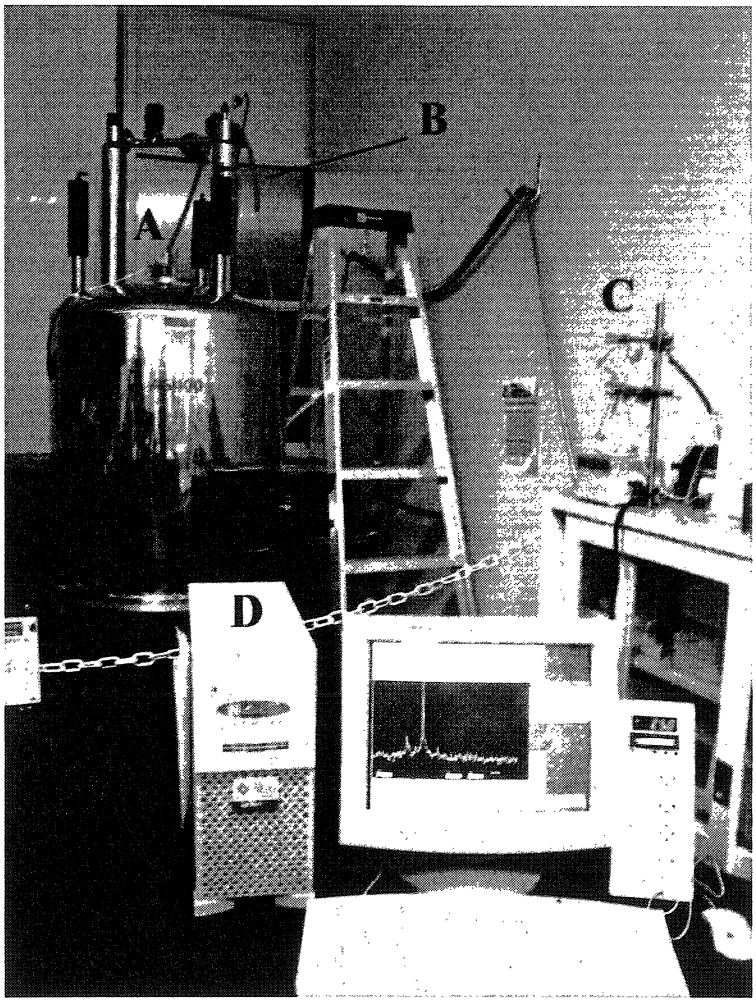


Figure 4.3 : Vue d'ensemble du système de perfusion et d'acquisition des spectres de RMN in vivo. A) système de perfusion inséré dans le spectromètre. B) Tubes d'alimentation. C) Pompe et flacon de recirculation du milieu. D) Système d' acquisition des spectres.

4.6.3. SPECTROMÈTRE ET PARAMÈTRES D'ACQUISITION

Les spectres de ^{31}P-NMR 1D ont été enregistrés avec un spectromètre RMN de 400 MHz (Varian Unity INOVA 400) équipé d'une sonde multi-nucléaire de 10 mm accordée à 161.9 MHz. Le ^{31}P est présent en faible concentration dans les tissus végétaux (0.2

ppm dans la matière sèche environ) et de plus a un signal RMN faible (intensité relative du signal de 0.063 contre 1 pour le ^{1}H). En raison de ce signal RMN faible, plusieurs spectres doivent être acquis et superposés pour réduire le bruit de fond et dégager les pics RMN. Cependant dans le cas de la RMN quantitative, il faut veiller à ce que l'effet de l'impulsion électro-magnétique sur les noyaux soit complètement dissipé (spins complètement relaxés) avant de procéder à l'impulsion suivante. Dans le cas contraire l'impulsion *n* influe sur le signal enregistré lors de l'impulsion *n+1* et la mesure n'est donc plus quantitative.

Afin de s'assurer que les spins étaient complètement relaxés entre 2 impulsions tout en conservant un signal acceptable, nous avons utilisé des impulsions de 70° et optimisé le délai entre 2 impulsions. Afin d'évaluer la concentration en Pi vacuolaire, les spectres ont été enregistrés en utilisant les impulsions de 20μs (70°) à un intervalle de 1s avec un temps d'acquisition de 0.6s et une fenêtre de balayage de 6 kHz. 1200 spectres ont été accumulés pour chaque mesure (temps d'acquisition total de 30 minutes). Le signal était digitalisé à 4,000 points et complété de zéros jusqu'à 8,000 points. Pour maximiser la résolution du signal, les spectres étaient retraités par une fonction exponentielle (lb=2-Hz). Les spectres étaient référencés par rapport à de l'acide phosphorique 85%. Ces conditions permettent de mesurer la concentration vacuolaire dans un laps de temps relativement court (30 minutes). Un exemple de spectre obtenu est presenté en Figure 4. Une meilleure résolution peut être obtenue en modifiant les paramètres mais nécessite un temps d'acquisition de plusieurs heures qui est incompatible avec la nature des mesures que nous voulions effectuer (échantillonnage toutes les heures immédiatement après l'inoculation des cellules en milieu neuf).

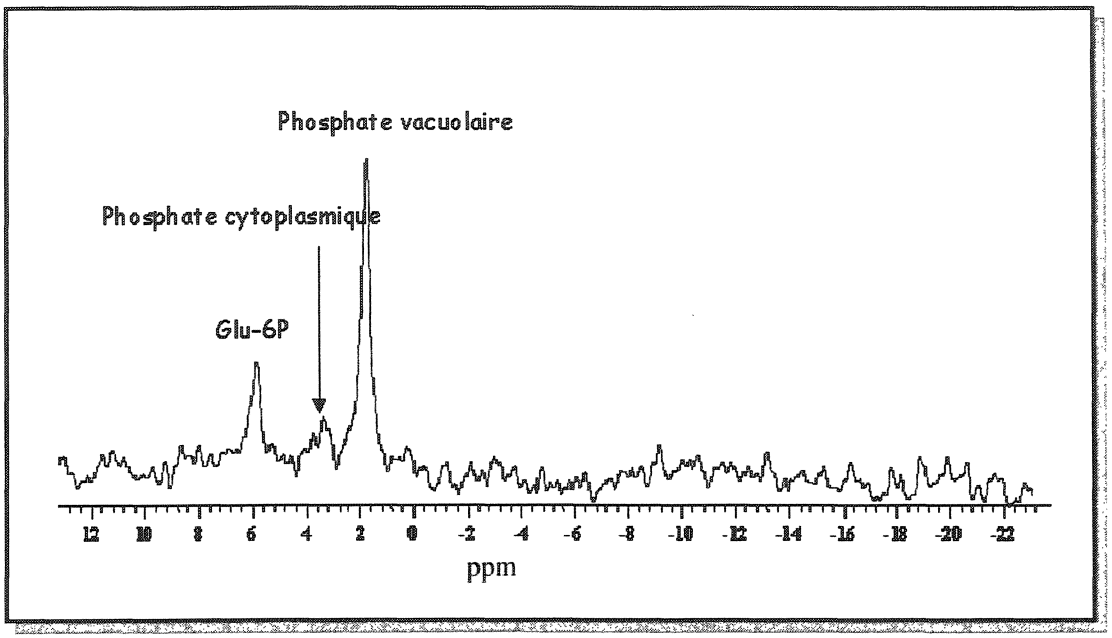


Figure 4.4 : Spectre de ^{31}P-RMN in Vivo

CHAPITRE 5. MISE AU POINT D'UN RESPIROMÈTRE SPÉCIALEMENT ADAPTÉ AUX CELLULES DE PLANTES ET AUX CELLULES ANIMALES.

5.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

La première partie de notre travail visait à caractériser l'état physiologique des cellules de plantes. A ce titre le taux de consommation en oxygène des cellules est un bon indicateur car il est directement lié à la demande métabolique en coenzyme oxydé (NAD+, FAD+, etc). Ainsi si le flux métabolique dans la glycolyse et le cycle du TCA augmente, le taux de respiration augmente également.

Il nous fallait donc trouver un moyen simple et rapide d'évaluer la consommation en oxygène de nos suspension cellulaire et ce de façon routinière. La meilleure façon d'y parvenir était l'utilisation d'un respiromètre. Cependant, les cellules de plantes ont des caractéristiques culturales très précises qui font que les respiromètres disponibles pour les cellules microbiennes sont inadaptés. D'une part, les cellules de plantes sont 10 à 20 fois plus grosses qu'une bactérie et beaucoup moins rigides. Cela les rend particulièrement sensibles au forces de cisaillement et elles sont donc facilement endommagées si on les soumet à des vitesses d'agitation et/ou des débits de bullage trop importants. De plus leur taux de respiration est très faible par rapport à celui des cellules bactériennes. De ce fait la moindre fuite de gaz dans le respiromètre fausse les mesures.

Pour toutes ces raisons nous avons donc développé et caractérisé notre propre respiromètre. Il nous a permis non seulement de mesurer le taux de respiration de nos cellules lors de nos expériences ultérieures mais aussi de déterminer la concentration critique en oxygène dissous des cellules d'*Eschscholtzia californica* (valeur en dessous de laquelle la concentration en O_2 devient limitante pour ces cellules). Cette donnée est un paramètre de culture important afin d'éviter de soumettre les cellules à un stress anaérobique, notamment dans le système de perfusion de RMN.

5.2. A LAB-BUILT RESPIROMETER FOR PLANT AND ANIMAL CELL CULTURE

A lab-built respirometer

for plant and animal cell culture.

Laurence Lamboursain[1], Frédéric St-Onge and Mario Jolicoeur[2]

Department of Chemical Engineering, Biopro Research Center, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Centre-ville Station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7.

Running Title: A lab-built respirometer for plant and animal cell culture.

[1] laurence.lamboursain@polymtl.ca

[2] to whom reprint requests should be addressed: Phone: 514-340-4711 (ext. 4525). Fax: 514-340-4159. E-mail: mario.jolicoeur@ polymtl.ca

5.2.1. ABSTRACT

A very simple off-line respirometer was developed to measure oxygen consumption rates of low respiring and shear-sensitive cell suspensions. The respirometer is composed of a 10 ml glass syringe in which the plunger was substituted with a polarographic dissolved oxygen probe. Mechanical agitation is provided by the mean of a magnetic stirring bar inside the measuring chamber and a stir plate placed below the respirometer. Abiotic oxygen fluxes occurring in the measurement chamber such as oxygen diffusion and probe oxygen consumption were investigated. The apparent oxygen uptake rate was then corrected for abiotic oxygen fluxes, leading to accurate measurements of respiration rates ranging from 0.5 to 25.0 $mM \cdot h^{-1}$. Additionally, the effect of the stirring bar shape and of the test length on the integrity of plant (*Eschschzoltzia californica*) and animal cells (NS0) was evaluated. Animal cells showed a higher resistance to mechanical stirring inside the respirometer compared to plant cells (0 % of broken cells and 78.1 % respectively for an octagonal stirring bar and a 15 minutes test). For plant cells, cell damage inside the measurement chamber was reduced by optimizing the stirring bar shape and reducing the test length to 5 minutes or less. This very simple design was shown to provide reliable and low cost quantification of the oxygen uptake rate of plant and animal cells and can be use even for more demanding measurements like oxygen affinity studies.

Key words

Respirometer, oxygen uptake rate, cell suspension, plant cells, animal cells, shear stress.

5.2.2. INTRODUCTION

Obtaining reliable information on the current state of cells in bioreactors is of crucial importance during bioprocess development and optimization. In aerobic processes, the

oxygen uptake rate (OUR) and the specific oxygen uptake rate (q_{O2} or SOUR, which is OUR divided by the biomass concentration) are considered to be important culture parameters. For example, OUR can be used to estimate the viable cell concentration in a bioreactor, providing that the q_{O2} of the cells remains constant (Bailey and Ollis, 1986, Shuler et Kargi, 1992, Doran, 1995, Ozturk et al., 1996). The q_{O2} is also directly linked to the metabolic activity of the cells. Respirometric measurements are therefore an insightful indicator of the metabolic and physiological state of cells and tissues (Bailey and Ollis, 1986, Shuler et Kargi, 1992, Doran, 1995, Steinlechner-Maran et al., 1996, Costa et al., 1997, Gnaiger et al., 1998).

OUR measurements during bioprocess have been of increasing interest during the past decade (Kyung et al., 1994, Eyer et al., 1995, Ozturk et al., 1996, Marsilli-Libelli and Vaggi, 1997). However, on-line respirometric equipment such as automatically operated respirometers have high initial and maintenance costs and little reliability as surface fouling occurs during the culture. Consequently, their use for control and optimization purposes in bioprocesses is still limited. As an alternative, various methods have been developed for on-line estimation of oxygen uptake rate in bioprocesses (refer to the introduction of the Jorjani and Ozturk paper (1999) for a short review on on-line OUR estimation methods through mathematical modelling based on oxygen mass balances). However, in spite of the major improvements that took place in this research area, software sensors still give only rough estimates of cells' respiration rate due to several inaccuracies in the mass balances. For example the variation of the mass transfer coefficient ($K_L a$) during the culture is a major source of errors in on-line OUR measurements (Marsilli-Libelli and Vaggi, 1997). Whenever more accurate OUR values are needed (for example to update the $K_L \cdot a$ value in the bioreactor during the culture as suggested by Olsson and Hansson, 1976), the use of an off-line respirometer still remains the most accurate technique.

Several commercial respirometers are available on the market to fulfill the increasing interest in respirometric measurements. They were initially designed to study small cells

and organelles like bacteria, yeast and mitochondria. For instance, they have been used for microbial culture optimization (Malucelli et al., 1995, Kim et al., 2001), wastewater treatment control (Baird et al., 1974, Yoong and Lant, 2001), soil characterization (Zimakowska-Gnoinska and Bech, 2000, Gong et al., 2000) and studies on mitochondria efficiency for diagnosis purposes (Panov and Scarpa, 1996, Hammond et Kubo, 2000, Gnaiger et al., 2000).

However, while being effective for the above-mentioned applications, conventional respirometers have major design limitations that make them poorly adapted to study plant and animal cells. This problem is mainly due to intrinsic characteristics of plant and animal cells that make them fundamentally different from the usual samples initially studied in respirometers. First, the respiration rate of animal and plant cells is very low in comparison to microorganisms (approximately 0.2 mmole $O_2 \cdot g^{-1}$ $DW \cdot h^{-1}$ for plant cells vs. 12 mmole $O_2 \cdot g^{-1}$ $DW \cdot h^{-1}$ for the bacteria E. coli, from Shuler and Kargi, 1992). Since the biomass concentration remains relatively low during plant and animal cell culture, the resulting OUR can be 10 to 100 times lower compared to that of a microorganism suspension. Those low respiration rates are problematic because significant errors in the measurement of low oxygen uptake rate have been reported in several conventional respirometers. An overestimation of up to 100 % of the actual OUR value was even reported (Haller et al., 1994). Consequently, respirometric data obtained from animal and plant cell suspensions in conventional respirometers are not always reliable.

The large size of plant and animal cells constitute another difficulty when using a conventional respirometer. In fact, plant and animal cells are 10 to 100 times larger than microorganisms and mitochondria. This large cell volume makes them particularly sensitive to shear stress (Cherry and Papoutsakis, 1986, Hua et al., 1993, Kieran et al., 2000). This is especially true for plant cells since they grow in aggregates that can reach several millimeters in diameter. Therefore, the high level of mechanical stirring occurring in conventional respirometers can cause the disruption of the cells.

When the integrity of the plasma membrane is lost, the micro-environment of the mitochondrion (i.e. oxygen and metabolites concentrations) is then dramatically modified leading in drastic changes in respiration kinetics. For example under normoxia, oxygen partial pressure in the order of 0.3 to 0.4 kPa (approx. 3.5 to 5.0 μM O_2) have been observed in the intracellular microenvironment of mitochondria in tissues (see Gnaiger et al, 1995 and 2000 and references therein). Those concentrations are 50 to 100 times lower than typical O_2 concentrations found in the culture medium at the beginning of respirometric experiments. Therefore, if the plasma membrane is damaged, mitochondria are clearly submitted to non-physiological levels of oxygen that have been proven to increase oxidative stress and to alter phosphorylation efficiency (Gnaiger et al., 2000 and references therein). Maintaining cell integrity during OUR measurements is then of critical importance in order to obtain relevant respirometric data at the cellular level (Steinlechner-Maran et al, 1997).

The present study presents a simple lab-built respirometer providing reliable determination of the oxygen uptake rate of plant and animal cell suspensions. *Eschschzoltzia californica* plant cells and NS0 animal cells were used as model systems. The respirometer is composed of a syringe body, a magnetic stirring bar and a pO_2 probe linked to a data acquisition system, which are all typical equipment found in a cell culture laboratory. The major experimental biases, such as the pO_2 probe oxygen consumption and the oxygen exchange rate with the surroundings, were evaluated. The apparent oxygen uptake rate was corrected for the background oxygen flux, thus reducing measurement errors. The accuracy of the measurements was assessed using a colorimetric enzymatic reaction that consumes oxygen. The respirometric measurements were then compared to OUR values obtained from spectrophotometric data. The effect of the stirrer geometry and the test length on the integrity of plant and animal cells inside the respirometer was also investigated. As a consequence, recommendations were made in order to minimize cell disruption during the respirometric test. Finally, an oxygen affinity

study was conducted, leading to the determination of the maximum OUR and K_{O2} (apparent affinity constant for oxygen) of a plant cell suspension. These experiments confirmed that the respirometer can be routinely used to follow the OUR evolution during in vitro plant cell culture as well as to perform more demanding respirometric studies.

5.2.3. MATERIAL AND METHODS

All experiments were performed at (25 +/- 1)°C under normal laboratory lighting, unless specified otherwise.

5.2.3.1. Plant cell line

Plant cell callus were obtained by placing hypocotyl explants from sterile *Eschschzoltzia californica* seedlings on solid B5 medium (Gamborg et al., 1968) containing 30 $g \cdot l^{-1}$ of glucose and supplemented with 0.2 $mg \cdot l^{-1}$ 2,4-Dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) and 0.1 $mg \cdot l^{-1}$ kinetin. Callus cultivation was performed in the dark at 25 °C. Cell suspension was obtained by adding 2 g fresh weight (FW) of callus to 10 ml liquid B5 medium supplemented with hormones (same composition as solid medium). Liquid medium was then regularly added until a final suspension volume of 250 ml was obtained.

The cell suspension was sub-cultured when the sedimented cell volume reached 70-80 % of the total volume in 5 minutes (i.e. every 10 to 13 days). The suspension was then transferred into a 500 ml Erlenmeyer flask containing fresh medium (80 g of cell suspension in 170 g of liquid B5 medium supplemented with 0.2 $mg \cdot l^{-1}$ 2,4-D and 0.1 $mg \cdot l^{-1}$ kinetin). All Erlenmeyer flasks had a two layer aluminum foil closure.

5.2.3.2. Animal cell line

NS0 cells (lymphoblast cells from mouse myeloma) were kindly provided by Dr. Bernard Massie from the Biotechnology Research Institute of Montreal (BRI). The cells were cultivated for six cell passages in 800 ml T-flasks (Nunclon™ tissue culture flask with vented cap, culture surface of 175 cm^2, Fisher scientific, Ref. 12-565-30) and incubated at 37°C in a humidified incubator under 95 % air and 5 % CO_2. Cell passages were performed when the cells reached confluence i.e. each 2 days for a 1/3 passage ratio. The cells were grown in DMEM medium (Dulbecco's modified Eagle's medium containing 584 mg/l L-Glutamine, 4.5 g/l Glucose and 110 mg/l Na-Pyruvate. Wisent inc., St Bruno, Qc, Canada. Ref. 10013 CV) supplemented with 2.5 % FCS (fetal calf serum, Gibco, Ref. 200-6140), 100 mg/l of G-418 sulfate (Sigma-Aldrich, Ref. 70069), 100 mg/l of Hygromycine B (Sigma-Aldrich, Ref. H9773), and 584 mg/l of L-Glutamine (Sigma-Aldrich, Ref. G1517).

5.2.3.3. Respirometer Design

The respirometer is described in figure 5-I. The respirometer chamber was made from a 10 ml borosilicate glass syringe (Sigma-Aldrich, ref. Z10,106-O, 13 mm ID and 15 mm OD) in which the plunger was substituted with a polarographic pO_2 probe (ref. YSI 5331, 9.5 mm diameter and 44.5 mm long. Yellow Spring Instruments, Yellow Spring, USA) equipped with a YSI standard membrane (Ref. YSI 5793, 1 mm thickness). A butyl rubber gasket (from a 10 ml disposable plastic syringe, Sigma-Aldrich, ref. Z24,802-9) was fitted onto the probe to insure a leak-proof joint with the syringe body. A 3 mm diameter hole was pierced in the gasket, allowing contact between the probe membrane and the sample. A stainless steel valve (stopcock two ways luer-lock valve, product 31507-00. Labcor, Montreal, Canada) was screwed to the syringe tip to allow the elimination of gas bubbles from the sample.

Homogenous mixing in the respirometer chamber was obtained by means of a Teflon-coated magnetic bar (described in the results section). The respirometer chamber volume

was adjustable between 2 and 10 ml as needed. This volume was set by loading an accurate amount of sample with a high precision pipette (loading of the sample is described in details in the following section). Substrates and various test substances could be added inside the respirometer chamber by aspiration though the valve (when a precise volume is not needed) or by injecting them trough the opened valve with a precision syringe (Sigma ref. Z10,895-2).

The pO_2 probe was connected to an amplifier and the data was recorded through LabView data acquisition software (National Instruments, Austin, Texas). Whenever possible, the materials composing the respirometer were selected for their minimal oxygen permeability according to the recommendations of Haller et al. (1994)

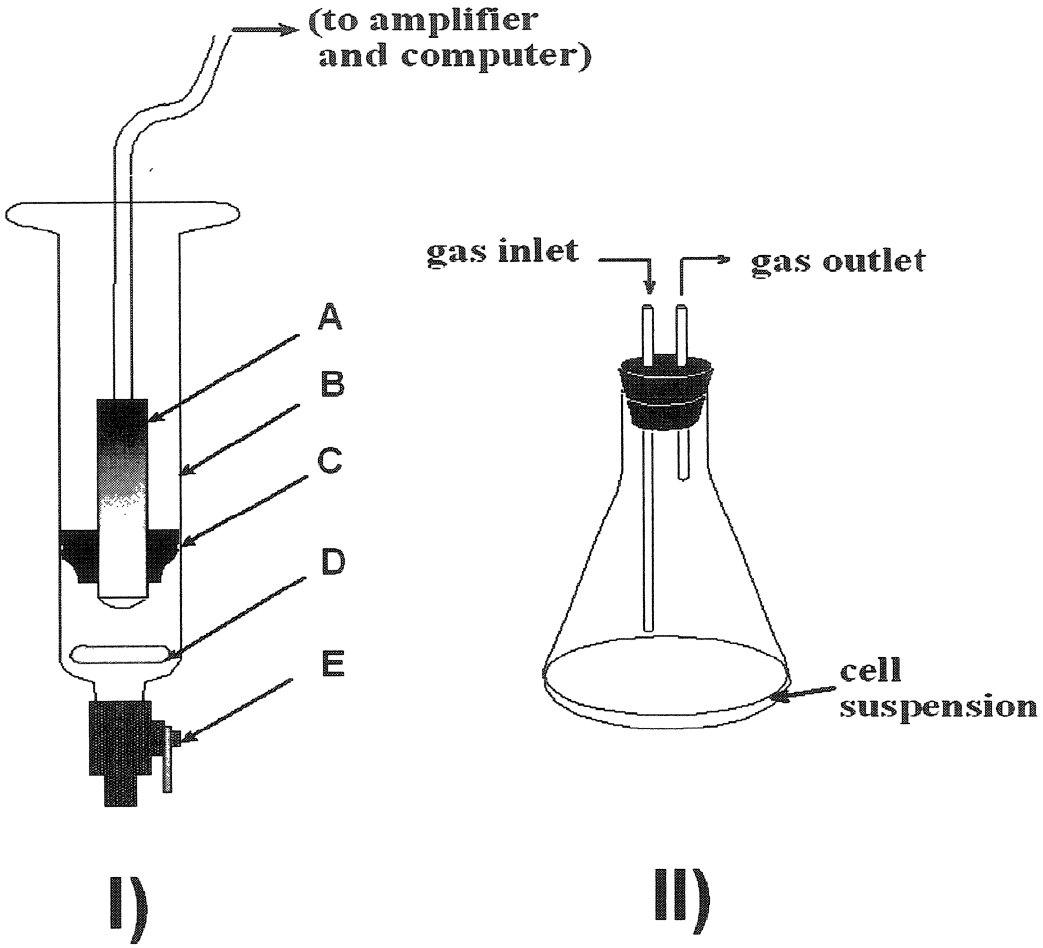


Figure 5.1 : Respirometer and oxygen enrichment chamber scheme (not to scale). I) Respirometer: A: polarographic pO_2 probe, B: 10 ml syringe, C: black butyl rubber gasket, D: magnetic stirring bar, E: Luer-lock valve. II) Oxygen enrichment chamber.

5.2.3.4. Sample loading

During sample loading, the pO_2 probe was pulled out of the respirometer chamber and the valve was closed. The cell suspension (3 ml) and the stirring bar were then placed into the syringe. The pO_2 probe equipped with the butyl rubber gasket (which was lubricated with vegetable oil) was inserted at the top of the syringe. The respirometer was then flipped 180 degrees and the valve opened while the pO_2 probe was slowly pushed

upward. Once all the gas bubbles had been removed from the measuring chamber, the valve was closed and the respirometer was fixed with a clamp above a magnetic stirrer to proceed with the respirometric measurement.

5.2.3.5. Oxygen enrichment chamber

The oxygen enrichment chamber consisted of a 50 ml Erlenmeyer flask with a two-hole rubber plug (fig. 5-II). A 2 ml plastic pipette was inserted in the first hole and lowered until the tip was approximately 3 cm from the bottom of the flask (the pipette tip should not contact the sample). The pipette end was connected to the inlet gas line with a gas flow rate maintained constant at 50 ml·min^{-1}. The inlet gas was composed of N_2, O_2 and air, mixed at different ratios. The oxygen partial pressure in the inlet gas could then be altered as needed from 0 to 100 % oxygen. The gas could freely exit the flask from the second hole in the plug to prevent pressure buildup. The sample (10 ml) was poured into the Erlenmeyer flask, the rubber plug was put in place and the enrichment chamber was then placed on a rotary shaker at 160 rpm.

5.2.3.6. Data acquisition and correction

Due to diffusional limitations within the probe membrane, pO_2 probes respond with a time delay to changes in the *DO* concentration of the sample. For this reason, the signal had to be time-corrected. The correction was made according to Gnaiger et al. (1995) using the following equation:

$$DO_{cor}(t) = DO_{raw}(t) + \tau_r \bullet d(DO_{raw})/dt \qquad (1)$$

Where $DO_{cor}(t)$ and $DO_{raw}(t)$ represent the corrected and the uncorrected *DO* concentrations at time t respectively and τ_r is the probe response time in s. The response

time (defined as the time required to reach 63 % of the maximal response) was calculated to be 7.3 ± 0.2 seconds (95% confidence interval, n=9) when a new membrane and new electrolyte were used. The data acquisition had a time resolution of 1 second and no mathematical smoothing was done to the experimental data.

5.2.3.7. Oxygen mass balance equations.

The variation over time of the *DO* concentration in a cell suspension in contact with a gas phase is described according to the following mass balance equation:

$$dDO/dt = K_L \bullet a(DO^* - DO) - OUR - F_{exch} - F_{probe} \qquad (2)$$

Where *DO* is the dissolved oxygen concentration in the liquid phase in mM, $K_L \bullet a$ is the mass transfer coefficient in h^{-1}, DO^* is the maximum oxygen concentration attainable when the liquid and the gas phase are in equilibrium (corresponding to the oxygen solubility, in mM), *OUR* is the cells' oxygen uptake rate (in $mM \cdot h^{-1}$), F_{exch} is the oxygen exchange rate between the sample and the surroundings (in $mM \cdot h^{-1}$) and F_{probe} is the oxygen uptake rate of the probe (in $mM \cdot h^{-1}$). These F_{exch} and F_{probe} terms were both considered as positive values in equation 2, however the actual sign of F_{exch} varies depending on the DO concentration gradient between the respirometer chamber and the surroundings.

Since there is no gas phase in the respirometer chamber, the mass transfer coefficient ($K_L \bullet a$) *is* null and the equation can be simplified:

$$dDO/dt = - OUR - F_{exch} - F_{probe} = - OUR_{ap} \qquad (3)$$

with OUR_{ap} being the apparent oxygen uptake rate. Once the experimental data was corrected for the probe response time (see equation 1), OUR_{ap} was calculated as the

negative time derivative of the dissolved oxygen concentration (*DO*) in the respirometer. This was accomplished through a linear fit where at least 10 data points were collected.

Given that the total background oxygen flux ($F_{background}$, which correspond to the sum of F_{exch} and F_{probe}) was determined, the cellular *OUR* can be calculated from OUR_{ap} since:

$$OUR = OURap - Fbackground \quad (4)$$

The oxygen specific uptake rate (qO_2) of the cells can then be directly obtained from OUR since:

$$qO_2 = OUR / X \quad (5)$$

qO_2 being expressed in mmole·g^{-1} DW·h^{-1} and X (representing the cell concentration in dry weight) in g DW·l^{-1}.

5.2.3.8. Respirometer calibration

In order to proceed to an accurate probe calibration, a precise estimation of the oxygen solubility in the liquid phase is crucial. Based on Truesdale et al. (1955) the oxygen concentration of pure water at equilibrium with pure oxygen is 1.293 mM (gas saturated with water vapor at 1 atm and 25°C). Since the mole fraction of oxygen in air is 0.2099, this results in an oxygen concentration in pure water at equilibrium with air of 0.272 mM according to Henry's law (at 1 atm and 25°C). The presence of solutes such as salts, acids and sugar has a significant effect on the oxygen solubility in water. According to the empirical correlation of Quicker et al. (1981) the oxygen solubility in B5 medium was evaluated at 1.047 mM when in equilibrium with pure oxygen and 0.220 mM in equilibrium with air (at 1 atm and 25°C).

The pO_2 probe was calibrated before each set of measurements. The sensor output was found to be linear over the entire range of DO concentrations. Therefore a two-point calibration (0% and 100% of pure oxygen saturation) was used. For routine

measurements (i.e. for OUR_{max} and q_{O2max} determination), the 0 and the 100 % oxygen calibration points were obtained by immersing the probe into N_2 and O_2 saturated B5 culture medium, respectively. For the evaluation of background oxygen fluxes, the probe calibration was made in de-ionized water instead of culture medium because the oxygen solubility in pure water is more accurately known.

A more precise calibration was needed for oxygen affinity studies since a slight inaccuracy in the zero calibration can lead to a significant error in the affinity constant determination. During oxygen affinity studies, the zero oxygen calibration point was then determined *in situ* at the end of the experiment. For this purpose, the cells were maintained in the measurement chamber until exhaustion of the oxygen, at which point the sensor output was considered as the zero oxygen calibration point. The drift of the zero oxygen signal was 0.02 % or less of air saturation over the time of the oxygen affinity study.

Calibration curves were shown to be stable to 1.8 % of reading or better for a week if the membrane was maintained in place. However, the calibration had to be redone if the membrane was accidentally dislodged from the probe during sample removal. The probe electrolyte and, if necessary, the membrane were replaced when the probe response time increased by more than 20 % of the initial value or when an abnormal background noise was noticed.

5.2.3.9. Determination of measurement accuracy

The respirometer accuracy was evaluated by means of an O_2 consuming enzyme, glucose oxidase. This enzyme is usually used for glucose determination (Technical Bulletin GOB-2, Sigma-Aldrich-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). The protocol uses two serial enzymatic reactions:

$$Glucose + H_2O + O_2 \xrightarrow{glucose\ \ oxidase} gluconic\ acid + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + reduced\ (O-Dianisidine) \xrightarrow{peroxidase} oxidized\ (O-Dianisidine)$$

The oxidized O-Dianisidine turns pink in the presence of sulfuric acid and can be spectrometricaly quantified at 540 nm. The overall reaction consumes one mole of oxygen per mole of oxidized O-Dianisidine formed. In order to evaluate the respirometer accuracy, the OUR value obtained from the spectrometric data was compared to the one obtained from the respirometric data for a given sample.

The enzyme stock solution was prepared by dissolving the enzymes (Sigma-Aldrich-Aldrich, product G3660) in 40 ml of de-ionized water resulting in final concentrations of 12.5 units·ml^{-1} for glucose oxidase and 2.5 units·ml^{-1} for peroxidase. This enzyme stock solution was then diluted with various volumes of citrate buffer (100 mM, pH 5.1) resulting in diluted enzyme solutions at the final ratio of 1/5, 1/10 and 1/100. O-Dianisidine (Sigma-Aldrich-Aldrich, product D2679) was dissolved into 1 ml of de-ionized water to yield a final concentration of 15.8 mM. The glucose stock solution (100 mM glucose in 100 mM citrate buffer pH 5.1) was saturated in oxygen by continuous oxygen bubbling.

Accuracy was determined by mixing 0.200 ml of enzyme solution with 0.020 ml of O-Dianisidine solution and 2.80 ml of glucose solution in the respirometer chamber. A cross-shape magnetic bar was inserted in the measurement chamber (Sigma-Aldrich-Aldrich, ref. Z18984-7) and the agitation speed was set to 600 rpm. The decrease in dissolved oxygen concentration over time in the respirometer was recorded for 3 minutes to obtain the initial reaction rate. The reaction was then rapidly stopped by the addition of 2.00 ml of 12 N H_2SO_4 directly in the respirometer chamber (after the pO_2 probe was removed). The oxidized O-Dianisidine was then spectrometrically quantified by reading the absorbance at 540 nm.

5.2.3.10. Cell integrity test

Cell integrity was evaluated by comparing the esterase activity of the culture medium before and after the respirometric test. An increase of the culture medium esterase activity during the test suggests that the cells were damaged inside the respirometer and that intracellular enzymes (including esterases) were released into the culture medium.

The esterase activity can be quantified using the hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) by non-specific esterase enzymes. This reaction produces free fluorescein, a yellow compound that can be followed spectrometrically at 490 nm. Esterase activity quantification in the culture medium was based on Steward et al. (1999) with the following modifications:

For plant cells, the cell suspension was centrifuged (5000 g, 5 minutes) and 200 µl of supernatant was collected and mixed with 900 µl of a fresh solution of FDA (0.0125 % w/v in phosphate buffer 100 mM, pH 8.5). The sample was incubated at 35°C for 15 minutes in an ultrasonic bath. Trichloroacetic acid (TCA) (300 µl of 20 % w/v fresh solution in water) was added to terminate the enzymatic reaction. The sample was then placed at 4°C for 15 minutes to allow complete protein precipitation. After centrifugation (5000 g, 5 minutes), 500 µl of supernatant was mixed with 500 µl of a $Na_2CO_3.H_2O$ solution (30 % w/v in water) for neutralization. After 5 minutes (time required for complete neutralization), the spectrometric absorbance at 490 nm was measured to quantify the fluorescein concentration. A control containing de-ionized water instead of supernatant was used to assess non-enzymatic hydrolysis of FDA.

The protocol has to be adapted for animal cells because of the very low intracellular esterase activity of the cell line we used. The NS0 cell suspension was centrifuged (5000 g, 5 minutes) after what 400 µl of supernatant was mixed with 400 µl of FDA (0.0125 % solution, see above). After incubating the sample at 35°C for 15 minutes, 300 µl of Trichloroacetic acid (TCA 20 %, see above) was added. The sample was then placed at 4°C for 15 minutes then centrifuged (5000 g, 5 minutes). 800 µl of supernatant was then mixed with 200 µl of a $Na_2CO_3.H_2O$ solution (30 % w/v in water) and the

spectrometric absorbance at 490 nm was measured after 5 minutes. A control containing DMEM instead of supernatant was used to assess non-enzymatic hydrolysis of FDA.

For each cell line, a calibration curve was used to relate the fluorescein concentration to the percentage of broken cells (data not shown). A sample of the initial cell suspension (which has not been subjected to the respirometric test) was centrifuged (5000 g, 5 minutes, 4°C) and the supernatant obtained was referred to as the "0 % broken cell" calibration level. In addition, another sample of the cell suspension was crushed manually into a chilled Potter-type homogenizer with a frosted glass pestle (100 µm of clearance, 1 ml capacity, Bellco glass inc., Ref. 1983-10019) with 30 turns and 30 up and down strokes. The cell extract obtained was centrifuged (5000 g, 5 minutes, 4°C) and the supernatant obtained constituted the "100 % broken cell" calibration solution. These two solutions (0 % and 100 %) were mixed at different levels in order to obtain the other calibration standards (20 %, 40 %, 60% and 80 % of broken cells, four replicates at each level). All samples and extracts were maintained at 4°C during the whole experiment to minimize protein degradation.

5.2.4. RESULTS AND DISCUSSION

5.2.4.1. Evaluation of background oxygen fluxes

Significant errors in the measurement of oxygen uptake rate have been reported at low respiration rate in several commercial respirometers (Haller et al., 1994). Those errors in the OUR measurement have been attributed to abiotic oxygen fluxes occurring in the respirometer chamber. Several abiotic oxygen fluxes (as opposed to the biotic oxygen flux due to cell respiration) take place within the respirometer chamber along with the cells' oxygen uptake flux. First, polarographic pO_2 probes consume oxygen due to the electrochemical reactions involved at their cathode. The dissolved oxygen (*DO*) concentration measurement is in fact based on the probe oxygen consumption rate, which

is a function of the dissolved oxygen concentration. At the same time as the pO_2 probe is consuming oxygen, oxygen is also diffusing in and out of the measurement chamber through the respirometer walls and joints (i.e. the valve and gaskets). Some of the materials composing the respirometer may also act like oxygen reservoirs thus creating additional oxygen fluxes within the measuring chamber. All of these abiotic fluxes can induce large errors in *OUR* measurements. This is especially the case when working with small volumes because the surface-to-volume ratio is high. Therefore, in the context of the low oxygen uptake rates observed for plant and animal cells at standard culture density ($\leq 10^7$ cells•ml^{-1}), reliable respirometric measurements require the conscientious evaluation of these abiotic oxygen fluxes.

Since the oxygen exchange between the sample and surroundings and the probe oxygen consumption occur simultaneously, evaluating their respective contribution is complex. However, those two phenomena can be decoupled in certain cases. For example, the probe oxygen consumption rate is negligible compared to diffusion phenomenon when the internal concentration in the respirometer is close to 0 %. The probe uptake rate is then very small although the diffusion rate is elevated because the environment imposes a significant oxygen gradient against the chamber. Oppositely, the oxygen diffusion is negligible compared to the probe consumption when the oxygen gradient against the chamber is small. This is the case, for example, when the *DO* concentration in the respirometer chamber reaches 21 %, in equilibrium with the oxygen concentration of the surrounding air.

Therefore, the flux due to the oxygen consumption of the probe can be decoupled from other abiotic fluxes provided that the DO gradient between the measurement chamber and the surroundings is kept minimal. To achieve this, the entire respirometer was submerged in water that was maintained at the same oxygen concentration as the sample. This was achieved by bubbling the appropriate mixture of N_2, oxygen and air in a thermo-stated water bath filled with de-ionized water at 25°C. The respirometer was opened and all the parts were incubated in the water bath before proceeding to the test. The DO

concentration of the water bath was monitored with the pO_2 electrode. When the proper DO concentration and temperature were reached, the respirometer parts were incubated for an additional 15 minutes so that all respirometer materials reached equilibrium with the surrounding water. The respirometer was then assembled under water and the sample (constituting of 3 ml of the equilibrated water from the water bath) was then quickly loaded into the measurement chamber by aspiration through the valve. Agitation was started and the DO decrease in the submerged respirometer was monitored until the internal DO reached 95 % of the initial value.

The oxygen consumption rate of the probe could then be evaluated at different DO concentrations. Figure 6 demonstrates a linear relationship between the probe consumption rate and the *DO* concentration. A consumption rate of 30.2 $\mu M\ O_2 \cdot h^{-1}$ was measured at 21 % *DO* (air saturation), which is similar to that measured by Steinlechner-Maran et al. (1996) with a high-resolution commercial respirometer (Oroboros® oxygraph, Cyclobios, Austria).

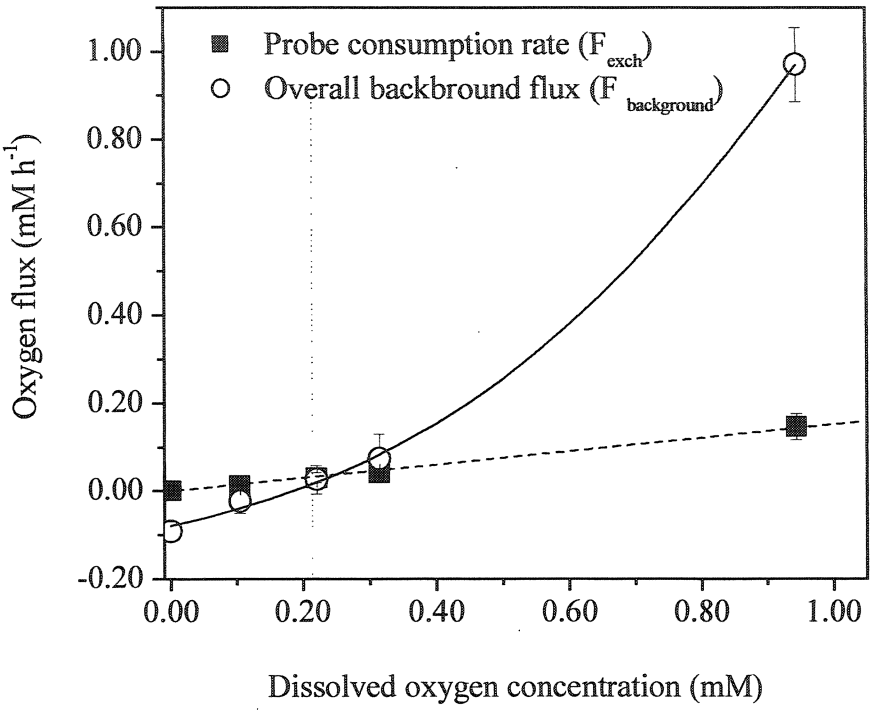


Figure 5.2 : Background oxygen fluxes as a function of DO concentration. Negative fluxes refer to an inward O2 diffusion in the respirometer, positive fluxes refer to O2 consumption and/or O2 diffusion out of the respirometer chamber. Error bars represent the 95% confidence interval for n=4. The vertical dotted line indicates air saturation concentration.

The total abiotic oxygen flux (also referred to as the background oxygen flux in some publications) was also evaluated. De-ionized water samples with different DO concentration were placed in the measurement chamber while the respirometer was surrounded with atmospheric air. The background oxygen flux followed an exponential relationship with *DO* (Figure 6). According to Fick's law, the oxygen flux from diffusion between the sample and the surrounding air is linearly related to the oxygen gradient

between the two. As mentioned earlier, the probe consumption flux is also linearly related to the *DO* concentration. Therefore, if the overall background flux represents only the sum of those two phenomena, it should also behave linearly as a function of the internal oxygen concentration (Haller et al., 1994, Steinlechner-Maran et al., 1996). In our system however, this is only the case for *DO* concentrations below 0.315 mM (30% of pure oxygen saturation) since a clearly non-linear relationship was observed for higher internal *DO*.

This non-linearity implies that the probe consumption and the exchange of oxygen between the measurement chamber and the surrounding air are not the only abiotic fluxes involved in the respirometer. An additional non-linear flux is also present, and may be due to the existence of oxygen reservoirs inside the measuring chamber. Haller et al. (1994) observed the presence of a similar trend when using a Teflon-coated stirring bar in the Oroboros® respirometer. They demonstrated that Teflon could absorb and release O_2 during the respirometric measurement, thus creating a non-linear oxygen flux within the respirometer chamber. The resulting oxygen flux reached up to 0.108 $mM \cdot h^{-1}$ when the oxygen concentration was lowered quickly in the respirometer. Although the confirmation of this hypothesis was not in the scope of our experiments, it is possible that the Teflon stirring bar as well as other polymeric material composing the respirometer could have been responsible for the non-linear behavior of the background oxygen flux observed at high *DO*. A glass-coated or Peek-coated bar would probably have been more suitable to obtain high precision respirometric data. Unfortunately, these bars are not commercially available in the shape and size used in our respirometer (see below).

Even though the materials composing the respirometer chamber were selected for their minimal oxygen permeability, a total background flux of -92.4 ± 8.9 $\mu M\ O_2 \cdot h^{-1}$ was measured at 0 % *DO*, which is 70 times higher than the value obtained with the high-resolution Oroboros® oxygraph under similar experimental conditions (-1.2 $\mu M\ O_2 \cdot h^{-1}$, Steinlechner-Maran et al., 1996). This deceptive result demonstrates that a significant amount of oxygen is diffusing into the sample at low internal DO concentration. This

could be due either to the diffusion of oxygen from the atmospheric air through weak points of the respirometer or to the release of oxygen that has been entrapped within the respirometer materials (including the Teflon stirring bar).

The significant background flux at low oxygen partial pressure is not exclusive to our respirometer. It is in fact a common characteristic of most respirometers, even commercial ones. Overestimated values of OUR (up to 100 % according Haller et al., 1994) have been attributed to this phenomenon. It is then of the outmost importance to correct the apparent OUR for the background oxygen flux ($F_{background}$). Figure 6 shows that $F_{background}$ varies in an almost a linear relationship with *DO* concentrations between 0 and 0.315 mM. In this DO range (which correspond to the typical working range in respirometric studies), the following equation was applied with a coefficient of correlation of 99.4 %:

$$F_{background} = F_{exch} + F_{probe} = 0.515 \times DO - 0.087 \qquad (6)$$

DO being the dissolved oxygen concentration in mM, and $F_{background}$, the overall background oxygen flux in $mM \cdot h^{-1}$. The oxygen uptake rate of the cells can then be calculated using equation 4.

The overall oxygen background flux was found to be 0.07 mM $O_2 \cdot h^{-1}$ at 0.315 mM of dissolved oxygen. If one considers the overall background flux to be negligible when it represents less than 5 % of the measured *OUR*, this implies that only *OUR* measurements smaller than 1.5 mM $O_2 \cdot h^{-1}$ will require a correction. Since the OUR range varies from approximately 0.5 to 3.5 mM $O_2 \cdot h^{-1}$ during a typical plant cell culture in batch mode (results not shown), this implies that a correction will be necessary during the lag phase and the first part of the exponential phase, i.e. during more than half of the total culture time.

5.2.4.2. Accuracy of the measurements

The accuracy of the respirometer was tested by means of an enzymatic reaction that consumes oxygen. The enzyme *glucose oxidase* oxidizes one mole of glucose to gluconic acid while consuming one mole of oxygen. A second reaction produces a pink compound that can be quantified using a spectrometer. The oxygen consumption rate of the reaction can then be determined both directly (in the respirometer) and indirectly (through the spectrometric measurement). The results presented in Table 2 demonstrate the accuracy of the respirometer since the relative error between the spectrometric and the respirometric *OUR* values ranged from 6.0 to 9.5 %. Similar precision was observed between the spectrometric and the respirometric determination, ranging from 8.6% to 15.4%. During regular measurements (i.e. cell sample without spectrometric measurements), an average precision range of 7.6 % was obtained, which suggests that good precision can be obtained with the respirometer (data not shown).

Table 5.1 : Oxygen uptake rates of the enzymatic reaction, measured in the respirometer as well as determined by spectrometry. Error intervals represent the 95% confidence interval for n=4.

	Spectrometric determination	Respirometric determination
Undiluted enzyme	26,58 ± 2,76 mM · h^{-1}	24,07 ± 2,38 mM · h^{-1}
1/5 diluted enzyme	5,32 ± 0.78 mM · h^{-1}	5,00 ± 0.77 mM · h^{-1}
1/10 diluted enzyme	2,89 ± 0.25 mM · h^{-1}	2,62 ± 0.35 mM · h^{-1}

However, the previous protocol did not permit the assessment of the accuracy for OUR smaller than 2.5 $mM \bullet h^{-1}$ due to the quantification limit of the spectrometer. To circumvent this drawback, the enzymatic reaction duration was extended up to 15 minutes. Since the colorimetric reaction is directly proportional to the reaction time, it was then possible to obtain a spectrometric determination of OUR smaller than 2,5 $mM \bullet h^{-1}$. Results obtained with this new protocol demonstrated that the respirometer can provide accurate measurements of *OUR* as low as 0.53 +/- 0.08 $mM \bullet h^{-1}$ which was the lowest oxygen uptake rate measurable with the spectrophotometer during this experiment (data not shown). Thus, the respirometer allows accurate measurements of OUR ranging from 0.5 to 25.0 mM $O_2 \bullet h^{-1}$ without the need to either concentrate or dilute the cell suspension. Finally, the limit of quantification was selected to 0.5 $mM \bullet h^{1}$ whereas the detection limit could not be determined (due to the limitations of the spectrophotometer).

5.2.4.3. Cell integrity in the respirometer

To our knowledge, cell integrity during respirometric studies has received little attention in the literature. In fact, this aspect is not a major concern when working with microorganism and mitochondria because their small size imparts a high resistance to mechanical agitation. Many respirometric studies have also been conducted on whole animal cells and tissues, but these publications focused more on the mitochondrial activity in itself rather than on the global oxidative metabolism of the cells. For this purpose, cell integrity was of little interest and was even voluntary shattered to allow various metabolites and decoupling agents to reach the mitochondria's environment through passive diffusion (Steinlechner-Maran et al., 1996, Sperl et al, 1997, Oexle et al, 1999, Steurer et al, 1999).

However, maintaining cell integrity is more crucial when studying the global oxidative metabolism of cells. In fact, the disruption of the plasma membrane alters the mitochondrion microenvironment (*DO* concentration, pH, metabolites concentrations,

etc.) and could therefore severely modify the kinetics of oxygen consumption. Maintaining cell integrity during respirometric studies appears then to be the only viable route to obtain significant data that can be related to cell metabolism.

But this requirement to maintain the integrity of the cells contradicts the hydro-dynamical constraint of the system. Since pO_2 probes consume oxygen, an adequate mixing is required into the measurement chamber in order to maintain homogeneous conditions during the respirometric test. Insufficient mixing would result in the formation of a stagnant film at the membrane-liquid interface of the probe. The oxygen gradient thus created would alter the oxygen reaction rate at the cathode resulting in an inaccurate DO concentration measurement. On the other hand, vigorous stirring inside the measurement chamber creates substantial shear forces that could easily damage more sensitive cells (i.e. animal and plant cells. Doran, 1995). Therefore, a compromise must be established between the hydro-dynamical and the biological requirements of the system.

The agitation speed required to obtain accurate DO measurements in the respirometer depends on several parameters including the sample volume, the viscosity of the cell suspension and the stirrer geometry. Much attention was focused on this last parameter and four magnetic bar geometries were investigated (Figure 7). However, obtaining a non-respiring cell suspension that can be used to assess the magnetic stirrers efficiencies is not simple. In an attempt to obtain such a suspension, plant cells were incubated with DMSO (50 ml of 5-day-old suspension containing 7.9 g $DW \cdot L^{-1}$ with 10 ml of DMSO) for 4 hours. The suspension was tested to assure that the respiration rate was null, then the cells were filtered under vacuum on a paper filter and re-suspended in fresh medium (in order to obtain an approximate concentration of 7.9 g $DW \cdot L^{-1}$). Although this killed the cells, the treatment seemed to have little influence on their external structure as verified by transmission light microscopy. This non-respiring suspension was then believed to have similar rheologic properties than the respiring suspension, based on the conservation of the cell structure and concentration.

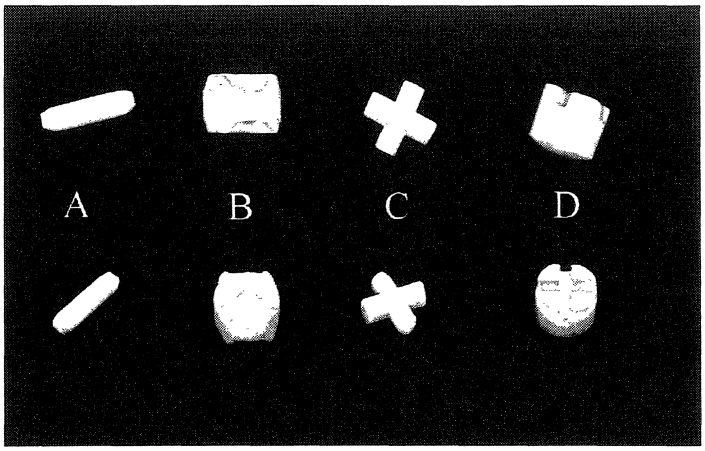


Figure 5.3 : Two views of the four magnetic bars tested during the cell integrity test. A: polygonal shape (Micro stir bar, 10 x 3 mm, Fisher Scientific, ref. 14-511-69); B: crosshead shape (10 mm diameter, Sigma-Aldrich ref. Z16215-9); C: cross shape (9.5 mm diameter, Sigma-Aldrich ref. Z18984-7); D: spectroscopy cuvet shape (10 mm diameter, Sigma-Aldrich ref. Z36354-5).

The minimum agitation speed required to obtain speed-independent *DO* measurements was evaluated for the four stirrers using the non-respiring sample. The minimum agitation speed was found to be 230 rpm for the octagonal-shape and the cross-shape magnetic bars, 600 rpm for the crosshead-shape bar, and even higher for the cuvet-shape bar (value not measurable). The effect of the magnetic bar geometry and of the duration of the respirometric test on the integrity of the plant cells was investigated. The agitation speed was set to 230 rpm for the four magnetic bars. A 5-day-old suspension at mid-exponential phase and having a concentration of 7.5 g $DW \cdot L^{-1}$ (2.3 x 10^6 $cells \cdot ml^{-1}$) was used. A time-dependent increase in cell disruption was observed with 100% cell death after 8 hours stirring for all the stirring bars used (Table 3). The test length must then be

maintained as short as possible (5 minutes or less) to limit cell damage. Moreover, for a given test length, the stirring bar geometry had a tremendous influence on cell integrity. The cross-shaped bar seemed to be less damaging to the cells (10 % broken cells for a 5 min assay). In contrast, the octagonal magnetic bar was the most damaging for plant cells with twice as many broken cells compared to the cross shaped bar after a 5 min assay (22.8% versus 10.1% respectively). For this reason, the cross-shaped magnetic bar was used in all subsequent experiments as it seemed to have the least destructive effect on the cells.

Table 5.2: Percentage of broken plant cells in the respirometer as a function of magnetic bar shape and respirometric test length. A) polygonal shape, B) crosshead shape, C) cross shape and D) spectroscopy cuvet shape

	Magnetic bar shape			
Test length	A	B	C	D
5 min.	22.8 %	16.1 %	10.1 %	19.5 %
15 min.	78.4 %	74.7 %	54.7 %	73.1 %
8 hours	100 %	100 %	100 %	100 %

The same experiment was also conducted with animal cells (NS0 cells). Several confluent T-flasks were harvested and re-suspended in fresh DMEM to generate a cell suspension having a concentration of 3.6×10^6 cells·ml^{-1}. This suspension (3 ml per assay) was used to study the cells integrity in the respirometer as a function of the stirring bars shape and the test length. The results, presented in table 4, shows that little or no cell

disruption occurred for test length of 15 minutes or less, except for the crosshead shape (13.3 % of broken cells after 15 minutes).

Table 5.3: Percentage of broken plant cells in the respirometer as a function of magnetic bar shape and respirometric test length. A) polygonal shape, B) crosshead shape, C) cross shape and D) spectroscopy cuvet shape

	Magnetic bar shape			
Test length	A	B	C	D
5 min.	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %
15 min.	0.0 %	13.3 %	6.5 %	0.0 %
8 hours	15.2 %	25.1 %	30.0 %	4.9 %

For longer test length (2 h), the spectroscopy cuvet shape bar had the less influence on cell integrity followed by the octagonal stirring bar (4.9 % and 15.2 % of broken cells respectively). Since most commercial respirometers are equipped with an octagonal stirring bar, we can use the data obtained with this same bar to compare our results with those of previous studies. The few publications that report viability tests for animal cells mentioned either that viability remains high (Jorjani and Ozturk, 1999) or that there was a small decrease in cell number and viability (Steinlechner-Maran et al., 1996). The published results are then consistent with ours.

Overall, our result shows that *Eschscholtzia californica* cells (plant cells) have a higher sensitivity to shear stress compared with NS0 cells (animal cells) in the test conditions used here. This could be due to their bigger size and to the fact that plant cells are less resistant to deformations because of the presence of the rigid cell wall. Although

adequate for animal cells, the octagonal stirring bar is clearly not suitable for plant cells. For this reason, conventional respirometers equipped with this type of stirring bar should not be used with plant cells since we demonstrated that a significant level of cell disruption occurs even for test duration of only 5 minutes.

5.2.4.4. Oxygen affinity study

The OUR dependence on *DO* concentration has been described in mitochondria, cells, and tissues by a hyperbolic saturation-type relation in the low oxygen range (James, 1953, Ding and Schopfer, 1995, Steinlechner-Maran et al., 1996, Costa et al., 1997). Data used to construct this hyperbolic relationship can be obtained from two different experiments. First, a single cell suspension sample is saturated at high *DO* value and the decrease in DO can be recorded until 0 % is reached. Second, the cell suspension is divided into several sub-samples that are saturated at distinct initial *DO* concentrations, each sample resulting in one or several points of the curve. Despite being more tedious, this second strategy was used with plant cells bearing in mind that cell integrity decreases significantly as residence time within the respirometer is increased.

A 5-day-old cell suspension was separated into 10 sub-samples. Each sub-sample was successively placed in the oxygen enrichment chamber for 10 minutes under agitation (see material and methods). Gas mixtures of known oxygen pressure were used to pre-adjust the *DO* concentration of each sample at a specified value by surface aeration. The cell suspension was then transferred into the respirometer and the *DO* was monitored for 5 minutes.

The dependence of OUR on *DO* concentration is illustrated in figure 8. The curve demonstrates a typical Michaelis-Menten saturation curve with a maximum *OUR* of 1.666 $mM \cdot h^{-1}$ (OUR_{max} obtained from the Lineweaver-Burke plot of the data presented in figure 8). This OUR_{max} corresponded to a specific oxygen consumption rate of 0.243 mmole $O_2 \cdot g^{-1}$ DW (equation 5). Figure 8 shows that *OUR* becomes *DO* dependent below 0.105 mM O_2 (approximately 10% of pure oxygen saturation, or 50% of air saturation). This

value corresponds to the critical *DO* (DO_{crit}) for the *E. californica* cells we used, according to the definition given by Doran (1995). This implies that if the *DO* concentration falls below 0.105 mM O_2 when cultivating those cells, oxygen becomes limiting and metabolism is then partly anaerobic.

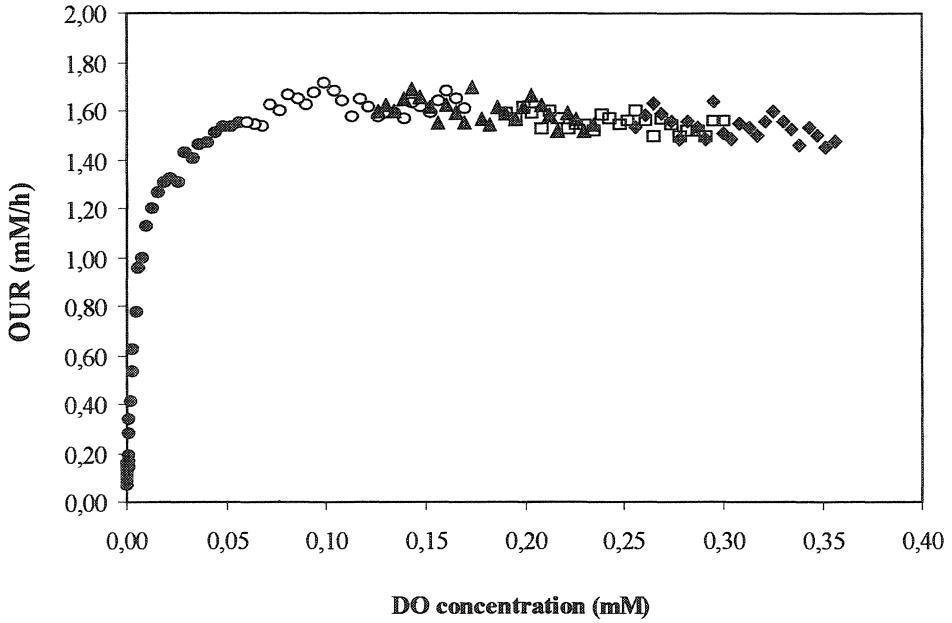


Figure 5.4 : OUR dependence versus DO concentration for a plant cell suspension. Each different symbol corresponds to a different aliquot of the same suspension.

This also implies that for routine estimation of OUR_{max}, the *DO* concentration must imperatively be higher than 0.105 mM O_2 during the entire respirometric assay. For highly respiring suspensions, it could then be necessary to pre-adjust the *DO* suspension up to 0.3 mM O_2 in the oxygen enrichment chamber before the experiment.

The *DO* concentration at half OUR_{max} (the apparent Michaelis constant for oxygen also referred as P_{50} or K_{O2}) was 7.83×10^{-3} mM O_2 for this cell suspension (value obtained from the Lineweaver-Burke plot of the data presented in figure 8). This constant is

directly linked to the affinity of the cells for oxygen. Therefore, it is a good indicator of the cells physiological and metabolic state (Steinlechner-Maran et al., 1996, Costa et al., 1997, Gnaiger et al., 1998). K_{O2} values ranging from 1×10^{-3} to 3×10^{-3} mM O_2 were observed for animal cells (Steinlechner-Maran et al., 1996, and references therein). To our knowledge no oxygen affinity studies have ever been conducted on cultivated plant cells, thus comparative data are presently unavailable. However, Ding and Schopfer (1995) reported a K_{O2} of 25×10^{-3} mM for maize coleophyle (a part of the shoot), which is more than 3 times higher than our value for cultivated cells. Assuming that this result is not an artifact of measurement errors (due to uncorrected background oxygen flux), this could suggest that oxygen diffusion is faster in plant cells than in plant tissues. The same conclusion was previously drawn when comparing K_{O2} found in whole animal cells with those of extracted mitochondria (Gnaiger et al., 1995). In the case of plant cells, this K_{O2} difference between cultivated cells and tissues could also be due to a difference in the metabolic and physiological state of the samples. However, additional work is required to assess the influence of metabolic and physiological state on K_{O2} and qO_2 in cultivated plant cells.

At the view of the results of q_{O2max} and C_{crit} obtained for plant cells, it worth noting here that extra-care must to be taken to minimize the effect of cell transfer from the culture vessel to the respirometer. For example, the DO concentration of the sample should never drop below C_{crit} to minimize anaerobic stress. A rapid calculation using the parameters obtained above show us that this could happen in less than 5 minutes if no oxygen is provided to the sample. The respirometric test must then be performed immediately after sampling or the sample has to be maintained at the proper DO concentration in the oxygen enrichment chamber before proceeding to the test.

5.2.5. CONCLUSION

Most conventional respirometers have been initially designed for studying microorganisms and organelles. However, since animal and plant cells have a high

sensibility to shear stress compared to smaller cells, the vigorous mechanical stirring occurring in those respirometers could cause cell breakage. To assess this possibility, cell integrity inside the respirometer was tested as a function of the stirring bar shape as well as the test duration. Results show that animal and plant cells have a different sensibility level for shear stress inside the respirometer. For test length below 15 minutes, animal cells were only slightly damaged whichever stirring bar was used. On the contrary, significant plant cell disruption occurred inside the respirometer even for very short test length (5 minutes). The stirring bar shape had also a significant influence on cells' integrity in the measuring chamber. The octagonal stirring bar, which is used in most commercial respirometer, was shown to be unsuitable to study plant cells. The use of a cross shaped magnetic bar and the reduction of the test length to 5 minutes or less is thus recommended in order to obtain accurate OUR measurements from for plant cells suspension.

A very simple respirometer was developed to measure oxygen consumption rates of low respiring and shear-sensitive cell suspensions. This respirometer was proven to give accurate and precise *OUR* measurements from 1.5 mM $O_2 \cdot h^{-1}$ to 25.0 $mM \cdot h^{-1}$, which covers a large variety of bioprocess applications. The respirometer is also suitable for low OUR measurements ranging from 0.5 to 1.5 mM $O_2 \cdot h^{-1}$ providing that the data are corrected for the abiotic background fluxes. Although not directly thermostatically controlled, the measurement chamber can easily be maintained at the proper temperature by submerging the respirometer in a thermo-regulated water bath or by placing it in an thermostated incubator.

The respirometer was used to carry out an oxygen affinity study on a *Eschscholtzia californica* (EC) cells suspension. Several respirometric parameters were then measured such as the maximum specific oxygen consumption rate ($q_{O2max,}$ 0.243 mmole $O_2 \cdot g^{-1}$ DW h^{-1}), the apparent Michaelis constant for oxygen ($K_{O2,}$ 7.83×10^{-3} mM O_2) and the critical concentration for oxygen ($C_{crit,}$ 0.105 mM O_2).

The use of this accurate and low cost respirometer could be a valuable asset in the bioprocess field as well as in the R&D area. In the bioprocess field, high precision respirometers can be used to precisely determine important bioprocess parameters such as DO_{crit} and qO_2 for different cell types. Moreover, the precise determination of OUR at regular intervals during a culture process permits significant reduction of the bias of on-line OUR estimates obtained from mass balances and software sensors. In the R&D area, high precision respirometric measurements constitute a valuable tool to better characterize the physiological and metabolic state of cells. As a mater of fact, this respirometer is routinely used in our lab for the physiological characterization of cultured plant cells.

5.2.6. ACKNOWLEDGMENTS

The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec" funded this research project. We thank Caroline Hoemann, Stuart Campbell and Dr. Sylvain Mandeville for kindly reviewing this manuscript, Dr. B. Massie and P. Daoust from the Biotechnology Research Institute (National Research Council) for providing the animal cells, and Dr. M. Bushmann for kindly allowing the use of his animal cell culture facilities.

5.2.7. REFERENCES

Baird, R.B.; Kuo, C.L.; Shapiro, J.S. and Yanko, W.A. The fate of phenolics in wastewater-determination by direct-injection GLC and Warburg respirometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1974**, 2 (2), 165-78.

Bailey, J.E. and Ollis, D.F. In: *Biological Engineering Fonfamentals*, 2nd Ed., Verma, K. and Martin, C.C. Eds. McGraw-Hill Inc., New York. **1986**.

Cherry, R.S. and Papoutsakis, E.T. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess Eng.* **1986**, 1, 29-41.

Costa L.E.; Mendez, G. and Boveris, A. Oxygen dependence of mitochondrial function measured by high-resolution respirometry in long-term hypoxic rats. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* **1997**, 42 (3), C852-C858.

Ding, B.L. and Schopfer, P. Oxygen dependence of elongation and oxygen uptake in maize coleoptiles. *Bot. Acta.* **1995**, 108, 381-386.

Doran, P.M. In: *Bioprocess Engineering Principles*. Doran, P.M. Ed. Academic press, San Diego. **1995**.

Eyer, K.; Oeggerli, A. and Heinzle, E. On-line gas analysis in animal cell cultivation. II. Methods for OUR measurements and its application for control. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, 45, 54-65.

Gamborg, O.L.; Miller, R.A. and Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **1968**, 50, 151-156.

Gnaiger, E.; Steinlechner-Maran, R.; Mendez, G.; Eberl, T. and Margreiter, R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J. Bioenergetics and Biomembranes.* **1995**, 27 (6), 583-597.

Gnaiger, E.; Lassnig, B.; Kuznetsov, A.; Rieger, G. and Margreiter, R. Mitochondrial Oxygen affinity, respiration control and excess capacity of cytochrome *c* oxidase. *J. Exp. Biol.* **1998**, 201, 1129-1139.

Gnaiger, E.; Mendez, G. and Hand, S.C. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**, 97 (20), 11080-11085.

Gong, P.; Gasparrini, P.; Rho, D.; Hawari, J.; Thiboutot, S.; Ampleman, G. and Sunahara, G.I. An in situ respirometric technique to measure pollution-induced microbial

community tolerance in soils contaminated with 2,4, 6-trinitrotoluene. *Ecotoxicol Environ Saf.* **2000**, 47 (1), 96-103.

Haller, T.; Ortner, M. and Gnaiger, E. A respirometer for investigating oxidative cell metabolism: toward optimization of respiratory studies. *Anal Biochem.* **1994**, 218 (2), 338-342.

Hammond, D.G. and Kubo, I. Alkanols inhibit respiration of intact mitochondria and display cutoff similar to that measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* **2000**, 293 (3), 822-828.

Hua, J.; Erickson, L.E.; Yiin, T.Y. and Glasgow, L.A. A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability. *Crit Rev Biotechnol.* **1993**, 13 (4), 305-328.

James, W.O. Oxygen effects, in *Plant respiration.* James, W.O. ed. Clarendon Press, Oxford. **1953**, 143-167.

Jorjani, P. and Ozturk, S.S. Effect of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 64 (3), 349-356.

Kieran, P.M.; Malone, D.M. and MacLoughlin, P.F. Effects of Hydrodynamic and Interfacial Forces on Plant Cell Suspension Systems. *Adv. Biochem. Eng. / Biotech.* **2000.** 67 (0), 139-177.

Kim, I.S.; Kim, S. and Jang, A. Activity monitoring for nitrifying bacteria by fluorescence in situ hybridization and respirometry. *Env. Monit. Ass.* **2001**, 70 (1,2), 223-231.

Kyung, Y.S.; Peshwa, M.W.; Gryte, D.M. and Hu, W.S. High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements. Cytotechnology. **1994**, 14, 183-190.

Malucelli, M.I.; Niero, R.; Lucchiari, P.H.; Souza, M.D.; Bruzzo, D.; Alves, R.C.; Miguel, O. and Bacila, M. Evaluation of the polarographic technique for assay of the viability of freeze-dried BCG vaccine: II. Viability of the vaccine assessed by polarography, Warburg respirometry and colony counting. *Vaccine*. **1995**, 13 (3), 273-278.

Marsilli-Libelli, S. and Vaggi, A. Estimation of respirometric activities in bioprocesses. *J. Biotechnol.* **1997**, 52, 181-192.

Oexle, H.; Gnaiger, E. and Weiss, G. Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Bioch. Bioph. Acta – Bioenergetics*. **1999**, 1413 (3), 99-108.

Olsson, G. and Hansson, O. Stochastic modelling and computer control of a full scale wastewater treatement. In: *Instrument models in air and water pollution.* Plant. Porc. Symp., Institute of Measurement and Control, London. **1976**.

Ozturk, S.S.; Blackie, J.; Wu, P.; Taticek, R., Konstantinov, K., Matanguihan. C., Tsai, Y.; Yoon, S.; Thrift, J. and Naveh, D. On line monitoring for consistent and optimal production of biologicals from mammalian cells fermentation. In: *Animal cell technology*, Corrando, M. ed., Kluwer, Nederlands. **1996**.

Panov, A. and Scarpa, A. Mg2+ Control of respiration in isolated rat liver mitochondria. *Biochemistry*. **1996**, 35 (39), 12849-12856.

Quicker, G.; Schumpe, A.; König, B. and Dekwer, W.D. Comparison of measures and calculated oxygen solubilities in fermentation media. *Biotechnol. Bioeng*. **1981**, 23, 635-650.

Shuler, M. L. and Kargi, F. In :*Bioprocess engineering : basic concepts*. Englewood Cliffs, N.J. ed., Prentice Hall. **1992**.

Sperl, W.; Skladal, D.; Gnaiger, E.; Wyss, M.; Mayr, U.; Hager, J. and Gellerich, F.N. High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry.* **1997**, 174 (1/2), 71-78.

Steinlechner-Maran, R.; Eberl, T.; Kunc, M.; Margreiter, R. and Gnaiger, E. Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **1996**, 40 (6), C2053.

Steinlechner-Maran, R.; Eberl, T.; Kunc, M.; Schrocksnadel, H.; Margreiter, R. and Gnaiger, E. Respiratory defect as an early event in preservation-reoxygenation injury of endothelial cells. *Transplantation.* **1997**, 63 (1), 136-142.

Steurer, W.; Stadlmann, S.; Roberts, K.; Fischer, M.; Margreiter, R. and Gnaiger, E. Quality Assessment of Isolated Pancreatic Rat Islets by High-Resolution Respirometry. *Transplantation Proceedings.* **1999**, 31 (1), 650.

Steward, N.; Martin, R.; Engasser, J.M. and Goergen, J.L. A new methodology for plant cell viability using intracellular esterase activity. *Plant cell reports.* **1999**, 19, 171-176.

Truesdale, G.A.; Downing, A.L. and Lowden, G.F. The solubility of oxygen in pure water and seawater. *J. Appl. Chem.* **1955**, 5, 53-62.

Yoong, E.T. and Lant, P.A. Biodegradation of high strength phenolic wastewater using SBR. *Water Sci. Technol.* **2001**, 43 (3), 299-306.

Zimakowska-Gnoinska, D. and Bech, J. Estimation of the soil respiration using the constant pressure volumetric respirometer and the flow-through respirometer UNI-RES10. *Env. Monit. Ass.* **2000**, 64(3), 583-590.

CHAPITRE 6. ÉVALUATION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE DANS UNE SUSPENSION DE CELLULES VÉGÉTALES À L'AIDE D'UN LECTEUR DE PLAQUE MULTI-PUITS.

6.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Afin de caractériser l'état physiologique des cellules de plantes, il est important d'avoir une mesure précise de leur taux de division. En biotechnologie végétale, la plupart des auteurs se basent sur des mesures de biomasse humide et sèche pour quantifier la prolifération cellulaire. Cependant comme on l'a vu plus haut, les cellules de plantes peuvent accumuler divers ions, sucres, lipides et protéines au niveau intracellulaire. Ce stockage s'accompagne d'une augmentation de la biomasse qui n'a rien à voir avec le processus de division cellulaire. Pour cette raison les mesures de biomasse humide et sèche sont de mauvais indicateurs de la prolifération cellulaire et seule la concentration cellulaire devrait être prise en compte pour évaluer le taux de division des cellules végétales.

Cependant déterminer la concentration cellulaire dans une suspension végétale n'est pas chose facile. En effet les cellules de plantes poussent la plupart du temps en amas compacts. Les cellules de ces amas partagent une paroi commune et sont donc toutes liées entre elles. En conséquence, il est impossible de les dénombrer microscopiquement en l'état. Il faut préalablement passer par une étape de macération enzymatique pour digérer la paroi pecto-cellulosique des cellules et désolidariser les amas.

Ce processus de macération et de comptage microscopique est extrêmement long et fastidieux. De plus il faut contrôler les conditions de macération très précisément et les adapter à chaque suspension cellulaire. En effet si la macération est trop longue, les protoplastes (cellules végétales débarrassées de leur paroi pecto-cellulosique) sont

détruits en raison des protéases contenues dans la solution de macération qui digèrent la membrane cytoplasmique. Or comme la composition de la paroi pecto-cellulosique change selon la lignée cellulaire mais aussi en fonction du statut nutritionnel des cellules de plantes, il faut adapter les conditions de macération au jour le jour.

Le comptage microscopique des cellules végétales est donc particulièrement difficile à mettre en place lors d'analyses de routine quand beaucoup d'échantillons sont à traiter en même temps. De plus la macération et le comptage doivent être fait sur des cellules vivantes donc tout de suite après prélèvement, ce qui s'avérait impossible dans le cadre de ce projet en raison du grand nombre d'analyses à conduire sur chaque échantillon. Il nous fallait donc trouver une alternative fiable et rapide au comptage microscopique pour estimer la concentration cellulaire dans nos suspensions cellulaires.

Nous avons donc mis au point une technique de comptage basée sur la coloration de l'ADN et la quantification de la fluorescence des échantillons à l'aide d'un lecteur de plaque multi-puits. Cette méthode nous a permis de diminuer par 10 le temps requis pour mesurer la concentration cellulaire dans nos échantillons. De plus elle permet de stocker les échantillons afin des les analyser tous en même temps à la fin de l'expérience. La méthode de comptage en multi-puits pourrait permettre une généralisation des données de concentration cellulaire en biotechnologie végétale et ainsi augmenter grandement notre compréhension de la physiologie des cellules plantes cultivées.

6.2. DETERMINATION OF CELL CONCENTRATION IN A PLANT CELL SUSPENSION USING A FLUORESCENCE MICROPLATE READER

DETERMINATION OF CELL CONCENTRATION IN A PLANT CELL SUSPENSION USING A FLUORESCENCE MICROPLATE READER

Laurence Lamboursain[1] and Mario Jolicoeur*

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools,

Bio-P2 Research Unit, Department of Chemical Engineering, Ecole Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Station Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7.

* Corresponding author:

Mario Jolicoeur

Associate Professor

Tel: (514) 340 4711 ext: 4525

Fax: (514) 340-4159

E-mail: mario.jolicoeur@polymtl.ca

6.2.1. ABSTRACT

Plant cells microscopic counting is a very tedious and time-consuming process and is therefore seldom used to evaluate plant cell number on a routine basis. This study describes a fast and simple method to evaluate cell concentration in plant cell suspension using a fluorescence microplate reader. *Eschscholtzia californica* cells were fixed in a mix of methanol and acetic acid (3:1) and stained with a fluorescent DNA binding dye (Hoechst 33258). Readings were done in a fluorescence microplate reader at 360/465 nm. Specific binding of the dye to ds-DNA was significantly favored over unspecific binding when 1.0 M TRIS buffer at pH 7.5 containing 1.0 M NaCl and 75 $mg \cdot ml^{-1}$ of Hoechst 33258 was used. Fluorescence readings must be done between 4 and 12 minutes after the addition of the staining solution in the sample. The microplate counting method provides a convenient, rapid and sensitive procedure for determining the cell concentration in plant cell suspensions. The assay has a linear detection range from 0.2 to 10.0´106 $cells \cdot ml^{-1}$ (actual concentration in the tested cell suspension). The time needed to perform the microplate counting was 10 % that needed for the microscopic enumeration. However this microplate counting method can only be used on genetically stable cell lines and on asynchronous cell suspensions.

Key words – plant cells, cell counting, cell suspension culture, DNA staining, Hoechst 33258, *Eschscholtzia californica*.

6.2.2. INTRODUCTION

Plant cell culture is a promising avenue to produce highly valuable phytochemicals as well as being an invaluable model to study plant cell physiology and metabolism. In the

past decades, suspended plant cells cultivated either in bioreactor or in agitated flasks have been extensively studied in an attempt to improved our knowledge regarding their physiology and metabolism.

However, the accurate estimation of cell proliferation during the culture process remains a major concern in plant cell culture. In many studies on plant cells, biomass quantification based on dry weight and fresh weight measurements is still greatly preferred over cell enumeration measurements to evaluate cell proliferation. Nevertheless, dry and wet biomass measurements are poor indicators of plant cells' proliferation, because their specific dry mass and water content vary significantly depending on culture conditions. Plant cells have the ability to accumulate large amounts of water and nutrients leading to an increase in dry and wet biomass even though cells are not actually dividing. Moreover, the size and volume of cultivated plant cells are correlated with nuclear size (i.e. ploidy level, Nurse, 1985, Kondorosi et al., 2000; Gregory, 2001) and with the culture medium composition (Taiz, and Zeiger, 1998, Steward et al., 1999). Therefore, fresh weight as well as dry weight measurements are both unreliable to study plant cell division kinetics.

An accurate estimation of cell number in plant cell suspension is crucial to study plant cell division kinetics and correlate growth pattern to physiological and metabolic responses. Direct counting by microscopic examination is the most reliable method for this purpose. However, the visual enumeration of plant cells is difficult because they form aggregates than can reach several millimeters in diameter. Those cell clusters are composed of up to several dozen cells sharing their cell walls. Several methods are available to disperse clustered plant cells including the maceration in CrO_3 (Butcher and Street, 1960, Karlsson and Vasil, 1986) or in an enzymatic solution containing pectinase, cellulase and hemi-cellulase to obtain single protoplasts (Amino et al., 1983). The enzymatic maceration can also be prolonged in order to extract nuclei from the protoplasts. The latter are then stained and enumerated (Laloue et al., 1980). All those methods require the use of a microscope and a haemacytometer. They are laborious,

highly time consuming and show poor reproducibility amongst different analysts due to the difficulty of identifying remnant cells after the maceration process. Moreover, the maceration time must be continually modified to suit the degree of aggregation of plant cells and their cell wall composition, both factors that vary significantly between plant species as well as throughout the cultivation process. The maceration protocol must then be carefully adjusted for each different sample to suit the changing physiological status of the cells (Nicholoso et al., 1994, and personal observations). Consequently microscopic enumeration is very seldom used on a routine basis in plant cell studies.

To circumvent difficulties related to microscopic enumeration, several biochemical assays have been developed to indirectly quantify cell concentration in plant cell suspensions. For example, the viable cell concentration was evaluated by extracting intracellular esterases and quantifying the esterase activity using fluorescein diacetate (Steward et al., 1999). Fluorescein diacetate was also used in vivo to evaluate the viable cell concentration using either a fluorimeter (Kovarick and Fojtova, 1999) or a phosphorimager (Vankova et al., 2001). However the relationship between the fluorescence intensity and the cell number was linear only for a very narrow dynamic range (from 0.1 to $0.4'10^6$cells·ml^{-1}). Furthermore, the esterase activity per cell is not a reliable parameter since it depends on the physiological and nutritional state of the cell throughout the culture process (Steward et al., 1999, and personal observations).

In our search for an accurate and simple method to enumerate cultured plant cells, several techniques used in animal cell culture were considered. Among those, counting techniques based on DNA quantification seems promising. In genetically stable cell lines, the average cell's DNA content remains essentially constant and is therefore directly proportional to the cell number (Rago et al., 1990). In animal cell culture, this method is considered to be the most consistent to enumerate cells, second in reliability after the microscopic counting (Labarca and Paigen, 1980, Rye et al., 1993). Most attention have been drawn in particular to Hoechst dye staining since this dye was proven to be highly

specific to double stranded DNA, thus allowing cell enumeration in tissues with minimum sample preparation (Cowell and Franks 1980, Rye et al 1993, Hoemann et al. 2002).

However, despite its great potential, this technique has never been used with plant cells. Plant cells have a number of characteristics that make the biochemical quantification of their DNA content challenging. Several components of the cell may interfere with DNA extraction (Newbury and Possingham, 1977, Baker et al., 1990, Do and Adams, 1991) as well as with the proper binding of the Hoechst dye with DNA (Laloue et al., 1980, Hernandez and Palmer, 1988).

This paper describes a protocol for the rapid, easy and accurate counting of plant cells. The cell number was estimated by measuring the total fluorescence originating from whole fixed cells that were stained with Hoechst dye (H 3258). The resulting fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader. The new quantification technique was used to study the growth kinetics of *Eschscholtzia californica* cells cultivated in agitated flasks.

6.2.3. MATERIAL AND METHODS

All experiments were performed under normal laboratory light at 25 ± 3°C. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada.

6.2.3.1. Hoechst dye solutions

A 2 $mg \cdot ml^{-1}$ stock solution of Hoechst dye (Hoechst 33258, bis-benzimide trihydrochloride, Sigma-Aldrich catalog #H33258) was prepared in 0.005 M HCl. This stock solution was stored at 6 ± 2°C in the dark and discarded after one month.

The working solution (75 $\mu g \cdot ml^{-1}$) was prepared immediately before the analysis by aliquoting 188 µl of the stock solution in 5 ml of Tris buffer at room temperature (1 M

Tris buffer at pH 7.5 supplemented with 1 M NaCl). This working solution must be protected from light and should be used within 1 hour after preparation.

6.2.3.2. Plant cell sampling

As mentioned previously, plant cells grow in aggregates than can reach several mm in diameter. In order to withdraw a representative sample of the cell suspension, pipette tips were modified to allow the passage of cell clusters. If not mentioned differently in the text, 10 ml serological plastic pipettes were cut with a heated scalpel blade at 3 mm from the tip, 200 µl disposable pipette tips were cut at 7 mm from the tip and 1000 µl disposable pipette tips were cut at 2 mm from the tip.

6.2.3.3. Cell culture

A rapidly growing, 10 years old *Eschscholtzia californica* suspension culture was used throughout the study. The cell suspension was obtained as described previously (Lamboursain et al., 2002) and was sub-cultured when the settled cell volume (SCV) reached 70-80% of the total volume after 5 minutes of sedimentation (i.e. every 10 to 15 days). The suspension was then transferred into a 500 ml Erlenmeyer flask containing fresh medium (80 g of cell suspension in 170 g of liquid B5 medium containing 30 $g \cdot l^{-1}$ sucrose and supplemented with 0.2 $mg \cdot l^{-1}$ 2,4-D and 0.1 $mg \cdot l^{-1}$ kinetin). All Erlenmeyer flasks had a two layer aluminum foil closure and were placed on an orbital shaker at 120 rpm.

6.2.3.4. Microscopic cell counting

For the enzymatic maceration and the mechanical disruption of the cells' aggregates, a 500µl aliquot was withdrawn from the well-homogenized cell suspension and transferred into a 1.5 ml microcentrifuge tube. The enzymatic solution (1 ml) was then added to the sample. This maceration solution was prepared freshly by suspending

10 units·ml^{-1} of cellulase (Sigma-Aldrich catalog #C1184), 0.03 units·ml^{-1} of hemi-cellulase (Sigma- Aldrich catalog #H2125) and 0.2 units·ml^{-1} of pectinase (Sigma-Aldrich catalog #P5146) in citrate buffer (200 mM, pH 4.5) supplemented with 60 g·l^{-1} of sucrose.

The microcentrifuge tubes were placed horizontally on an orbital shaker at 120 rpm for 1.5 hour. The macerated cells were then gently aspirated 3 times with a micropipette set at 1000 µl through a non-cut disposable tip. If aggregates remain (i.e. if the suspension could not be aspirated easily through the pipette tip), the suspension was aspirated 3 times through a cut disposable tip and the maceration process was prolonged for 30 additional min. The presence of aggregates was verified every 30 min. until the suspension could easily be aspirated through a non-cut disposable pipette tip.

For cell staining and enumeration, a stock solution of modified carbol fuchsin solution was prepared as described in Kao (1982). The carbol fuchsin working solution was prepared by diluting 1 ml of stock solution in 100 ml of 60 g·l^{-1} sucrose. The macerated cell sample (10 ml) was added to 200 ml of this working solution. The sample was mixed several times by aspiration and then introduced (50 ml) in the hemacytometer's counting chamber (Hausser Scientific catalog #3720, Horsham, PA, USA). The stained cells were enumerated under normal light illumination. Each sample was enumerated in quadruplicate.

6.2.3.5. Microplate cell counting

Cell fixation: a 500 µl sample was withdrawn from a well mixed cell suspension. The medium was removed either by centrifugation (16000´g, 30 min.) or by aspiration with a Pasteur pipette (the pipette was pushed down in the bottom of the microcentrifuge tube while slowly aspiring the medium). This step eliminated any solubilized DNA originating from cells that could have lysed during the culture process. The cells were then re-suspended into the fixative solution (methanol:acetic acid 3:1 v/v as described in

Cowell and Franks 1980, and Nicholoso et al., 1994) to reach a final volume of 1 ml. The minimal fixation period was 30 min. Prolonged fixation (up to 6 months) had no significant effect on the staining procedure.

Cells Staining: A 50 µl aliquot of the fixed cells was neutralized with 2 ml of 50 % NaOH (w/v) and then mixed with 200 ml of Hoechst dye working solution (75 $\mu g \cdot ml^{-1}$) for a final dye concentration of 60 $\mu g \cdot ml^{-1}$. The sample was mixed several times by successive aspiration with a pipette. The sample was then immediately transferred into a black polystyrene 96-well plate (flat bottom, Corning Costar, Cambridge, MA, USA, catalog number #3915). For each sample, four wells were loaded with 50 µl of stained cell suspension. The fluorescence quantification was done less than 12 min. after the beginning of the staining process with a fluorescence microplate reader (Tecan GENios, Tecan USA, Research Triangle Park, NC, USA). The plate was agitated 10 sec. with a linear motion immediately before reading. Readings were from the top with excitation/emission wavelengths at 360/465 nm.

Quantification of unknowns was performed through interpolation of relative fluorescence units (RFU) using a standard curve. The same calibration standards were used for all experiments however, the calibration curve was prepared during each experiment. To generate the cell calibration standards, a 5 d(ays) old cell suspension was filtered under vacuum on a glass fiber filter (47 mm diameter Glass Microfiber filters GF/D, Whatman address catalog #1823 047). The cells (2 g) were immediately re-suspended in 5 ml of fresh B5 medium to generate a high-density cell suspension. The cell titer of this suspension was determined by microscopic counting (see above). The high-density cell suspension was precisely diluted into fresh B5 medium to generate a standard cell suspension containing 10.0 10^6 $cells \cdot ml^{-1}$. The cell titer of this suspension was re-verified by microscopic counting. Serial dilutions in B5 medium of this standard cell suspension were done to generate an additional 4 standards containing respectively 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 10^6 ml^{-1} cells. The cell calibration standards were then fixed as described previously for the samples. The cell standards were stored at room temperature. Staining

and fluorescence quantification of the calibration standards was performed in parallel with samples for each experiment.

6.2.3.6. Wet weight and dry weight measurements

A 10 ml sample was withdrawn from the well mixed cell suspension and filtered under vacuum on a glass fiber filter (47 mm diameter Glass Microfiber filters GF/D, Whatman catalog #1823 047). The cell cake was immediately rinsed 3 times with 20 ml of de-ionized water. The cells were carefully removed from the filter with a spatula and immediately weighed in a disposable aluminum dish (Fisher Scientific catalog #08-732) to obtain the fresh biomass. The sample was then placed at 80°C until constant weight, cooled in a dry air environment and weighed to obtain the dry biomass.

6.2.4. RESULTS

6.2.4.1. Optimization of the staining conditions

Since Hoechst dye (H33258) binds specifically with double stranded DNA (dsDNA), it allows the quantification of DNA in crude samples with minimal interference from RNA, nucleotides, dilute detergents and proteins. However unspecific binding also occurs when the staining conditions are not optimal since the dye environment has a strong effect on the binding characteristic of the dye. Therefore, staining conditions should be carefully optimized in order to maximize specific fluorescence over nonspecific binding and increase the accuracy and precision of the assay.

The fluorescence response of stained cells was found to be 120 times higher at pH 7.5 than that at pH 3. The fluorescence of the unbound dye in the blank samples was also strongly pH dependent and increased significantly above pH 8.0. The optimum buffer pH was observed at 7.5 and the sample fluorescence response was dramatically affected when the pH deviated from this optimum.

The fluorescence response of stained cells was 7 times higher when 1 M Tris buffer was used instead of 0.1M Tris buffer (data obtained with 8.0 10^6 cells·ml^{-1} and with 0.1 M NaCl in both buffers, Fig. 9). Conversely the background fluorescence in the blank samples (containing no cells) was 4 times lower with 1.0 M Tris buffer in comparison to 0.1 M Tris buffer (122 and 424 RFU respectively). An increase of the NaCl concentration in the buffer from 0.1 up to 5.0 M has no significant effect on the fluorescence. However, it was noticed that better reproducibility was obtained with a concentration of 1.0 M. NaCl. Therefore 1.0 M Tris buffer containing 1.0 M NaCl was used in all subsequent experiments.

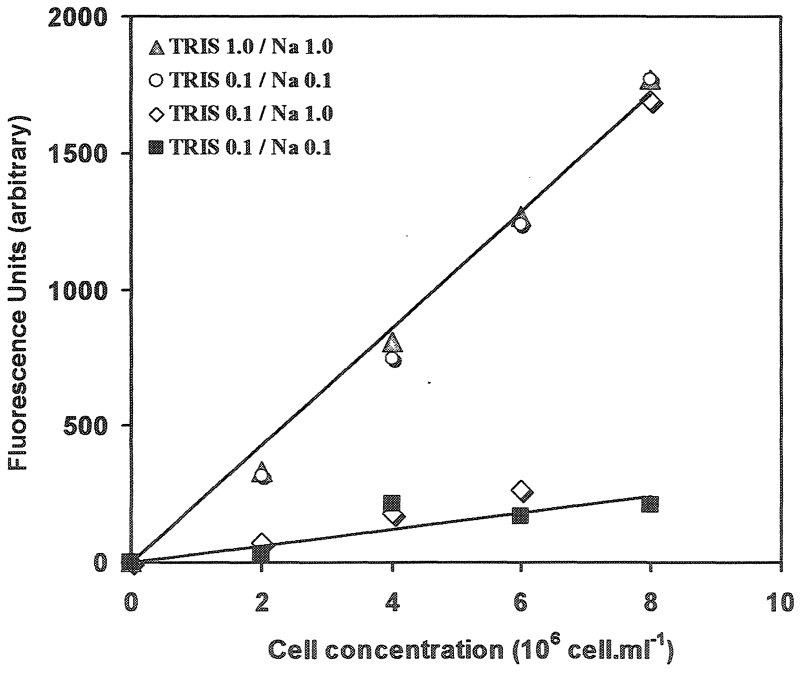


Figure 6.1: Influence of Tris and NaCl concentrations on the fluorescence of Hoechst stained plant cells. Two TRIS concentrations and Two NaCl concentrations were tested (see insert). The Hoechst dye concentration in the sample as well as buffer pH were maintained constant at 60 μg·ml^{-1} and 7.5 respectively.

The highest fluorescence response was obtained when either 60 or 80 $\mu g \cdot ml^{-1}$ of Hoechst dye (final concentration of dye in the sample) was used to stain the cells (Fig. 10). For instance at a cell concentration of 8 10^6 $cells \cdot ml^{-1}$ sample, the fluorescence response was 632, 1186, 1145 and 764 RFU for a dye concentration of 8, 60, 80 and 120 $\mu g \cdot ml^{-1}$ respectively. At a dye concentration of 60 or 80 $\mu g \cdot ml^{-1}$, the standard curve could be described by a linear relationship with a correlation coefficient of 0.996.

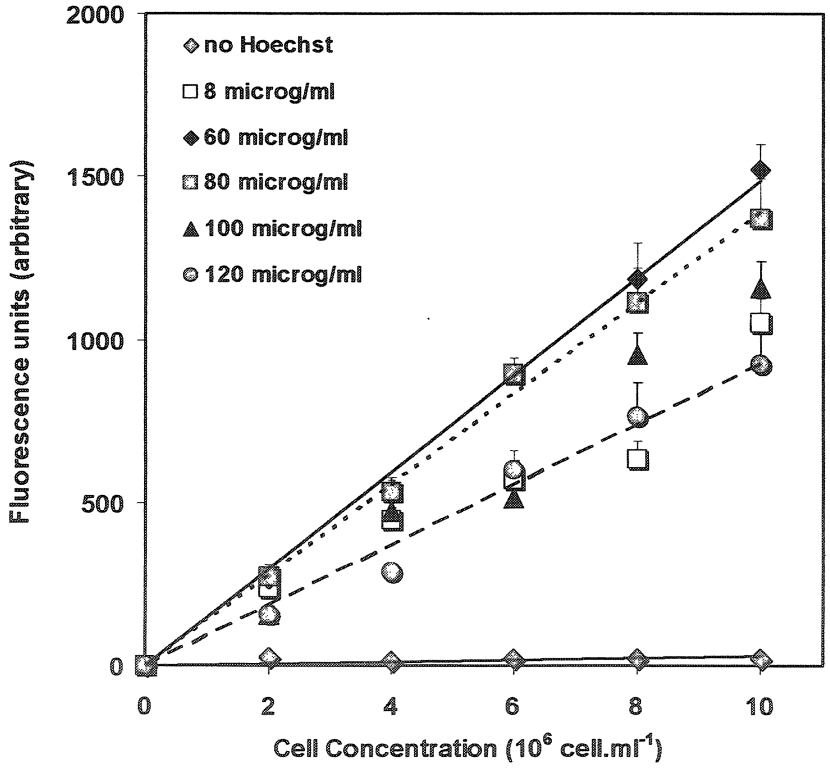


Figure 6.2: Standard curves obtained using the microplate counting at 5 different dye concentrations (final dye concentration in the sample - see insert). All assays were conducted with fixed plant cells in 1 M TRIS buffer pH 7.5 containing 1 M NaCl. Error

bars represent the 95% confidence interval at p=0.05 between the readings from the four wells corresponding to the same sample.

The dye diffusion inside the cells was very fast since 84 % of maximum fluorescence was reached after only 1.5 min of staining. The fluorescence increased slightly when the staining time was prolonged until it reached a maximum between 4 and 10 min and the fluorescecnce response declined sharply after 12 min of staining (not shown)

In conclusion, it was demonstrated that the optimum staining buffer was 1.0 M TRIS buffer at pH 7.5 containing 1.0 M NaCl and 75 $\mu g \cdot ml^{-1}$ of Hoechst 33258 (for a final dye concentration in the sample of 60 $\mu g \cdot ml^{-1}$) and that the fluorescence readings must be done between 4 and 12 min after the addition of the staining solution to the sample.

6.2.4.2. Linear dynamic range and sensitivity of the microplate counting method

The linear dynamic range of the microplate counting method under optimized test conditions was from 0.2 to 10.0 $\times$ 10^6 $cells \cdot ml^{-1}$ cells (initial cell concentrations in the tested suspension before sample dilution, Fig. 11). Those values correspond respectively to 1.0 $\times$ 10^3 to 50.0 $\times 10^3$ cells within the microplate wells. The excellent sensitivity of the method allowed measurement of cell concentrations as low than 0.2 $\times$ 10^6 $cells \cdot ml^{-1}$ (lowest cell concentration tested). Cell concentrations higher than 10.0 $\times$ 10^6 $cells \cdot ml^{-1}$ showed a non-linear relationship. For a particular sample, the 95 % confidence interval of fluorescence data recorded in the four wells varied between 2.4 to 11.0 %. Those relatively high confidence intervals are most likely due to the difficulty of pipetting clustered plant cells in a reproducible manner. Therefore, at least four independent

readings (from four wells) of the same sample are highly recommended to increase the counting reliability.

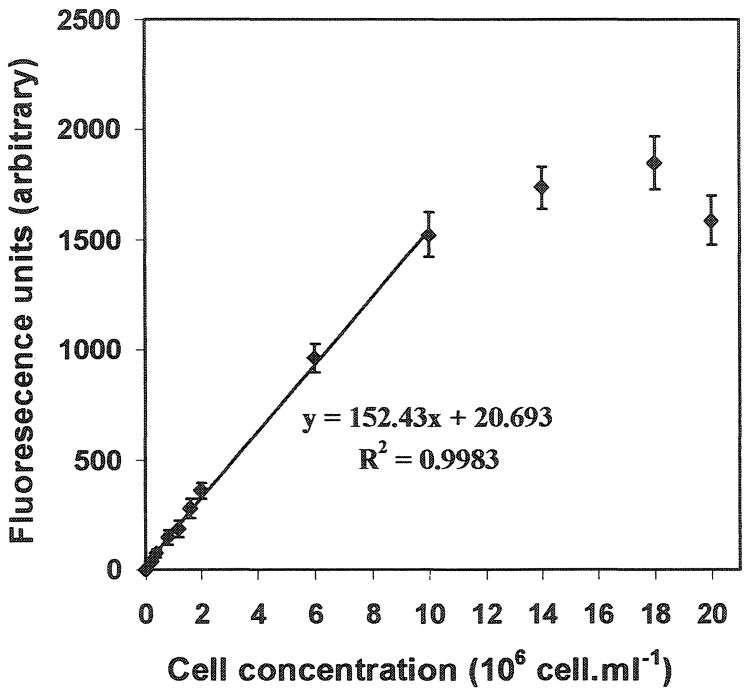


Figure 6.3 : Determination of the linear range of the microplate counting method for EC cells. All assays were conducted in 1 M TRIS buffer pH 7.5 containing 1 M NaCl and 60 $\mu g \cdot ml^{-1}$ of Hoechst 33258. The solid line and the equation refer to the linear regression curve for concentrations ranging from 0.20 to $10.0 \times 10^6 \cdot ml^{-1}$ cells. Error bars represent the 95% confidence interval for the four wells corresponding to a given cell concentration.

6.2.4.3. Accuracy and precision of the microplate counting method

The performance of the microplate counting method was assessed in terms of accuracy and precision. The accuracy was tested by comparing data obtained with the microplate counting method with those obtained with the reference method (microscopic

counting). during the course of a 12-day culture (Fig. 12). The cell concentration measured with the microplate method were very similar to those obtained from the microscopic counting. The relative error between the microscopic and microplate method ranged from 0.9 to 8.5 % except for days 2 and 3 where it was much higher (31.9 % and 15.1 % respectively). This discrepancy was not an artefact since this was replicated during subsequent cultures

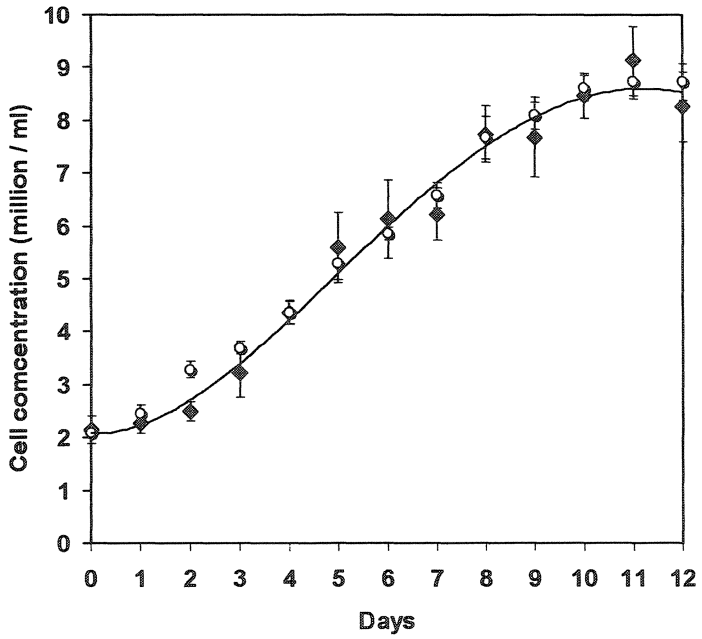


Figure 6.4 : Comparative data obtained using both the microscopic (◇) and microplate counting (○) methods during the course of a 12 days plant cell culture. The solid line represents the polynomial fit obtained for microscopic counting data by the least square method. Error bars represent the standard deviation with n=3.

Standard deviation ranged between 2.5 to 3.2 % for the microplate method compared to 7.4 to 13.1 % for the microscopic methods for counts done on a same aliquot. For counts done on different aliquots withdrawn from the same cell suspension,

standard deviation ranged from 4.7 to 7.8 % and from 8.5 to 14.2 % for the microplate and microscopic methods respectively, showing significantly higher repeatability of the microplate counting method. During the course of the plant cell culture (Fig. 12) the standard deviation between the triplicates analyses ranged from 1.1 to 6.3 % for the microplate technique compared to 5.0 to 14.1 % for the microscopic counting, thus confirming the superior reproducibility of the microplate method.

6.2.4.4. Cell growth monitoring during a 12 days culture in agitated flasks

Eschscholtzia californica cell growth was monitored during the course of a 12 days batch culture in shake flask (fig. 13). Dry weight and fresh weight concentrations were measured along with the cell concentration (using the microplate method). The cell concentration data is obviously not a redundancy of dry and fresh weight measurements. The cell concentration described a nearly linear curve in the first 10 days of the culture while dry and fresh weight concentrations followed a sigmoid with a lag phase in the first two days. The dry weight concentration reached a maximum at day 8 although the cell and fresh weight concentrations continued to increase until day 10 and 12 respectively.

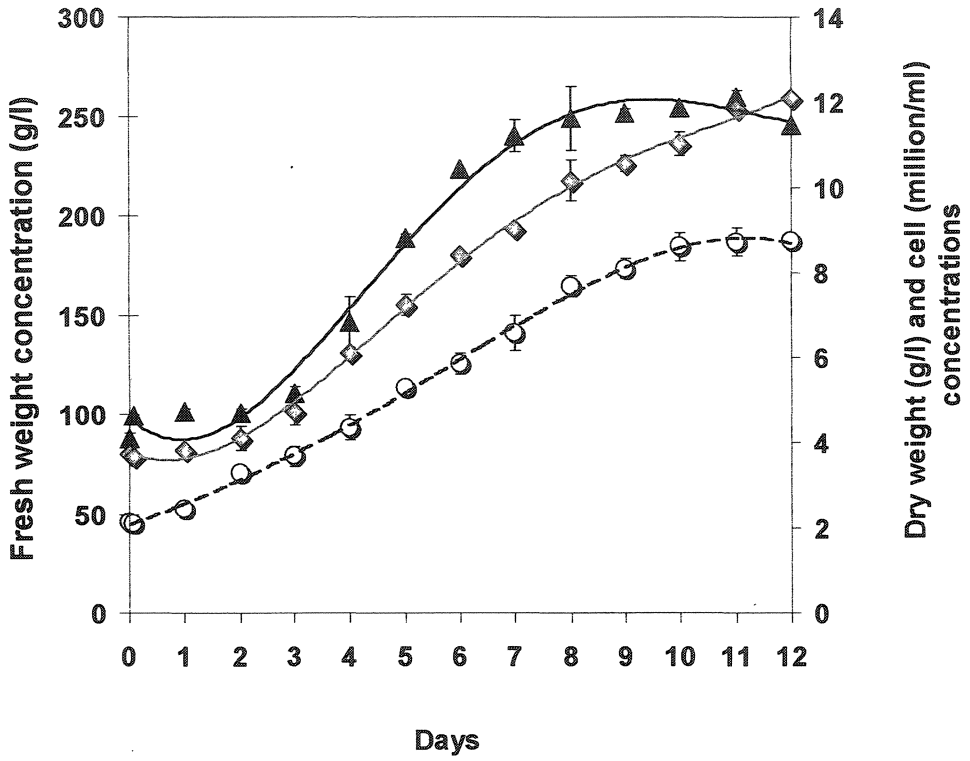


Figure 6.5 : Growth kinetics of cultivated *Eschscholtzia californica* cells during the course of a 12 days plant cell culture. ○ Cell concentration (evaluated with the microplate counting method), ◇ Fresh weight concentration, ▲ Dry weight concentration. Error bars represent the 95 % confidence interval with n=4.

The cells water content and the dry weight per cell were not stable during the culture process (fig. 14). They decreased very rapidly within the first 2 days and presented a bell shape relationship. This indicates that the water and nutrient content of the plant cells change significantly during the culture process.

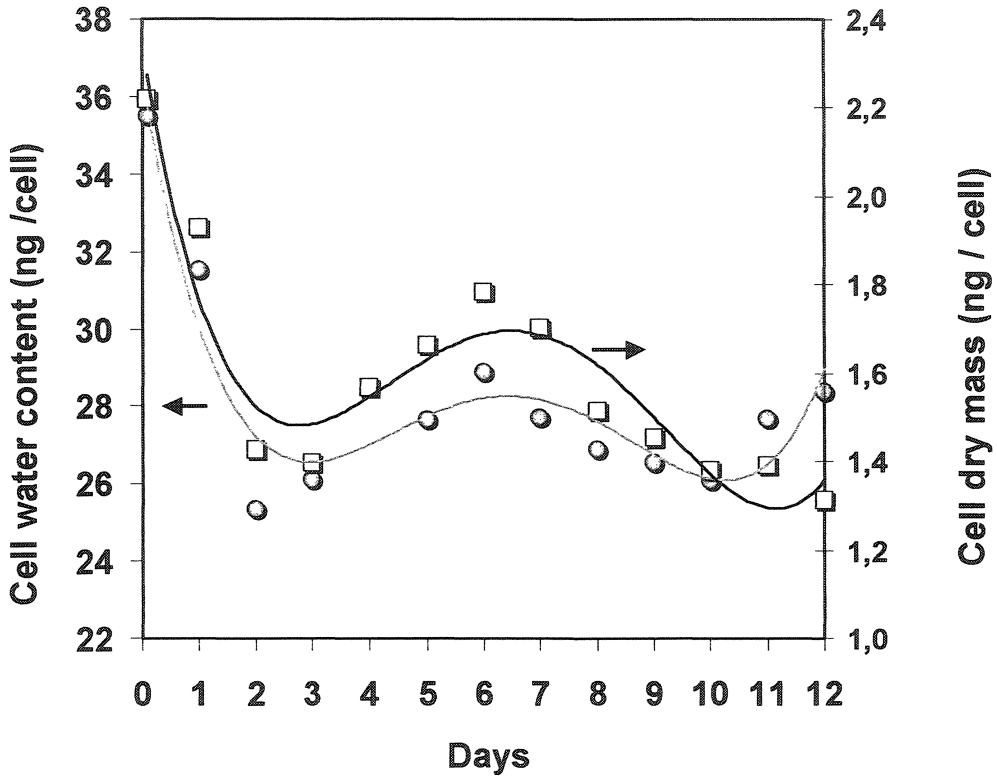


Figure 6.6 : Cell water content (○) and cell dry mass (□) during a 12-day plant cell culture. Solid lines represent the polynomial fit for the corresponding data. Cell concentration has been evaluated using the microplate counting method.

6.2.5. DISCUSSION

Hoechst 33258 (H33258) is a bis-benzimidazole fluorescent dye that exhibits a strong fluorescence enhancement upon binding specifically to A-T rich regions of double stranded DNA (dsDNA). The unbound dye is excited at ~356 nm and emits at ~492 nm, although when bound to dsDNA the dye strongly emits at 458 nm. Since H33258 binds specifically with dsDNA, it allows its quantification in crude samples (Cowell and Franks 1980, Rye et al 1993, Hoemann et al. 2002). However, the dye environment has a strong

effect on the accuracy and precision of the assay because unspecific binding occurs with negatively charged compounds and surfaces (proteins, polysaccharides, glass, polypropylene, etc.) when the staining conditions are sub-optimal (Labarca and Paigen, 1980, Cowell and Franks, 1980). The fluorescence response resulting from this unspecific binding of the dye is 400 times lower than that reported for specific biding with dsDNA (Labarca and Paigen, 1980). Consequently unspecific binding results in decreased fluorescence in the sample and decreased sensitivity of the assay.

In animal cells, Hoechst dye staining in crude samples requires high saline concentrations and neutral pH to make the DNA fully accessible to the dye and to reduce unspecific binding with proteins and polysaccharides (Singer et al., 1997). In plant cells, Hoechst dye has been used to stain nuclei (Laloue et al., 1980, Nicholoso et al., 1994) but also primary cell walls (Laloue et al., 1980, Hernandez and Palmer, 1988), suggesting that nonspecific fluorescence is also a major issue. However, our results showed that specific binding can be favored over unspecific binding when 1.0 M TRIS buffer at pH 7.5 containing 1.0 M NaCl and 75 $\mu g \cdot ml^{-1}$ of Hoechst 33258 (for a final dye concentration in the sample of 60 $\mu g \cdot ml^{-1}$) was used.

Because plant cell microscopic enumeration is a time consuming and tedious process, dry and fresh weight measurements are still greatly preferred over cell enumeration to evaluate cell growth in most studies. However dry and fresh weight concentrations data were clearly not a redundancy of the cell number measurements during the course of the plant cell batch culture (fig 14). The cell water content ranged from 35.5 ng/cell at day 0 to 25.3 ng/cell at day 2 indicating that major water loss occurred during this time due to the marked osmolarity increase in the fresh culture media. Similarly the dry mass per cell is not stable during the culture process. Consequently dry weight and fresh weight measurements are very poor indicators of plant cell proliferation. Several other studies reported that plant cell water content increases when the osmolarity of the culture medium decreases (Taiz, and Zeiger, 1998, Steward et al., 1999). On the contrary, an increase of the medium osmotic potential results in a

decrease of both the water content and the size of plant cells (Ben-hayyim and Kochba, 1983, Binzel et al., 1985, Wang et al., 1999). Cell content analysis perform during our experiments confirmed that intracellular starch and ions are accumulated or consumed during the time course of the culture process thus altering the dry biomass even though cells are not actually dividing (results to be published shortly).

The accurate determination of cell concentration is therefore essential in order to accurately quantify cell proliferation in plant cell culture but a rapid and simple method to enumerate cells is still lacking. The microplate counting method presented in this paper was proven to be a good alternative to microcopic counting. The time needed to perform the microplate counting is about 10 % of that needed for the microscopic counting. Sample preparation and cell enumeration for 18 samples and 6 standards (one 96 well microplate) required less than 30 minutes with the microplate method. Moreover, fixed samples could be stored until further analysis. This is not feasible while performing microscopic enumeration because plant cells must be alive to withstand the enzymatic maceration step. Consequently microscopic counts must be done on fresh living cells on a daily basis. Fewer manipulation steps are involved in the microplate counting method resulting in a higher reproducibility compared to microscopic enumeration. Discrepancies occurring among miscroscopic counts done by different operators are also eliminated.

Nevertheless, the microplate counting method does have some limitations. The method gave significantly higher results compared with the microscopic method in the early exponential phase (Fig. 12). The reason for this difference could be an increased percentage of cells in G2/M phase (cells containing 2 times the "usual" number of chromosomes) at the beginning of the growth period. A similar transient increase in the average DNA content per cell was previously reported during a bioreactor culture of Nicotiana tabacum cells (Nicholoso and al., 1994).

Actually, the microplate counting method is highly sensitive to eventual variations in the cells' DNA content. Consequently, it can only be useful if the average DNA

content per cell is stable during the culture process, i.e. when the cell population divides asynchronically or the ploidy level of the cell population is stable. In animals, the cell DNA and RNA content per cell are typically tightly regulated. However, in plant cells the DNA content per cell may be highly variable because of the high rate of endo-replication (duplication of DNA without the subsequent completion of mitosis and/or cytokinesis). Although endoreplication is usually limited to certain tissues in animals (i.e. liver cells, megakaryocytes and giant trophoblast cells in the placenta) it is a very common process in plants.

Consequently polyploidy is very common in cultured plant cells (Scowcroft et al., 1987) and an increase in the number of polyploid cells is common during early callogenesis (Bennici et al., 1971, Banks-Izes and Polito, 1980). In *Arabidopsis thaliana* high frequency of polyploid cells was reported even after a single week in cultivation (Fras and Malusynska, 2003). However cell chromosome number typically stabilizes after an extended period of subculturing. Consequently long-term cultivated plant cells are often very stable genetically (Schwarzacher et al., 1997, Hao and Deng, 2003) and the microplate counting method can be extensively used to study them.

The microplate method was only tested with a single plant species (non photosynthetic *Eschscholtzia californica* cells). Cell suspensions from different plant species can have different aggregation level, shape and ploidy. For this reason, the method should be assessed with different plant species. However, since the test is based on the DNA content of the cell suspension the cell number, determination by the microplate method should give accurate results with most genetically stable asynchronous plant cell suspensions.

The *Eschscholtzia californica* cells used presented no significant auto-fluorescence with excitation/emission at 360/465 nm. However, several plant secondary metabolites have a significant fluorescence response at those excitation/emission wavelengths (i.e. benzophenantridine alkaloids, etc.). Since the production of secondary metabolites is

often the final goal of in vitro plant cell cultivation, cells auto-fluorescence may interfere with DNA determination after Hoechst staining in certain cases. Moreover, photosynthetic plant cells frequently exhibit a strong natural auto-fluorescence from chlorophyll or other pigments. On the other hand, natural fluorescence can easily be subtracted from the total fluorescence by first measuring the fluorescence of the unstained samples in the microplate before dye addition. Consequently the natural fluorescence can be later subtracted from the total fluorescence of the stained cells to proceed to the DNA determination.

6.2.6. CONCLUSION

Dry weight and fresh weight measurements are poor indicators of plant cell number. However microscopic counting cannot be used for extensive routine analysis since it is very time consuming. The microplate counting method presented in this paper fulfills the need for a rapid and easy way to evaluate cell concentration in plant cell suspensions. It is highly precise, less time consuming than the conventional microscopic method and also has several practical advantages such as the possibility to store the samples for several months at room temperature without affecting either the precision or the accuracy of the count.

However, this technique is only applicable to genetically stable cell lines and asynchronous cell suspensions. The method was only tested with *Eschscholtzia californica* suspended cells, and should be assessed for different suspension cultures with various aggregation and natural fluorescence levels.

6.2.7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their gratitude to the "Chaire CRSNG en bio-assainissement des sols" who allowed the use of their microplate reader. We want also to thank Dr. Sylvain Mandeville for reviewing the manuscript. This research project was founded by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec".

6.2.8. REFERENCES

Amino, S., Fujimura, T. and Komamine, A. (1983). Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of Catharanthus roseus. Physiol Plant, 59:393-396.

Baker, S.S., Rugh, C.L. and Kamalay, J.C. (1990). RNA and DNA isolation from recalcitrant plant tissues. BioTechniques, 9:268–272.

Banks-Izeh, M.S. and Polito, W.B. (1980). Changes in ploidy level in calluses derived from two growth phases of Hedera helix L., the English ivy. P1. Sci. Letters 18:161-167.

Ben-hayyim, G. and Kochba, J. (1983). Aspects of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of Citrus sinensis. Plant Physiol, 72:685-690.

Bennici, A., Buiatti, M., D'Amato, F. and Pagliai, M (1971). Nuclear behaviour in Haplopappus gracilis grown in vitro in different culture media, Coll. Int. CNRS 193, Les cultures de tissus de plantes, 245–253.

Binzel, M.L., Hasegawa, P.M., Handa, A.K. and Bressan, R.A. (1985). Adaptation of tobacco cells to NaCl. Plant Physiol, 78:118-125.

Butcher, D.N. and Street, H.E. (1960). The effect of gibberellins on the growth of excised tomato roots. J Exp Bot, 11:206-216.

Cowell, J.K. and Franks, L.M. (1980). A rapid method for accurate DNA measurements in single cells in situ using a simple microfluorometer and Hoechst 33258 as a quantitative fluorochrome. J Histochem Cytochem, 28:206-210.

Do, N. and Adams, R.P. (1991). A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. BioTechniques, 10:162–166.

Fras A and Maluszynska J (2003). Regeneration of Diploid and Tetraploid Plants of Arabidopsis thaliana via Callus. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 45/2: 145-152.

Gregory, T.R. (2001). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. Biol. Rev. Camb. Philos. So,. 76: 65–101.

Hao, Y.J. and Deng, X.X. (2003). Single-cell-derived sibling lines are established as an experimental system to assess chromosome number variations in embryogenic callus cultures of sweet orange, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73:275 - 280

Hernandez L.F. and Palmer J.H. (1988). Fluorescent staining of primary plant cell walls using bisbenzimide (33258 Hoechst) fluorochrome. Stain Technol, 63:190-192.

Hoemann, C.D., Sun, J., Chrzanowski, V. and Buschmann, D. (2002). A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage. Anal Biochem, 300:1-10.

Kao, K.N. (1982). Staining methods for protoplasts and cells. In: Plant tissue culture methods, 2nd revised edition. Eds: LR Wetter and F Constabel. Published by: National Researh Council of Canada, Saskatoon, Canada. 67-71

Karlsson, S.B. and Vasil, I.K. (1986). Growth, cytology and flow cytometry of embryogenic cell suspension cultures of Panicum maximum Jacq. and Pennisetum purpureum Schum. J Plant Physiol, 123:211-227

Kondorosi, E., Roudier, F., and Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: Growing by ploidy? Curr. Opin. Plant Biol., 3: 488–492.

Kovarick, A. and Fojtova, M. (1999). Estimation of viable cell count after fluorescein diacetate staining using phosphoimager analysis. BioTechniques, 27:685-688

Labarca, C. and Paigen, K. (1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Anal Biochem, 102:344-352

Laloue, M., Courtois, D. and Manigauld P. (1980). Convenient and rapid fluorescence staining of plant cell nuclei with "33258" Hoechst. Plant Sci Lett, 17:175-179

Lamboursain, L., St-Onge, F., Jolicoeur, M. (2002). A Lab-Built Respirometer for Plant and Animal Cell Culture. Biotechnol Progr, 18:1377-1386.

Newbury, H.J. and Possingham, J.V. (1977). Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds. Plant Physiol, 60:543–547.

Nicholoso, F.T., Val, J., Van der Keur, M., Van Iren, F. and Kijne, J. (1994). Flow cytometric cell counting and DNA estimation for the study of plant cell population dynamics. Plant Cell Tiss Cult, 39:251-259.

Nurse, P. (1985). The genetic control of cell volume. In The Evolution of Genome Size, T. Cavalier-Smith, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons), 185–196.

Rago R, Mitchen J, Wilding G. (1990). DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by cell lysis by freezing in distilled water Anal Biochem.; 191:31–34.

Rye, HS, Dabora, JM, Quesada, MA, Mathies, RA and Glazer, AN (1993). Fluorometric Assay Using Dimeric Dyes for Double- and Single-Stranded DNA and RNA with Picogram Sensitivity. Anal Biochem, 213:144-150.

Schwarzacher, T., Wang, M.L., Leitch, A.R., Mille, N., Moore, G., Heslop-Harrison, J.S. (1997). Flow cytometric analysis of the chromosomes and stability of a wheat cell culture line. Theor.Appl.Genet. 94: 91-97.

Scowcroft, W.R., Brettell, R.I.S., Ryan, S.A., Davies, P.A. and Pallotta, M.A. 1987. Somaclonal variation and genomic flux. In: Plant Tissue and Cell Culture, Plant Biology Vol. 3, Eds C.E.Green, D.A.Somers, W.P.Hackett and D.D.Biesboer, ARL, New York, 275-286.

Singer VL, Jones LJ, Yue ST and Haugland, RP (1997). Characterization Of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. Anal Biochem, 249:228-238.

Steward, N, Martin, R, Engasser, JM and Goergen, JL (1999). Determination of growth and lysis kinetics in plant cell suspension cultures from the measurement of esterase release. Biotechnol Bioeng, 66:114-121.

Taiz, L and Zeiger, E (2002). Plant Physiology, 2nd edition, Sinauer Associates, Sinderland, Massachusetts.

Vankova, R, Kunkova, G, Opatrna, J, Sussenbekova, H, Gaudinova, A and Vanek, T (2001). Two dimensional spectroscopy – A new tool for the determination of plant cell viability. Plant Cell Reports, 20:41-47.

Von Aderkas, P., Pattanavibool, R., Hristoforoglu, K. and Ma, Y. (2003) Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte cultures of larch. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 75: 27-34.

Wang , HL, Lee, PD, Liu, LF and Su, JC (1999). Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. Bot Bull Acad Sin, 40:219-225.

CHAPITRE 7. INFLUENCE DU STATUT NUTRITIONEL DES CELLULES D'*ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA* SUR LEUR CAPACITÉ À PRODUIRE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES

7.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Après avoir mis au point les méthodes et techniques nous permettant de caractériser l'état physiologique et nutritionnel de nos cellules, nous avons ensuite cherché à mettre en évidence d'éventuels liens entre la croissance, la production de métabolites secondaire et le statut nutritionnel de ces cellules.

Dans un premier temps nous avons évalué l'impact d'une modification à long terme de la composition du milieu de culture sur la croissance et la production d'alcaloïdes chez EC. Les cellules ont donc été cultivées à long terme dans 3 milieux de culture ayant des concentrations en nitrate et phosphate différentes. Les 3 suspensions cellulaires (suspension 1, 2 et 3 cultivées sur le milieu 1, 2 et 3 respectivement) obtenues ont ensuite et caractérisées lors de la durée d'une sub-culture. La croissance, l'évolution de la composition du milieu de culture, l'accumulation des différents nutriments dans la biomasse ainsi que la capacité à produire des alcaloïdes ont été mesurées pour les 3 suspensions afin de dégager d'éventuels liens entre les différents paramètres (résultats présentés dans l'article en ce qui concerne CS3 et en annexe 4 et 5 pour CS1 et CS2 respectivement).

A notre connaissance c'est la première fois qu'une étude de fond est menée sur l'impact stockage nutritionnel sur la production de molécules d'intérêt chez les cellules de plante cultivée *in vitro*. Ce travail a clairement démontré que les concentrations intra-cellulaires en nutriments ont un impact énorme sur la production de métabolites

secondaires. La gestion de ces concentrations intra-cellulaires pourraient être la clef menant vers une meilleure reproductibilité en culture de cellules de plantes.

7.2. CRITICAL INFLUENCE OF INTERNAL NUTRIENT CONCENTRATION ON SECONDARY METABOLITE PRODUCTION IN CULTIVATED ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA CELLS.

Critical influence of *Eschscholtzia californica* cells nutritional state on secondary metabolites production

*Laurence Lamboursain and Mario Jolicoeur**

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools

Department of Chemical Engineering, Biopro Research Centre, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Centre-ville Station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

Laurence.lamboursain@polymtl.ca

Corresponding author: Prof. Mario Jolicoeur, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079 Centre-ville Station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7, Phone: 514-340-4711 ext. 4525, Fax: 514-340-4159, E-mail: mario.jolicoeur@ polymtl.ca

7.2.1. ABSTRACT

Highly contradictory results have been reported concerning the effect of culture medium composition on secondary metabolites production in cultivated plant cells. However, plant cells can accumulate high concentrations of nutrients internally and this overlooked nutrient source may have buffered the effects of medium alterations on secondary metabolism. In this study we investigated the influence of internal nutrient concentrations on the ability of *Eschscholtzia californica* (EC) cells to produce alkaloids. EC cells were cultivated on a long-term basis in three different culture media differing in their PO_4^{3-} and NO_3^- content. Extracellular as well as intracellular nutrients concentrations were monitored as well as growth kinetics and alkaloid production ability. In the low NO_3^- medium, starch, glucose and phosphate content in the biomass 10 days after inoculation was increased by 470, 1624 and 70 % respectively compared to the control cells grown in B5 medium (high NO_3^-). Cell concentration was significantly reduced from 10.3 to 8.6 millions cell·ml^{-1} on this low-N medium compared to the control although alkaloid production was multiplied by 39 when cells were elicited. N- and P-limited cells accumulated 83 and 188 % more carbon than control cells after 10 days. This intracellular C was mainly stored in the form of starch in P-limited cells and in the form of glucose in N-limited cells. In both N- and P-limited cells, alkaloid production was shown to be strongly dependent on the intracellular glucose and phosphate concentrations at elicitation time.

7.2.2. INTRODUCTION

Plant secondary metabolites represent an important source of bioactive compounds and are widely present in the human pharmacopoeia. In recent years, the demand for high value phytochemicals has increased dramatically and *in vitro* cell culture has been of great interest as a potential supply. As opposed to plants growing in open fields that are

subjected to erratic culture conditions, *in vitro* grown cells are cultivated in a precisely controlled environment that can be optimized to favor valuable molecules production. Consequently plant cell culture ensure for a high quality product with low purification costs, as well as making the supply totally independent from climate, weather, seed germination rates, diseases or pests.

A considerable amount of research has been done in the past decades to produce phytochemicals from *in vitro* cultivated plant cells. However, bioprocesses using plant cells are seldom economically viable due to the low and unreliable production yields obtained. Undifferentiated cell cultures often do not produce the desired metabolites in sufficient quantity or vary in their production ability during long-term culture (Zenk et al., 1977, Deus-Neumann and Zenk, 1984, Whitmer et al., 2003). The phytomolecules obtained from cultivated plant cells may also be completely different from those extracted from whole plants. This poor reproducibility from batch to batch in the quantity as well as in the quality of the produced secondary metabolites (SM) makes it very difficult to fulfill the requirements of the governmental agencies regulating the pharmaceutical industry.

Medium optimization was shown as a successful route to increase productivity in microbial cells culture. This strategy amongst others was also attempted with plant cells but with more ambiguous results. Several publications have shown that medium composition strongly influences cell growth and secondary metabolites production. It was observed that varying nitrate, ammonium, phosphate and carbohydrate concentration in the proliferation and/or production medium have a direct effect on the production yields of various plant cell lines (Zenk et al., 1977, Dicosmo and Towers, 1984). However, it was impossible to obtain general trends on the influence of medium composition on SM production since those studies were often highly contradictory. In the case of cultivated *Catharanthus roseus* cells for example, an increase in the medium phosphate concentration has been reported to increase alkaloid production (Carew and Krueger, 1977). On the other hand, other studies reported that a reduction of the medium

phosphate concentration increased SM production for the same specie (Knobloch et al., 1982, Knobloch et al., 1980). Another publication even demonstrates that the Pi concentration alteration did not affect the production level in *Catharanthus roseus* cells (Doller 1978). Those contradictory results are recurrent in medium optimization studies in plant cell culture and can be documented for nitrate and carbohydrate concentrations alterations as well (Dicosmo and Towers, 1984).

Consequently, a clear relationship between either nutrients availability or utilization and secondary metabolism is still lacking. On the other hand plant cells do not rely only on the external nutrients available at a given time since they can accumulate large amount of nutrient internally. Those intracellular nutrient pools have been largely overlooked in most studies on plant cells but must be taken into account to evaluate accurately cells nutritional status. The aim of this study was to investigate the influence of intracellular nutrient concentrations on the alkaloid production ability in a long-term suspension culture of *Eshscholtzia californica* (EC) cells. Growth kinetics, alkaloid production, nutrients uptake and nutrient accumulation rate were studied in three different culture media differing in their PO_4^{3-} and NO_3^- content. In addition, EC cells were subjected to various medium alterations during the culture process to investigate the effect on internal nutrient reserves and SM production. Results showed that intracellular nutrient concentrations were intimately linked to SM production in EC cells.

7.2.3. MATERIAL AND METHODS

All experiments were performed at (25 ± 2)°C under normal laboratory light condition, unless specified differently.

7.2.3.1. Plant cell line, cultivation conditions and Media composition

Plant cell calluses were obtained as described in Lamboursain et al. (2002). The cell suspension was sub-cultured when the packed cell volume after 5 minutes of natural sedimentation reached 70-80 % of the total volume (i.e. every 10 to 15 days). The suspension (80 g) was transferred into a 500 ml Erlenmeyer flask containing 160 g of liquid medium (composition described in table 1 – voir dans materiel et méthodes). Flasks were closed with a double layer of aluminum foil and placed on an orbital shaker at 120 rpm. Cells were maintained in three different media on a long-term basis to obtain 3 inocula with different nutritional status. All media were autoclaved 25 minutes at 121°C.

7.2.3.2. Suspension sampling, Fresh and dry weight measurements, Cell concentration

Suspension sampling, fresh weight concentration, dry weight concentration and cell concentration measurements (by the microplate method) were done as described by Lamboursain and Jolicoeur (2004).

7.2.3.3. Cell freezing and freeze-drying

Plant cells were rapidly rinsed four times under vacuum aspiration with 50 ml of de-ionized water. The rinsed fresh cells (0.8 to 3.0 g) were immediately frozen in 50 ml of liquid nitrogen in a ceramic mortar. The frozen cells were then ground to a powder with a cold pestle and stored at -80°C until lyophilization. Cells were freeze-dried for 8 hours and stored at 6°C in a dessicator until required.

7.2.3.4. Major ions concentration in culture media

Immediately after sampling, the cell suspension was filtered through a 0.2 µm nitrocellulose filter. The culture medium was frozen at -18°C until further analysis. Major anions (NO_3^-, PO_4^{3-}, Cl^-, SO_4^{2-}) and cations (Ca^{2+}, K^+, Na^+, Mg^{2+}) were analyzed using a Dionex HPLC system (Dionex Canada Ltd, Oakville, Canada) equipped with a pulse electrochemical detector CD20 in conductivity mode. Anions were separated using a 4 x 250 mm IONPAC AS-14 column (Dionex, Cat. #_046124) and an ASRS-ultra anion suppressor (Dionex, Cat. #_061561). The mobile phase consisted of a bicarbonate buffer solution (2 mM Na_2CO_3 and 1 mM $NaHCO_3$) flowing at 1.0 $mL.min^{-1}$. Cations were separated using a 4 x 250 mm IONPAC CS-12A column (Dionex, Cat. # 046073) and a CSRS-ultra cation suppressor (Dionex, Cat. #_053948). The mobile phase consisted of a methanesulfonic solution (20 mM) flowing at a 0.9 $mL.min^{-1}$. A concentration-peak height calibration curve was constructed for each ion and concentrations in the samples were calculated by intrapolation within those curves.

7.2.3.5. Intracellular ions extraction and analysis

Freeze-dried cells (~ 20 mg) were homogenized in 1 ml of 5 % cold trichloroacetic acid (TCA) in a chilled Potter-type homogenizer (100 µm of clearance, frosted glass pestle, Bellco glass inc., Cat. # 1983-10019). The homogenate was centrifuged for 5 minutes at 16 000 × g and the pellet was re-extracted twice with 1 ml of 5 % TCA. All supernatants

were pooled and used for the intracellular ions determination. Intracellular anions and cations were analyzed by ionic chromatography as described in the "*Medium analysis*" section. However, during anion analysis, a wash cycle was required after every three samples in order to remove the excess TCA from the HPLC column.

7.2.3.6. Intracellular soluble sugars extraction and analysis

Freeze-dried cells (~ 20 mg) were homogenized in 1 ml of 95 % EtOH in a Potter-type homogenizer (100 µm of clearance, frosted glass pestle, Bellco glass inc., Cat. # 1983-10019). The homogenate was centrifuged for 5 minutes at 16 000 × g and the pellet was re-extracted twice with 1 ml of 80 % EtOH. Ethanolic supernatants were pooled and used for glucose, fructose and sucrose determination. The residual pellet was used to determine the starch content (refer to starch content determination).

The ethanolic extract (1 ml) was filtered though a 0.2 µm nylon membrane filter (Millipore, Billerica, Massachusets) and evaporated to dryness at 40°C under N_2. The sample was re-suspended in 200 µl of ACN:MeOH (4:1) and injected in a HPLC system (Beckman Coulter Canada Inc, Mississauga, Canada. Pump model 126, automatic injector model 508) equipped with a Gilson model 132 refractive index detector. Carbohydrates were separated using a Prevail carbohydrates ES column (4 × 250 mm, Alltech associates, Deerfield, USA, Cat. # 35101) heated at 40°C using ACN:MeOH (4:1) as the mobile phase at 1 $ml.min^{-1}$.

7.2.3.7. Starch content determination

The cell pellet obtained from the soluble sugars extraction was re-suspended in 1 ml de-ionized water and sterilized at 121°C for 15 minutes at the same time than a starch solution (6 $g \cdot l^{-1}$ in de-ionized water). Samples were allowed to reach room temperature and their volume was readjusted to 1 ml with de-ionized water if necessary. Starch

calibration standards from 0 to 6 $g \cdot l^{-1}$ were prepared by serial dilutions of the starch solution in de-ionized water. Calibration standards and samples were diluted 1:1 with an amyloglucosidase solution (Sigma St-Louis Missouri, Cat. # S9144) and incubated for 15 min. in an ultrasound bath at 60°C. Samples and standards were centrifuged for 10 minutes at 16 000 × g. A 10 µL aliquot of the supernatant was directly transferred into a spectrometric cuvette with 500 µL of "Glucose Infinity" reagent (Sigma, Cat. # 17-25). After incubation (15 min.) at room temperature, 500 µL of 100 mM KH_2PO_4 buffer pH 7.5 was added followed by spectrophotometric reading at 340 nm.

7.2.3.8. Total P, total C and Kjeldhal Nitrogen content

Total P, total C and Kjeldhal Nitrogen content were determined in the freeze-dried samples in triplicate. The total phosphorus content was determined using the Lachat method (Standard Operating Procedure for Total and Dissolved Phosphorous, Revision 1, Grace Analytical Lab, 536 South Clark Street, Floor Chicago, IL 60605). The carbon content was determined by burning a known amount of lyophilized cells (1.0 to 1.8 mg) at 1000°C in an elemental analyzer (Carlo Erba, EA1108). The gases generated were completely oxidized to CO_2 that was quantified with a thermal conductivity detector (Method 972.43. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition (1997), AOAC International, Arlington, VA). Cells' total reduced nitrogen content was determined using a micro Kjeldahl procedure with sulfuric acid digestion as described by Isaac and Johnson (1976).

7.2.3.9. Elicitability test

More than 30 different alkaloids have been identified in EC cells extract. However, quantitative analysis of individual alkaloids is complex due to the lack of commercially available standards. The aim of the elicitability test was to evaluate the global alkaloid production capacity of the cells. For this purpose cells were transferred in a production

medium and elicited. A polymeric extractive resin was used to maximize production as described (Archambault et al., 1996). Crude chitin (Sigma-Aldrich, Cat. # C4666) was reduced in fine powder and sieved on a 104 μm polypropylene filter (Spectra mesh, Cole-Parmer, Cat. # U-06630-52). Particles ≤ 104 μm were suspended in de-ionized water (20g l^{-1}) and autoclaved at 121°C for 1 hour. The chitin suspension was filtered under vacuum on two layers of Miracloth filter paper (Calbiochem Corporation, La Jolla, CA, USA, cat. # 475855) to generate a crude chitin extract.

Plant cells were filtered under sterile conditions on a 104 μm polypropylene filter (Spectra mesh, Cole-Parmer, Cat. # U-06630-52) and weighed (3.0 ± 0.2 g) in triplicate 75 ml Erlenmeyer flask containing 10 ml of production medium (composition indicated in table 1), 2 ml of crude chitin extract and (2.0 ± 0.1) g of wet XAD-7 resin (Amberlite resin, Sigma-Aldrich, Cat. # XAD7). Flasks were closed with a double aluminium foil and placed on an orbital shaker at 120 rpm. After 7 days, the culture medium was discarded and the remaining cells and resin was extracted 3 times with 20 ml of acidified MeOH (0.5% HCl). The total alkaloid content was measured by fluorescence (330/420 nm) in a fluorescence detector (Jasco, Model FP-1520). To quantify the total alkaloid concentration in the extracts, a calibration standard was prepared by pooling several cells and resin extracts. This extract was concentrated 10 times and sodium dodecyl sulfate (2.0 %) was added. The solution was extracted 3 times with $CHCl_3$ (50 ml ×3) and evaporated until dryness under vacuum at 40°C (modified from Fabre et al., 2000). The semi-purified alkaloids were re-suspended in 10 ml n-heptane sulfonic acid (50 mM) and extracted on a SPE C_{18} cartridge as described in Chauret et al., 1990. The alkaloids were recovered in MeOH, dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated under vacuum at 40C until dryness. The residue (total alkaloids) was precisely weighed to obtain the alkaloid titer for the calibration standard. A calibration curve was generated from serial dilution of the calibration standard.

7.2.3.10. Respirometric measurements

The oxygen uptake rate (OUR) of the cells was assessed in a custom built respirometer as described by Lamboursain et al. (2002).

7.2.3.11. Vacuolar phosphate concentration determination by in Vivo ^{31}P-NMR

In Vivo ^{31}P-NMR Spectra were recorded on a 400 MHz spectrometer (Varian Unity INOVA 400) equipped with a multinuclear 10-mm probe tuned at 161.9 MHz. A thin walled 10 mm NMR tube was modified to allow the continuous perfusion of plant cells with aerated culture medium. The experimental arrangement was derived from Roby et al. (1987). Cells (0.6 g wet weight) were introduced in a 5 cm high Teflon insert (cut from a PTFE / FEP liner, 9.0 mm external diameter, Wilmad labGlass, Buena, USA, Cat. # 6010) equipped with a geotextile fabric plug at the bottom (non-woven hydrophilic polypropylene geotextile fabric). The culture media entered the top of the insert through a PEEK tubing (HPLC tubing, 1/8" OD, 0.062" ID, Alltech associates, Deerfield, USA, Cat. # 35809). Cells were gently pushed onto the geotextile plug thus forming a 3 cm high packed cell bed in the NMR detection zone. The culture medium was forced through the cells bed and the geotextile plug and then evacuated along the tube sides. It was then withdrawn from the top of the NMR tube with a PEEK tubing. A high precision multi-head peristaltic pump circulated the perfusion medium (200 ml of Mannitol 30 g l^{-1} supplemented with 30 mM KCl and 10 % D_2O to lock the NMR signal) at 3 ml $minute^{-1}$ through the NMR tube and back to the 500-mL reservoir where it was continuously bubbled with air. Cells were transferred in the NMR tube and perfused during 30 minutes prior to the NMR measurement.

Conditions for ^{31}P-NMR acquisition utilized 20µs pulses (70°C) at 1s intervals, an acquisition time of 0.6s and a sweep width of 6 kHz. 1200 spectra were acquired (30 minutes). The signal was digitized at 4,000 data points zero-filled to 8,000 and processed

with a 2-Hz line broadening. Spectra were referenced to H_3PO_4 85 % prior and after measurements.

7.2.4. RESULTS AND DISCUSSION

7.2.4.1. Medium Composition Affects Cells Nutritional State

A long-term suspension of *Eschscholtzia californica* cells was grown on three culture media differing in their phosphate and nitrate concentrations (Table 1). After 10 days, the 3 cells suspensions were assessed for cell growth, elicitability and cell composition (Table 5 and 6). Total alkaloid production upon elicitation (elicitability) was significantly different in the 3 cells suspensions. Cells grown on the low phosphorus medium (CS2) produced 9 times more alkaloids than control cells (CS1). The most significant result was obtained with the low nitrate cells (CS3) where alkaloid production was increased by 39 times compared to the control.

The low availability in nitrogen and phosphorus in the culture medium significantly reduced plant cell growth in CS2 and CS3 (reduced fresh weigh and cell concentrations compared to CS1). However, the dry weight concentration (DW) in CS3 was higher than in the two other cell suspensions. CS3 cells weighed 36 % more than control cells indicating that nutrient and water accumulation was significantly higher in N-limited cells. Microscopic examination revealed that CS3 cells were highly vacuolated and contained more amyloplasts than control cells. This was further confirmed by the biomass composition analysis (table 6) where CS3 cells contained more starch, glucose and their total carbon concentration was 188 % and 83 % higher than in CS1 and CS2 respectively. In addition, they contained significantly more phosphorus than CS1 and CS2 cells. Conversely, cells grown with a reduced PO_4^{3-} concentration (CS2) contained more Kjeldahl nitrogen (N^K: reduced nitrogen from proteins, amino-acids, NH_4^+, etc.) in comparison to the two other cell suspensions. P- and N-limited cells had a significantly

lower respiration activity than control cells as indicated by their decreased specific oxygen uptake rate (q_{O2} reduced by 22 and 36 % in CS2 and CS3 respectively compared to control cells, Table 5).

Nutritionally restricted EC cells accumulated significant amounts of nutrients available from the culture medium. P-limited cells accumulated more C and N than control cells (grown in unmodified B5 medium) whereas N-limited cells accumulated more C and P. Since fewer cells were formed during the culture process in P- and N-restricted cells, more C-skeletons were re-allocated in internal reserves. This is in accordance with the higher cell mass of CS3 cells compared to control cells (CS1). The dry weight concentration increase in CS3 was obviously linked to the buildup of intracellular reserves rather than cell division. However, less C was accumulated in P-limited cells compared to N-limited cells because of a decrease in glucose uptake rate in CS2. Glucose concentration in the culture medium was still 66 mM at day 10 in CS2 - results not shown - whereas glucose was completely depleted from the medium in CS3 at day 11 (Fig. 15-C).

Table 7.1 : Characteristics of the 3 cell suspensions 10 days after inoculation.

	CS1 (control)	*CS2*	*CS3*
Culture Medium	*Medium 1*[a]	*Medium 2*[a]	*Medium 3*[a]
Fresh weight *($g.l^{-1}$)*	296.8 ± 30.1	182.3 ± 4.9	236.2 ± 3.9
Dry weight *($g.l^{-1}$)*	10.5 ± 0.8	7.3 ± 0.3	11.9 ± 0.1
Cell conc. *(10^6 cell.ml^{-1})*	10.3 ± 0.9	7.2 ± 0.7	8.6 ± 0.7
Cell mass *(mg DW·(10^6 cells)$^{-1}$)*	1.019 ± 0.079	1.014 ± 0.082	1.384 ± 0.098
OUR ($mM\ O_2.h^{-1}$)	2.27 ± 0.4	1.22 ± 0.2	1.22 ± 0.03
q_{O2} *(mmole O_2.(10^9 cells)$^{-1}$·h^{-1})*	0.221 ± 0.005	0.173 ± 0.004	0.145 ± 0.003
Alkaloid prod. *($mg.g^{-1}$ DW)*	80 ± 4	345 ± 9	3163 ± 426
(mg.(10^6 cells)$^{-1}$)	0.08 ± 0.00	0.35 ± 0.01	4.37 ± 0.53

[a]: see table 1. ± values represent standard deviation data for n=3

7.2.4.2. Analysis of Nutrients Accumulation in EC Cells

Kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, nutrient accumulation and SM production in CS3 cells are presented in Figures 15 and 16.

Table 7.2 : Cells composition 10 days after subculture.

	CS1 (control)	*CS2*	*CS3*
Kjeldahl N *(mmole.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)*	2.8 ± 0.04	3.2 ± 0.05	1.6 ± 0.03
Intracellular NO_3^- *(μmole.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)*	17.3 ± 6.3	15.7 ± 5.6	1.5 ± 1.1
Intracellular NH_4^+ *(μmole.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)*	71.6 ± 5.4	62.6 ± 4.2	2.2 ± 1.7
Total P *(mmole.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)*	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Intracellular PO_4^{3-} *(μmole.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)*	21.4 ± 1.5	21.7 ± 1.9	36.4 ± 1.3
Total C *(mmole.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)*	15.3 ± 2.5	28.0 ± 4.05	44.1 ± 8.0
Intracellular Glucose *(μmole.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)*	126.4 ± 19.6	347.8 ± 30.6	2179.4 ± 454.2
Intracellular Starch *(μmole ep. Glc.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)*	66.3 ± 8.8	357.9 ± 63.7	377.8 ± 58.3
Intracellular malate (μmole.(10 ^{9} cells)$^{-1}$)	307.9 ± 8.2	294.0 ± 7.8	117.6 ± 14.6

± values represent standard deviation data for n=3

Cells elicitability varied greatly during the culture. The production in the CS3 elicited flasks was stable at about 1 mg·$(10^6$·cell$)^{-1}$ for the first 4 days and then increased to reach a maximum 9 days after inoculation (5.13 mg·$(10^6$·cell$)^{-1}$, Fig. 15-B). NH_4^+, NO_3^- and

PO_4^{3-} were up taken very rapidly from the culture medium and were almost completely consumed after 2 days (Fig. 15-D).

However, cell division continued until day 10 in a completely depleted medium. EC cells accumulated NH_4^+, NO_3^- and PO_4^{3-} internally for the first 2 days of the culture (Fig. 16-B and 16-C). The internal nitrate reserve was then progressively depleted from day 2 to 5 to sustain cells growth and metabolic activity (Fig. 16-B). Cell N^K concentration was initially very low in CS3 compared to the two other cell suspensions (table 6). Due to the low nitrate concentration in the culture medium, CS3 cells had no N-reserves at the end of the culture. Consequently, final cells N^K concentration (1.5 mmole·$(10^9$ cell$)^{-1}$ represents constitutive reduced nitrogen only. N^K concentration increased in the first two days following inoculation in the fresh medium and remained higher than the constitutive level until day 9. Since NH_4^+ and NO_3^- internal concentrations were either low or exhausted after day 5, non-constitutive proteins and amino acids were the only N-source available to allow cell division between day 5 and 9.

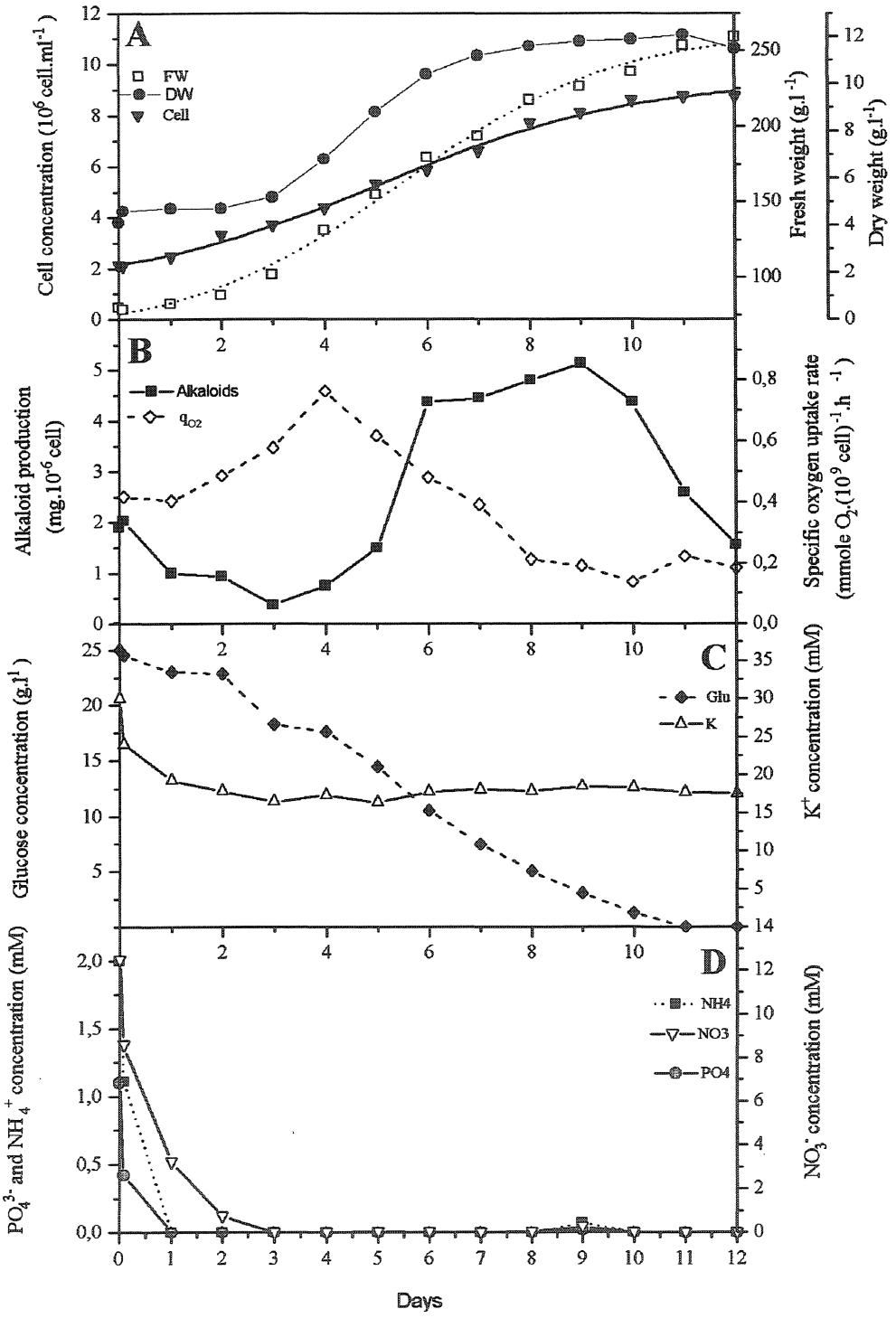


Figure 7.1 : Growth, elicitability and medium nutrient concentrations in CS3 during a 12 days culture. Each data point represents the average value obtained from

triplicate flasks. Sampling was destructive, meaning that a whole 500 ml flask was used to perform complete analysis.

Intracellular inorganic phosphate (Pi) and total P content increased initially (first two days) and were subsequently consumed until day 9 (Fig. 16-C). In vivo P^{31}NMR data revealed that this intracellular Pi was mainly localized in the vacuole. The plant cell vacuole was totally depleted in Pi after 4.2 days (Fig. 17) indicating that the internal Pi decrease observed from day 5 to 9 was from another Pi-pool or not quantifiable by liquid NMR (i.e. solid deposits of phosphorus salts). Total P and Pi content at day 10 were significantly higher in CS3 cells compared to CS1 and CS2 cells (table 6).

Cells' starch and carbon content were high in CS3 compared to control cells and remains stable throughout the culture process (Fig. 16-D), indicating that cells C-sinks were full from the onset and were not used during the culture process. Since internal C-reserves were not altered during the culture, extracellular glucose uptake was the preferred source of C-skeleton to sustain growth in nitrate-limited cells. Several studies on whole plants showed a strong correlation between P and N limitation and carbohydrate accumulation. In N or P-restricted plants, carbohydrates accumulation occurs within hours of the deficiency initiation. Plant starch content as well as internal hexose and sucrose concentrations were higher in N and P-deprived plants (Paul and Stitt, 1993, Sun et al., 2002).

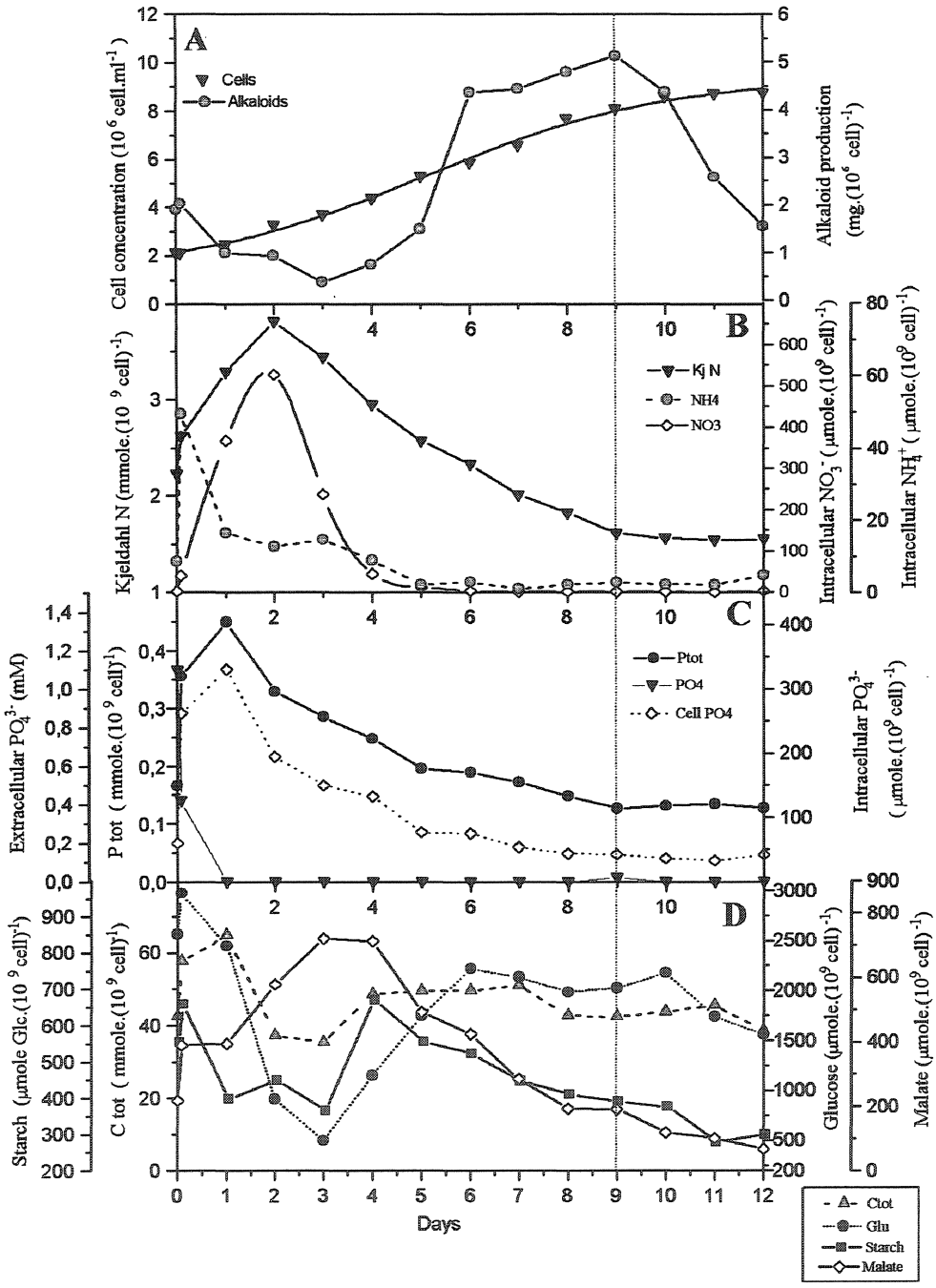


Figure 7.2 : Growth kinetics, elicitability and intracellular nutrient concentrations in CS3 during a 12 days culture. Each data point represents the average value obtained

from triplicate flasks. Sampling was destructive, meaning that a whole 500 ml flask was used to perform complete analysis.

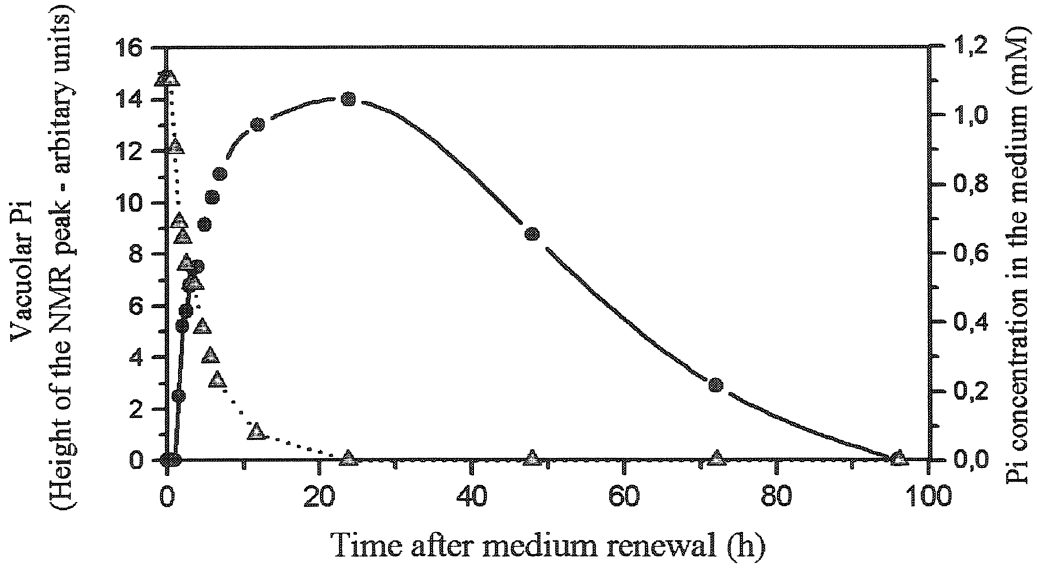


Figure 7.3: Vacuolar phosphate concentration in CS3 cells as measured by in vivo NMR

Accumulation of malate occurred during the first three days (time of NO_3^- depletion from the culture medium) and intracellular malate concentration subsequently decreased until the 12th day. It is now well established that nitrate uptake leads to a stimulation of organic acids synthesis in plants through a direct increase in phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPc) activity (Murchie et al, 2000b and references therein). Scheible et al. (2000) suggested that the malate synthesis serve mainly to balance the cytoplamic alkalinization occurring during nitrate assimilation into NH_4^+. Malate production also serves as a source of c-skeletons needed by GS/GOGAT to assimilate N in the organic form (Hodges 2002). Intracellular glucose concentration was low during the first five

days and followed a perfect opposite relationship with malate concentration kinetics, suggesting that a significant amount of C-skeleton were deviated into anapleurotic CO_2 fixation until all nitrate sources were exhausted.

7.2.4.3. Cells Elicitability is Correlated to Intracellular Glucose and Phosphate Concentrations

Maximum elicitability in CS3 was achieved at the end of the growth phase (at day 9). However, in CS1 and CS2 maximum elicitability was achieved at day 2 and 3 respectively (early beginning of the growth phase - not shown). Numerous studies reported an increased SM production level just before or at the end of the growth phase in cultivated plant cells (Berlin 1988, Blom 1991, Collin 1987, Nash and Davies 1972, Van Gulik 1990). This inverse relationship between growth rate and SM production has been mainly attributed to differences in cells differentiation state. Slow growing cells are often thought to be more differentiated and more able to produce secondary metabolites than slow growing ones. In carrot suspension culture for example, anthocyanin production declined with increasing specific growth rate (Dougall and Weirauch, 1980). In the same way, there are numerous reports in the literature of nutrient stress resulting in reduced cell growth and enhanced secondary metabolism (Dougall et Weyrauch, 1980, Collin 1987).

However our results indicate that differentiation is probably not in cause in this process. During our experiments, lower cell concentration in P- and N-limited cells was also correlated with higher production capacity at day 10, but this was in our case strongly correlated to their higher nutrient content compared to control cells. Intracellular nutrient analysis revealed that elicitability was strongly correlated with intracellular glucose concentration in both CS2 and CS3 (Fig.18 – intracellular glucose was not monitored in CS1 for comparison). The elicitability followed closely the evolution of cellular glucose concentration in both cases. The maximum production level in CS3 compared to CS2

(5.13 and 0.73 mg.$(10^6$ cell$)^{-1}$ respectively) was also correlated with a nearly 3 times higher intracellular glucose concentration.

In N- and P-limited cells, fewer cells were formed during the culture process due to nutritional limitation. This resulted in a decreased demand in C-skeleton for primary metabolism and allowed a re-allocation of C-resources in internal reserves. Consequently, N- and P-deprived cells disposed of a readily available source of C-skeleton for SM synthesis when they were elicited. In the case of CS3, C was mostly accumulated in the form of glucose. The 40 % higher internal P concentration in CS3 cells (0.14 and 0.10 mmole.$(10^9$ cells$)^{-1}$ for CS3 and both CS1 and CS2 respectively) may have restricted starch synthesis through ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) inhibition (Smith et al., 1997) and consequently favored glucose accumulation. CS2 cells also accumulated more C than control cells but less than CS3 cells, perhaps because glucose uptake from the culture media was restricted by P-deficiency. Those results indicate that both P and glucose internal concentrations play a crucial role in the control of SM production in EC cells.

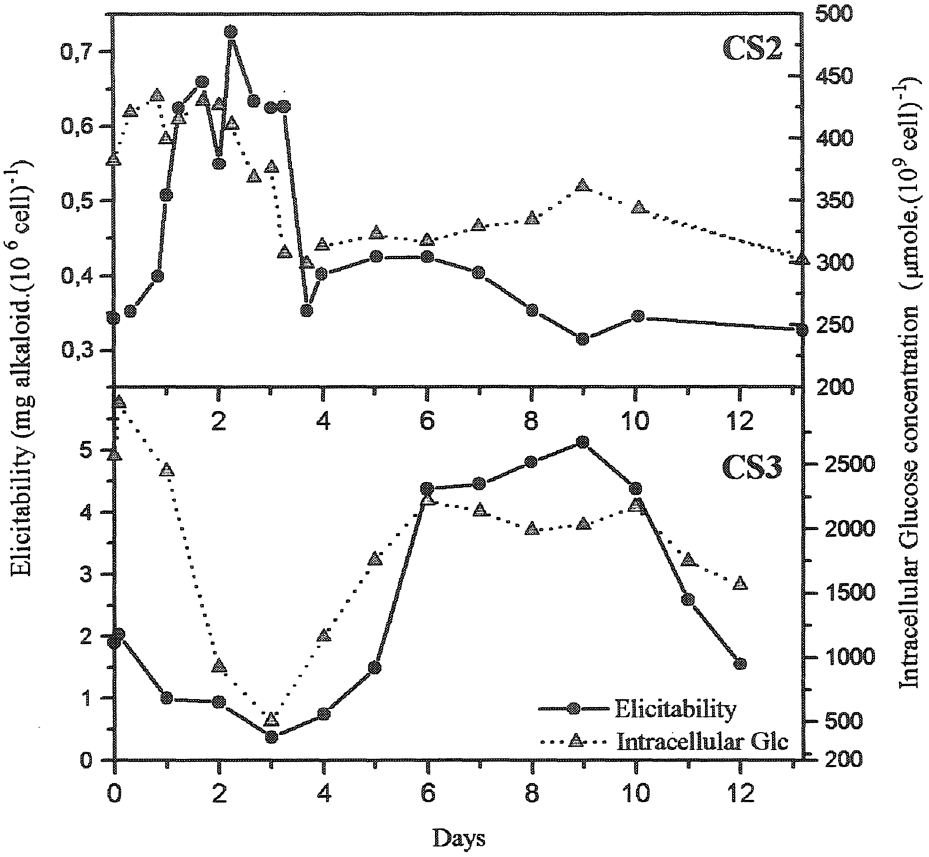


Figure 7.4 : Correlation between elicitability and intracellular glucose concentration in CS2 and CS3. Each point represents the average value from of 3 different shake flasks.

7.2.4.4. Nutritional Blockage as a Way to Manipulate Plant Cells Nutritional State

We studied the effect of nutrient addition on growth and productivity in the three cell suspensions studied. NaCl, KCl, $NaNO_3$, NaH_2PO_4, NH_4Cl, $CaCl_2$, Glucose and a mix of micronutrients, vitamins and iron-EDTA were added separately in the culture media 5 days after inoculation for the 3 cells suspensions. At day 10, cells were harvested to assess growth, cell concentration and elicitability. The most dramatic effect was obtained

with CS3 cells where the addition NaH_2PO_4 resulted in a 86% increase in the alkaloid production compared to CS3 cells which did not received any additional nutrient at day 5 (Figure 21). Final cell count was unaffected by those nutrient addition suggesting that only nutrient internal reserves has been altered. Results indicate that cells nutritional status is very plastic and can be easily altered. Moreover, nutritional blockage can serve as a powerful tool to manipulate nutrient intracellular concentrations in plant cells. It was observed previously that P and glucose internal concentration must be high to ensure high SM production level in EC cells. However, if high P and glucose concentrations are provided in the initial culture media (as in control cells), internal reserves in those nutrients remain low because C and P are channeled in primary metabolism (growth) instead of being accumulated. The correct strategy to increase P and C intracellular concentrations in EC cells was to block primary metabolism by lowering the N concentration by 50 % in the cultute media on a long term basis. After 5 days, CS3 cells had completely exhausted both their extracellular and intracellular NO_3^- and NH_4^+ sources (Fig. 16) and the nutritional blockage was therefore established. Once division had been significantly hindered, nutrients other than the limiting element (in our case N) can be added to the culture medium in order to manipulate intracellular concentrations. In our experiments, we added 0.5 mM PO_4 at day 5 to increase cells P internal reserves and this resulted in a 86% increase in the alkaloid production yield at day 10 compared to standard CS3 cells (without P addition). Glucose addition was observed to be unnecessary since the C-reserves were still at their highest in CS3 cells. This strategy is an example of how nutritional blockage can be used to manipulate intracellular concentrations in plant cells during the proliferation phase of the culture process and subsequently increase SM concentration in the production phase.

7.2.4.5. Contradictory Results in Relation to Plant Cells Nutritional Status

Highly contradictory results were reported in literature in regards to the effect of medium composition on SM production in plant cell culture (Dicosmo and Towers, 1984, Yeoman and yeoman 1996). For example, in *Catharanthus roseus* cells an increased alkaloid production level was observed when P concentration was either increased or reduced in the culture medium. Similarly, a reduction of the nitrogen concentration in the culture medium often resulted in an increase in SM production level, however, an increased N concentration was also reported to promote SM production (Yeoman and Yeoman, 1996, and references therein).

Our experiments showed that P- and N-limited cells had significantly higher elicitability compared to control cells. However, the addition of PO_4^{3-} in N-limited cells 5 days after inoculation also resulted in a significant increase in the alkaloid production (see previous paragraph). Our results may seem contradictory since both P limitation and P addition enhanced SM production. Nevertheless, those apparent contradictory results are easily explained if the nutritional status of cells is considered. In EC cells, long term P and N limitation had a positive impact on SM production because nutritional limitation resulted in an increased cells C content. Consequently, more building blocks were available for secondary metabolites production upon cells elicitation. However, targeted P addition on cells that already had a high C content (CS3) significantly increased alkaloid production because P surplus reserves were higher at elicitation time. Those results demonstrate that a given medium alteration can influence SM production differently depending on the nutritional history of plant cells during the experiment. Consequently discrepancies between the nutritional statuses of the plant cells used could probably explain the contradictory results found in the literature.

7.2.4.6. Lack of Reproducibility and Loss of Productivity in Plant Cell Culture

Lack of reproducibility in the production level is a recurrent problem in plant cell culture. Production levels can fluctuate widely from batch to batch without any clear reason. However, we demonstrated that SM production is tightly linked to intracellular P and C pools concentrations. Moreover, our results showed that those internal pools are very plastic and can be easily modified in response to small alteration in the culture conditions. Internal nutrient concentrations depend on a subtle equilibrium between growth and nutrient accumulation. Consequently, SM production level is influenced by every culture parameter fluctuation having an influence on cells growth such as variations in temperature, medium composition, inoculation level, sub-culture interval, etc. In spite of our efforts to standardize culture conditions, we still experience in our lab variability in cells growth rate and production level from batch to batch. However those variations were each time correlated with an alteration of the C and P content of EC cells at elicitation time. Consequently higher reproducibility could probably be achieved if both internal reserves and cell concentration were monitored on a routine basis and used as a marker to perform either elicitation or subculture.

Instability in product formation was also reported in many cell suspension cultures where SM production was reduced or even suppressed after several sub-cultures. Although, genetic instability has been mainly evoked to explain this loss of productivity, the role of internal nutrient reserves has never been assessed. However, it was proven in this study that low carbon internal reserves lead to significantly reduced production yields. For example, EC cells that were cultivated on a long-term basis in plain B5 medium produced 39 times less alkaloids compared to long-term nitrate limited cells. Consequently, when N-limited high producing cells were transferred in standard B5 medium, a slow decrease in production level was observed during the following sub-cultures. However, this decrease in productivity was not related with genetic variations and was solely attributable to cells nutritional status. A simple modification of the culture

media (50 % reduction in nitrate initial concentration) completely restored cells production capacity.

7.2.4.7. Bioprocess issues

High biomass concentrations have frequently been thought to be necessary to reach high production yields in plant cell culture (Scragg et al., 1990). However highly concentrated plant cell suspensions are very difficult to work with from a bioprocess point of view. Plant cell suspensions become highly viscous at high cell density and the oxygen transfer rate in such suspension is often very low due to the coalescence of gas bubbles. Moreover, the high shear stress sensitivity of plant cell does not permit either high agitation speed or high gas sparging rate. Consequently, the oxygen transfer in highly concentrated plant cells suspension is extremely challenging.

Nonetheless, in this study N-limited cells had a specific production level 39 times higher than control cells despite the fact that their final cell concentration was significantly lower (8.6 10^6 cell·ml^{-1} instead of 10.3). Those results demonstrate that high cell concentrations are not necessary to achieve high production yields in plant cell culture. In addition, the oxygen uptake rate (OUR) was significantly lower in CS2 and CS3 compared to the control cell suspension. Ten days after inoculation, the specific oxygen uptake rate (q_{O2}) was measured at 0.221, 0.173 and 0.145 mmole O_2·(10^9 cell)$^{-1}$·h^{-1} for CS1 (control), CS2 (P-deprived) and CS3 (N-deprived) cells respectively (Table 5). This implicates a 46% OUR reduction for both CS2 and CS3. Thus, growth-limited cells are producing more alkaloids in a less viscous cell suspension (due to lower cell density) and require lower global oxygen transfer rate. Those characteristics are particularly interesting from a practical point of view and facilitate greatly culture process development.

Since plant cells can accumulate significant amount of water and nutrient internally, dry and fresh weight concentrations are poor indicators of cell division. Growth monitoring

using those biomass parameters could lead to false conclusions regarding cell division, intracellular concentrations and specific production levels. For example cell mass varied from 0.693 to 1.528 $mg \cdot (10^6\ cell)^{-1}$ during the course of our experiments depending on cells nutritional status. For this reason cell concentration measurements are more reliable to assess plant cell proliferation in plant cell culture and can now be done very easily even with highly aggregated plant cells using a microplate reader (Lamboursain et Jolicoeur, 2004)

7.2.5. CONCLUSIONS

Internal nutrient concentrations (INC) in plant cells have been mostly overlooked in plant cell culture in recent years despite the fact that they have been shown to have a great interest in whole plants as well as in studies on plant-fungus symbiotic association (Jolicoeur et al., 2003). However, in this study intracellular C and P content were shown to have a major impact on SM production in EC cells. During our experiments, INC fluctuations were responsible for the lack of reproducibility in the production level observed from batch to batch. INC could also explain the loss of productivity often reported in plant cell culture during long-term culture. We demonstrated that measuring and manipulating the internal nutrient content of plant cells is crucial for a better control of MS metabolism in plant cells. This strategy implies the blockage of cell division by the way of a nutritional limitation and a re-allocation of C and P into cells internal reserves. The stored nutrients are then readily used to feed secondary metabolism when cells are eventually elicited. INC manipulation by the way of a nutritional blockage is thus a powerful tool to control SM production in plant cell culture.

Intracellular nutrient concentrations monitoring on a routine basis may be the missing key to a better control of phytochemical production in plant cell culture. This monitoring might increase productivity, enhance reproducibility from batch to batch and maintain the high productivity of cell lines on a long-term basis. However, since glucose is the primary

building block of all cell's metabolites, INC optimization is potentially applicable not only to secondary metabolites production, but also to various other research area like genetic engineering or recombinant protein production.

INC monitoring is quite tedious and time consuming in the present state and efforts should therefore be done to simplify the analytical procedures involved. The use of microplate reader technology and *in vivo* C- and P-NMR for the routine determination of intracellular glucose and phosphate in plant cells is be a very promising avenue toward a generalization of INC monitoring in plant cell culture.

7.2.6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their gratitude to the "Chaire CRSNG en bio-assainissement des sols" that allowed the use of their microplate reader. We want also to thank Dr. Sylvain Mandeville for reviewing the manuscript. This research project was funded by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Canadian Fundation for Innovation and the "Fonds Québécois pour la Recherche en Nature et Technologie".

7.2.7. REFERENCES

Archambault, J., Williams, RD., Bédard, C. Chavarie, C. 1996. Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. Shake flask suspension cultures. Journal of biotechnology 46: 95-105.

Berlin, J. 1988. Biotechnology in agriculture and forestry. - In Medicinal and aromatic plants I (Y. P. S. Bajai, ed), Vol. 4, pp. 37-59. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Blom, T. 1991. Transport and accumulation of alkaloids in plant cells. Ph.D. thesis, Leiden University, Leiden, Holland.

Carew, DP., Krueger, RJ. 1977. *Catharanthus roseus* tissue culture : the effects of medium modifications on growth and alkaloid production. J. Nat. Prod. 4: 326-336.

Collin, HA. 1987. Determinants of yield of secondary products in plant tissue cultures. Advances in botanical research. 113: 145-187.

Deus-Neumann B and Zenk MH (1984). Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. Planta Med. 50: 427–431.

Dicosmo, F., Towers, G.H.N. 1984. Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. Recent Advances in Phytochemistry Volume 18 : Phytochemical adaptations to stress. Sous la direction de Barbara N. Timmermann, Cornelius Steelink et Frank A. Loewus: Plenum Press : New York et Londres. p.97-175.

Doller, G. 1978. Influence of the medium on the production of serpentine by suspension cultures of Catharanthus roseus : In production of natural compounds by cell culture methods. Alfermann, AW., Reinhard, E. Editors. Gesellschaft für strahlen- und Umweltforschung mbH, munich. P. 109-116.

Dougall DK, Weyrauch, KW. 1980. Growth and anthocyanin production by carrot suspension cultures grown under chemostat conditions with phosphate as the limiting nutrient. Biotechnology and Bioengineering. XXII: 337-352.

Gamborg, OL.; Miller, RA. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-156.

Hodges, M. 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. J. Exp. Bot. 53: 905-916.

Jolicoeur, M., Bouchard-Marchand, É., Bécard, G., Perrier, M. 2003. Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. Eco. Model 163: 247-267.

Knobloch KH., Bast, G., Berlin, J. 1982. Medium- and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. Phytochemistry. 21: 591-594.

Knobloch, KH., Berlin, J. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. G. Don. Z. Naturforsch 35: 551-556.

Lamboursain, L., and Jolicoeur, M. 2004. Determination of cell concentration in a plant cell suspension using a fluorescence microplate reader. Plant Cell Reports (in press)

Lamboursain, L, St-Onge, F, Jolicoeur, M. 2002. A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. Biotechnol Prog. 18(6):1377-86.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497

Murchie EH, Chen Y, Hubbart S, Pen S, Horton P. 2000. Interactions between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice. Plant Physiology 119: 553–563.

Nash, DT., Davies, ME. 1972. Some aspects of growth and metabolism of Paul's scarlet rose cell suspension. J. Exp. Bot. 23: 75-91.

Paul, MJ, Stitt, M. 1993. Effect of nitrogen and phosphorous deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. Plant, Cell and Environment. 16: 1047-1057.

Roby, C, Martin, JB, Bligny, R, Douce, R. 1987. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. J. Biol. Chem., 262(11): 5000-5007.

Scheible, WR, Krapp A, Stitt M. 2000. Reciprocal changes of phosphenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate

dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. Plant, Cell and Environment 23: 1155–1167.

Scragg, AH., Ashton, S.; York, A.; Bond, P.; Stepan-Sarkissian, G.; Grey, D. 1990. Growth of Catharanthus roseus suspensions for maximum biomass and alkaloid accumulation. Enzyme and Microbial Technology, Volume 12(4) 292-298.

Smith, AM, Denyer, K., Martin, C. 1997. The Synthesis of the Starch Granule. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48:67-87.

Sun, JS., Gibson, KM., Kiirats, O., Okita, T.W. Edwards, GE. 2002. Interactions of nitrate and CO2 enrichment on growth, carbohydrates, and rubisco in Arabidopsis starch mutants. Significance of starch and hexoses. Plant Physiology 130: 1573-1583.

Van Gulik, W. 1990. Growth kinetics of plant cells in suspension culture. Ph.D. thesis. Delft University of Technology, Delft, Holland.

Whitmer S; Canel C; van der Heijden R; Verpoorte R. 2003. Long-term instability of alkaloid production by stably transformed cell lines of *Catharanthus roseus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 74: 73-80.

Winderickx RF and Thevelein JM. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. Trends Biochem. Sci. 26: 310-317.

Yeoman MM and Yeoman CJ. 1996. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. New Phytol. 134: 553-569.

Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, Stöckigt J, Weiler EW, Deus B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Editors: Bare, W, Reinhard, E, Zenk, MH. Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application. Springer-Verlag, Berlin, p 27–44

CHAPITRE 8. EFFET D'UNE MODIFICATION NUTRITIONELLE PONCTUELLE SUR LA PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES

8.1. DESCRIPTION DE L'EXPÉRIENCE

Nous avons vu dans la publication précédente qu'une modification du milieu de culture à long terme a un effet direct sur la croissance des cellules de plantes ainsi que sur les concentrations intracellulaires en C, N et P. Ces concentrations intracellulaires ont à leur tour un effet marqué sur la production de métabolites secondaires. Nous avons également voulu tester l'influence d'une modification ponctuelle du milieu de culture sur la production et la croissance.

Pour ce faire nous avons ajouté individuellement chacun des composants du milieu de culture (hormis les hormones) dans les 3 suspensions cellulaires 5 jours après l'inoculation (I+5). Les expériences ont été faites en quadruplicat et les nutriments ont été ajoutés isolément afin de déterminer l'effet de chacun des ajouts. Les deux mêmes contre-ion (Cl^- et Na^+) ont été systématiquement utilisés afin de pouvoir vraiment dégager l'effet de l'ion principal. Les concentrations des ajouts sont récapitulées dans le tableau 7. Au bout de 10 jours (5 jours après l'ajout) les cellules ont été récoltées et on a effectué un test d'élicitabilité ainsi que des mesures de la concentration cellulaire et concentrations en biomasse sèche et humide.

Tableau 8.1 : Récapitulation des concentrations des ajouts ponctuels

	Concentration de la solution d'ajout ***mM***	*Volume ajouté* ***ml***	*Concentration finale ajoutée dans la suspension* ***mM***
Témoin	-	-	-
NaCl	625	1.00	12.5
KCl	625	1.00	12.5
$NaNO_3$	625	1.00	12.5
NaH_2PO_4	27.5	1.00	0.55
NH_4Cl	50	1.00	1.00
Micro + Fe + Vita	N/A	0.75	[a]
$CaCl_2$	480	0.25	0.50
Glucose	250 g/l	2.00	10.0 g

[a] :Moitié de la concentration initiale du milieu B5

8.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

8.2.1. EFFET DES AJOUTS SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Les effets des différents ajouts sur la prolifération cellulaire sont présentés dans la figure 19. Par définition, si la croissance des cellules est limitée dans la suspension cellulaire témoin, l'ajout du nutriment limitant doit provoquer une augmentation de la concentration cellulaire à I+10. Dans le cas de l'inoculum 1 (cellules poussant dans du milieu B5 non modifié), les ajouts de $CaCl_2$ et de Glucose ont tous 2 provoqué une augmentation significative de la concentration cellulaire a I+10. Pour le glucose, ce résultat n'est pas surprenant car on a déjà vu au tableau 6 que ces cellules avaient très peu de C stocké par rapport aux deux autres suspensions cellulaires. D'après les résultats obtenus lors des ajouts, il est donc probable que ces cellules sont limitées en carbone à I+10. Par contre le résultat obtenu avec le calcium est inattendu.

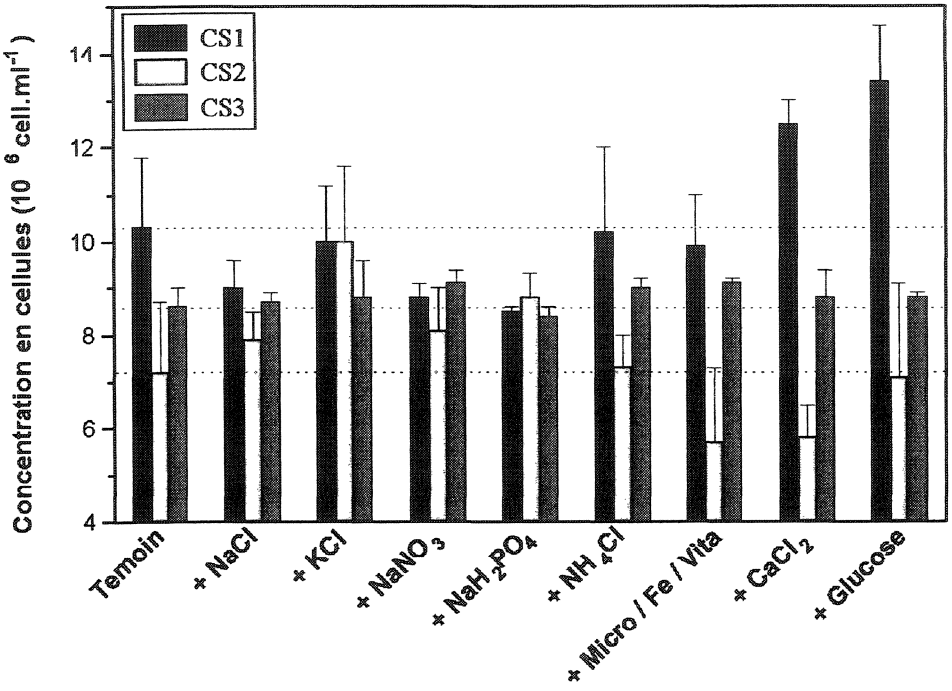


Figure 8.1 : Effet d'un ajout ponctuel à I+5 sur la concentration cellulaire à I+10

Dans le cas de l'inoculum 2 (cellules poussant dans du milieu B5 avec 0.8 mM de Pi au lieu de 1.1 mM), c'est l'ajout de KCl qui a eu l'effet le plus significatif sur la prolifération cellulaire, suivit par l'ajout de NaH_2PO_4. Encore une fois le résultat obtenu avec le Pi n'est pas surprenant car on a déjà vu au tableau 6 que ces cellules avaient une concentration en P plus faible que les deux autres suspensions cellulaires (cellules probablement limitées en P). Par contre le résultat obtenu avec le KCl est surprenant. L'ajout de « micro-nutriments + fer + vitamines » et de calcium a par contre fortement inhibé la croissance de ces cellules.

Aucun des ajouts n'a eu d'effet significatif sur la croissance cellulaire dans le cas de l'inoculum 3 (cellules poussant dans du milieu B5 avec 12.5 mM de NO_3^- au lieu de 25 mM). On se serait attendu à ce que les ajouts de molécules azotées aient permis une reprise de la division cellulaire entre le jour 5 et 10 mais ce n'est pas le cas.

8.2.2. EFFET DES AJOUTS SUR LA CONCENTRATION EN BIOMASSE SÈCHE

L'effet des différents ajouts ponctuels sur l'accumulation de biomasse sèche est présenté en figure 20 pour les 3 suspensions cellulaires. L'ajout de glucose dans le milieu de culture a provoqué une augmentation de 67 % de la concentration en biomasse sèche à I+10 dans le cas l'inoculum 1. Le poids cellulaire est du même coup passé de 1,024 (témoin) à 1.304 mg·$(10^6$ cell$)^{-1}$ (ajout de glucose) indiquant que les cellules ont accumulé des nutriments après l'ajout de glucose.

Dans le cas de l'inoculum 2 (milieu appauvri en Pi) c'est l'ajout de Pi qui a provoqué une augmentation de 62 % de la concentration en biomasse sèche à I+10. Le poids cellulaire est passé de 1,014 (témoin) à 1.346 mg·$(10^6$ cell$)^{-1}$ (ajout de NaH_2PO_4) indiquant une fois encore que l'accroissement de biomasse sèche suite à l'ajout est dû à la fois à la prolifération cellulaire accrue et à une accumulation de nutriments au niveau intracellulaire.

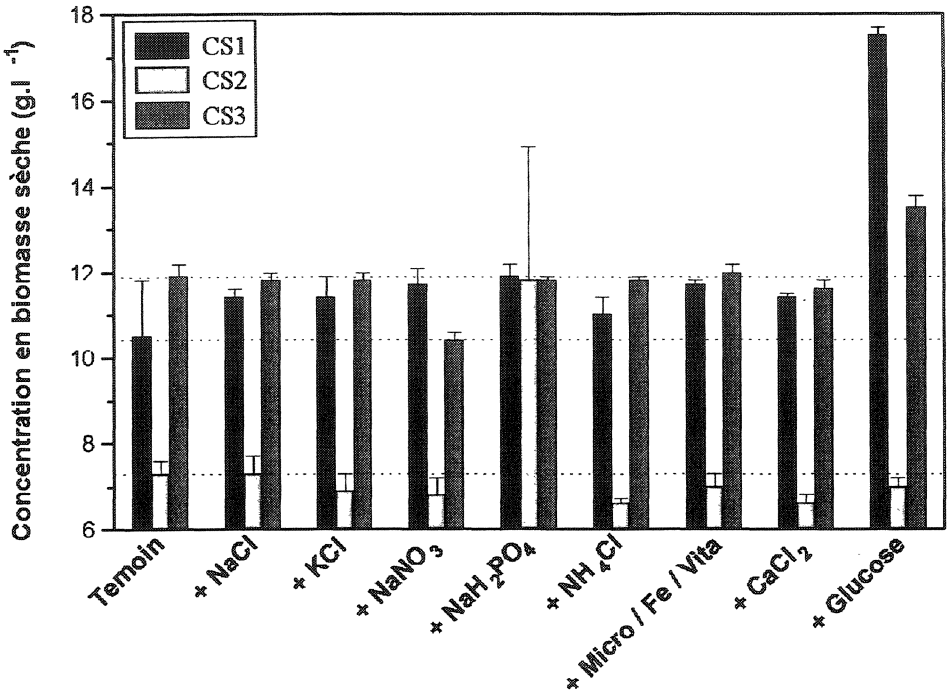


Figure 8.2 : Effet d'un ajout ponctuel à I+5 sur la concentration en poids sec à I+10

L'ajout de $NaNO_3$ a provoqué une légère diminution de la concentration en biomasse sèche par rapport au témoin dans l'inoculum 3 (milieu à concentration initiale réduite en NO_3^-) ainsi qu'une diminution de 1,385 à 1,139 mg·(10^6 cell)$^{-1}$ de la masse cellulaire. On a vu au chapitre 7 que les cellules de cette suspension cellulaire accumulaient des quantités importantes de glucose et de phosphate au niveau intracellulaire. Apparemment l'ajout de nitrate diminue ce stockage mais sans augmenter significativement la formation de cellules. L'ajout de glucose dans cette même suspension cellulaire a provoqué une augmentation de 13 % de la concentration en biomasse sèche a I+10 et une augmentation de la masse cellulaire à 1,528 mg·(10^6 cell)$^{-1}$, indiquant que le stockage intra-cellulaire du carbone déjà important dans les cellules de l'inoculum 3 est encore stimulé par l'ajout de glucose.

8.2.3. EFFET DES AJOUTS SUR LA PRODUCTION D'ALCALOIDES

La capacité des cellules à produire des alcaloïdes (élicitabilité) est restée faible quel que soit l'ajout pour les cellules de l'inoculum 1 (figure 21). Aucun des ajouts n'a significativement modifié la capacité de production, malgré le fait que la masse cellulaire (donc le stockage) ait été significativement augmentée dans le cas des ajouts de NO_3^-, Pi et glucose. On a vu plus haut que la capacité de production était reliée à la concentration intracellulaire de glucose. Il apparaît donc que les ajouts de NO_3^-, Pi et glucose n'ont pas significativement influencé la concentration en glucose intracellulaire à I+3. L'ajout de glucose a donc probablement provoqué une accumulation d'amidon plutôt que de glucose, laissant supposer que les cellules étaient limitées en Pi après l'ajout de glucose.

L'ajout de Pi dans la suspension 2 a provoqué une multiplication par 2,5 de la capacité de production des cellules. On peut en déduire que l'ajout de Pi a fait basculer les cellules en limitation de N à I+10, provoquant par la même occasion une accumulation intracellulaire de Pi et glucose intracellulaire.

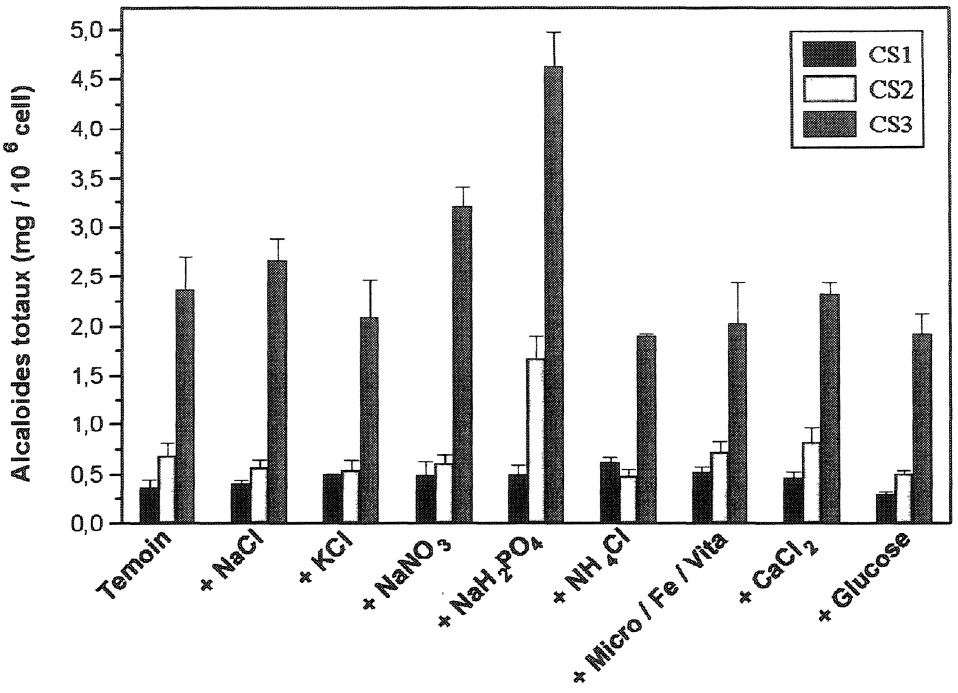


Figure 8.3 : Effet d'un ajout ponctuel à I+5 sur la capacité à produire des alcaloides à I+10

Dans le cas de la suspension 3, l'ajout de NO_3 et de Pi ont provoqué une augmentation de la capacité de production de 36 et 96 % respectivement par rapport aux cellules témoins (suspension 3 sans ajout). On a vu plus haut que l'ajout de Pi avait provoqué une augmentation significative de la masse cellulaire mais cela n'a pas eu d'effet sur la capacité de production des cellules de la suspension 3, indiquant que les cellules ont du accumuler ce carbone sous forme d'amidon plutôt que sous forme de glucose intracellulaire.

8.3. CONCLUSION CONCERNANT LES AJOUTS PONCTUELS

Les résultats présentés dans ce chapitre peuvent sembler en contradiction avec ceux du chapitre précédent. En effet lors de la comparaison des 3 suspensions cellulaires, on a vu que la diminution à long terme de la concentration initiale en P_i dans le milieu de culture avait provoqué une augmentation de 331 % de la capacité des cellules à produire des alcaloïdes à I+10 (Tableau 5). Cependant, un ajout ponctuel de P_i à I+5 a également provoqué une augmentation de 145 et 96 % de la capacité de production dans le cas des suspensions 2 et 3 respectivement. Il apparaît donc clairement que l'ajout ou le retrait d'un nutriment du milieu de culture a un effet très différent sur la capacité de production en fonction du statut nutritionnel des cellules au moment de la modification. Ces résultats apparemment contradictoires s'expliquent si on prend en considération non plus uniquement les concentrations extra-cellulaires mais aussi la dynamique de stockage intra-cellulaire. En effet la diminution à long terme de la concentration en P_i et l'ajout ponctuel en P_i ont eu le même effet final au niveau intracellulaire : augmenter le stockage de C et Pi dans les cellules, ce qui par cascade a augmenté leur capacité de production.

Ces expériences d'ajouts ponctuels ont apporté quelques résultats inattendus. En effet dans le cas de la suspension 3, l'ajout de nitrate dans le milieu à I+5 n'a pas provoqué d'augmentation de la concentration cellulaire à I+10 par rapport au témoin (sans ajout) comme on aurait pu s'y attendre. Les cellules sont apparemment resté bloquées dans l'état physiologique dans lequel elles étaient au moment de l'ajout. A I+5 en effet, les cellules de la suspension 3 sont en limitation azotée car le milieu et les réserves intracellulaires sont alors complètement dépourvues en azote (figure 15 et 16). Apparemment, l'ajout de nitrate à I+5 n'a pas relancé la croissance mais est plutôt venu alimenter les réserves cellulaires en azote. Ceci s'est traduit par une augmentation inattendue de la capacité de production (+ 36 %) à I+10. De même l'ajout de glucose dans la suspension 3 n'a pas eu l'effet stimulateur de la capacité de production escompté.

CHAPITRE 9. DISCUSSION GÉNÉRALE

9.1. LE CONCEPT DE «BOITE NOIRE» A ATTEINT SES LIMITES EN BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE

Jusqu'à maintenant, le concept de «boite noire» a été largement exploité en biotechnologie végétale. En effet la plupart des travaux publiés à ce jour étudiaient les relations entre ce qui entre dans les cellules (par exemple les concentrations en nutriments du milieu de culture) et ce qui en sort (par exemple la production de métabolites secondaires) sans s'intéresser à ce qui se passe dans la cellule elle-même. Toutefois, ce concept a clairement atteint ses limites aujourd'hui car nous nous trouvons face à un goulot d'étranglement: Le manque de reproductibilité et la perte apparemment aléatoire de la capacité de production de certaines suspensions cellulaires végétales à moyen et long terme limitent considérablement les possibilités d'applications commerciales de cette technologie pourtant prometteuse. Malgré les progrès extraordinaires qui ont été fait au niveau des bioprocédés ces dernières décennies, c'est désormais notre méconnaissance du fonctionnement cellulaire qui ralentit la progression vers la commercialisation. Afin d'éliminer le goulot d'étranglement, il est donc désormais nécessaire de dépasser le concept de « boite noire » et d'approfondir notre connaissance des phénomènes intracellulaires. C'est d'ailleurs le but principal d'un nouveau domaine de recherche : le génie métabolique.

Notre hypothèse de départ était simple : puisque les cellules des plantes peuvent accumuler des nutriments au niveau intracellulaire, les composants présents dans le milieu de culture ne sont pas les seules ressources nutritionnelles dont elles disposent. Dans ce contexte le concept de «boite noire» ne peut permettre de dégager des liens entre nutrition et physiologie chez les cellules de plantes. En effet, une modification de la composition du milieu de culture sera presque toujours tamponnée par la disponibilité d'éléments de réserve. Il fallait donc obligatoirement mesurer les concentrations

intracellulaires en nutriments afin de découvrir un lien éventuel entre le statut nutritionnel des cellules végétales et leur capacité à produire des métabolites secondaires.

9.2. UN BESOIN URGENT D'OUTILS DE CARACTÉRISATION FIABLES

Avant de pouvoir vérifier cette hypothèse, il fallait dans un premier temps pouvoir caractériser l'état physiologique et nutritionnel des cellules végétales en suspension. Mais plusieurs des méthodes de caractérisation couramment employées en biotechnologie sont inadaptées à l'étude des cellules de plantes, notamment les mesures de proliférations cellulaires basées sur la biomasse sèche et humide sont couramment responsables de problèmes d'interprétation des résultats. En effet au cours de nos expériences la masse cellulaire a varié de 0.693 à 1.528 $mg \cdot (10^6 \text{ cell})^{-1}$ selon le statut nutritionnel des cellules. De ce fait une cellule qui accumule des nutriments peut voir sa masse augmenter quasiment du simple au triple sans qu'aucune division cellulaire n'ait lieu. Ainsi si on exprime la production de MS par rapport au poids sec, on peut avoir l'impression que la capacité de production diminue par 3 alors qu'en fait il y a un biais sur la mesure : les cellules produisent la même quantité de MS mais 1 g de matière sèche contenant 3 fois moins de cellules, la quantité de MS mesurée diminue d'autant si elle est rapportée en $mg \cdot g^{-1}$ de poids sec. Pour la même raison, les concentrations intracellulaires doivent être exprimées par rapport à la concentration cellulaire et non pas en fonction de la biomasse. Il est donc primordial de se baser uniquement sur la concentration cellulaire en culture de cellules de plantes pour évaluer la prolifération cellulaire comme l'avait déjà précisé Van der Plas et ses collègues dès 1995. Hélas leurs travaux sont restés lettre morte et les mesures de poids sec et poids humide restent encore largement utilisées dans les travaux publiés à ce jour pour évaluer le taux de division des cellules de plantes.

9.3. L'ALLOCATION DES RESSOURCES CARBONÉES : UN ÉQUILIBRE ENTRE CROISSANCE ET STOCKAGE

Deux conditions doivent être remplies pour qu'une cellule de plante puisse produire des métabolites secondaires. D'une part les enzymes qui catalysent les voies du métabolisme secondaire doivent être en place et actives, d'autre part la cellule doit disposer de suffisamment de « briques » métaboliques pour pouvoir synthétiser les métabolites secondaires. Ces briques qui alimentent les voies métaboliques secondaires sont en fait une poignée de précurseurs issus du métabolisme primaire. Dans le cas des cellules d'EC, les métabolites secondaires ne sont pas (ou peu) produits pendant la phase de prolifération cellulaire. Inversement la croissance cesse une fois que les cellules sont élicitées (résultats non présentés) ce qui démontre que la production et la croissance sont clairement découplées. Pourtant, la division cellulaire et le métabolisme secondaire sont clairement compétiteurs vis à vis des ressources carbonées.

Lorsque les cellules se divisent activement, une grande partie des ressources carbonées disponibles sont utilisées pour former des nouvelles cellules. De ce fait les réserves intracellulaires en carbone sont faibles et la capacité des cellules à produire des MS après élicitation est en conséquence limitée en raison du peu de précurseurs immédiatement disponibles pour alimenter les voies du métabolisme secondaire. Inversement, lorsque la croissance cellulaire est limitée lors de la phase de prolifération, les réserves carbonées inutilisées pour la division sont stockées au niveau intracellulaire. Ces cellules riches en carbone auront une meilleure capacité à produire des métabolites secondaires après élicitation puisqu'elles disposent d'une source de carbone immédiatement disponible au niveau intracellulaire.

Ce concept est déjà connu au niveau des plantes entières. De nombreuses publications ont en effet établi un lien entre le taux de croissance des plantes, leur composition intracellulaire et leur capacité à produire des métabolites secondaires. Il existe une théorie controversées dite « de l'équilibre carbone / nutriment » (Carbon

nutrient balance ou CNB) qui postule que l'équilibre entre la concentration en C et en P:N des plantes décide de l'allocation carbonée dans les voies métaboliques secondaires. Cette théorie est basée sur 3 hypothèses principales : 1) le C et N seraient dirigés vers la production de MS uniquement lorsque qu'ils sont excédentaires et non nécessaires pour la croissance 2) la croissance serait limitée en N, P, K mais pas en carbone 3) la concentration en précurseurs contrôlerait la production des métabolites secondaires (Hamilton et al. 2001 et références associées, Haukioja et coll., 1998). Bien que cette théorie soit largement remise en doute aujourd'hui, elle semble pourtant assez bien décrire les phénomènes qui régissent la production de MS chez nos cellules cultivées de EC.

Nos résultats avec les cellules d'*Eschscholtzia californica* corroborent ceux publiés par Van der Plas et collègues en 1995. Leurs travaux comparaient la capacité de production de deux suspensions cellulaires de *Morinda citrifolia* cultivées sur 2 milieux de culture identiques mais contenant 2 phytohormones différentes (2,4-D ou NAA). Les cellules suplémentées en 2,4-D avaient un taux de croissance 2 fois supérieur mais aussi une concentration intracellulaire en sucres et une capacité de production en MS inférieures. Cependant, les auteurs avaient attribué ces résultats à un niveau de différentiation cellulaire différent pour les 2 suspensions, bien qu'aucune différence morphologique n'ait été constatée au microscope. Nos propres résultats laissent supposer que ces deux suspensions avaient plutôt un statut nutritionnel différent du à leur taux de croissance différent.

Toutefois des interactions métaboliques très complexes régulent l'allocation des nutriments chez les cellules de plantes. Par exemple une diminution de la concentration en P et N du milieu de culture a limité la croissance cellulaire dans les 2 cas mais à la fin de la culture les réserves carbonées étaient 188 % supérieures dans le cas des cellules à basse concentration en N. De plus le carbone n'était pas stocké sous la même forme dans les deux cas, ce qui a entraîné des taux de production en MS bien plus importants dans le cas des cellules limitées en N. Ces résultats démontrent des limitations de la théorie du CNB.

Clairement, cette étude ne fait que brosser une ébauche des phénomènes qui régulent la capacité de production des métabolites secondaires chez les cellules végétales. Nos résultats sont un pas de plus vers une meilleure compréhension des liens qui existent entre le statut nutritionnel des cellules et la production des métabolites secondaires. Cependant énormément de travail reste encore à faire pour réellement comprendre les phénomènes métaboliques qui y sont associés.

9.4. UN LIEN ENTRE LE STATUT NUTRITIONNEL, LE MANQUE DE REPRODUCTIBILITÉ ET LA PERTE DE CAPACITÉ DE PRODUCTION

Notre compréhension des phénomènes qui régulent le stockage des nutriments chez les cellules végétales cultivées est encore embryonnaire. Néanmoins, nos résultats permettent déjà de dégager des liens entre le statut nutritionnel des cellules et leur capacité à produire des métabolites secondaires. Chez *Eschscholtzia californica*, il semble y avoir un lien direct entre les concentrations de glucose et phosphate intracellulaires au moment de l'élicitation et la quantité de MS produits. Il faut donc introduire ici la notion de « bagage nutritionnel », c'est à dire que les concentrations intracellulaire bâties pendant la phase de prolifération cellulaire ont un impact direct sur la productivité lors de la phase de production.

Cette notion n'a pas été vraiment exploitée en culture de cellule végétale à notre connaissance. Pourtant elle joue un rôle fondamental et pourrait expliquer au moins en partie les problèmes de manque de reproductibilité et de perte progressive de productivité constatés en culture de cellules de plantes. En effet lorsque les cellules d'EC cultivées sur le milieu allégé en N (capacité de production élevée) étaient transférées dans du milieu B5 standard, leur capacité de production diminuait progressivement au fil des 3 sub-cultures suivantes pour ensuite se stabiliser à un niveau de 30 à 40 fois plus faible. Néanmoins,

cette perte de la capacité de production était totalement réversible lorsque les cellules étaient à nouveau transférées dans le milieu à concentration réduite en N. Ces résultats semblent donc infirmer l'hypothèse de l'instabilité génétique pour expliquer la perte de production en culture de cellules végétale dans notre cas.

Chez les cellules de EC, la durée de la phase de division cellulaire et de la phase de stockage a un impact direct sur la capacité de production des cellules lorsque les cellules sont ensuite élicitées. En conséquence, toute modification même infime des conditions de culture lors de la phase de prolifération a un impact énorme sur la capacité de production. En effet, si la quantité de cellules formées lors de la phase de division cellulaire et/ou le temps de stockage des nutriments varient pour quelque raison que ce soit, le statut nutritionnel des cellules s'en trouve directement affecté et la capacité de production également.

Pour cette raison la moindre variation de température, composition du milieu de culture, nombre et statut nutritionnel des cellules inoculées, etc. provoque une variation significative de la capacité de production et peut mener à un manque de reproductibilité du procédé de production. Au laboratoire par exemple, nous utilisons le volume de cellules sédimentées pour déterminer le moment du repiquage. Cette technique nous semblait préférable plutôt qu'un repiquage à date fixe (ex: repiquage systématique après 10 jours) pour prendre en compte les fluctuation du taux de croissance d'une culture à l'autre. Toutefois, le volume de cellules sédimentées donne une estimation très imprécise de la concentration cellulaire dans la suspension cellulaire, ce qui induit une grande fluctuation des taux d'inoculation. En conséquence, nous enregistrons des variations significatives de la capacité de production dans le temps, même en utilisant des procédures d'opération normalisées lors des repiquages. Cette constatation indique qu'un plus grand soin doit être apporté lors de la caractérisation de routine des suspensions cellulaires afin de standardiser les taux d'inoculation et les durées entre 2 repiquages.

9.5. LIEN ENTRE LE STATUT NUTRITIONNEL DES CELLULES DE PLANTES ET LES RESULTATS CONTRADICTOIRES EN OPTIMISATION DE MILIEU.

Certains des résultats présentés ici peuvent sembler contradictoires. Par exemple une réduction de la concentration initiale de P_i dans le milieu de culture a provoqué une augmentation de la capacité de production des cellules, mais en parallèle une addition de P_i 5 jours après inoculation a eu le même effet. Cette apparente contradiction reflète bien celles rencontrées dans la littérature.

Néanmoins ces résultats ne paraissent contradictoires que si on se contente du concept de « boite noire », c'est à dire si on ne prend pas en considération le statut nutritionnel des cellules. Lorsqu'on mesure l'évolution des concentrations intracellulaires suite à ces deux modifications du milieu, on constate que la réduction à long terme de la concentration en P a provoqué une accumulation de C dans les cellules et que dans le $2^{ème}$ cas, les cellules déjà riches en C ont accumulé du P (absent du milieu de production) ce qui leur a permis de produire plus de MS après l'élicitation. En fait, de part la présence des nutriments de réserve et les interactions complexes entre le C, N et P au niveau métabolique, une modification du milieu de culture peut avoir un effet différent sur la capacité de production des cellules en fonction de l'état physiologique et du statut nutritionnel des cellules.

Ces données suggèrent que les contradictions constatées dans la littérature à propos de l'effet de la composition du milieu de culture sur la capacité de production puissent être dues à une méconnaissance du statut nutritionnel des cellules au moment de leur modification.

9.6. CONTRÔLE DE LA CAPACITÉ DE PRODUCTION DE MS PAR MODIFICATION DU STATUT NUTRITIONNEL

Dans le cas de nos cellules de EC, il apparaît clairement qu'une phase de stockage des nutriments suivant la phase de prolifération cellulaire a positivement affecté la capacité de production des cellules. Ainsi, le bagage nutritionnel acquis avant l'élicitation conditionne directement la capacité de production ultérieure des cellules, et il parait donc intéressant, au niveau bioprocédé, d'intercaler une phase de stockage des nutriments avant d'éliciter les cellules.

Le procédé de production pourrait donc se faire en trois temps 1) phase de multiplication des cellules 2) arrêt de la division et ajouts ciblés de nutriments pour favoriser le stockage des réserves intracellulaires 3) élicitation et production des métabolites secondaires. Nos expériences d'ajouts ponctuels ont démontré qu'il est possible de « gonfler » le bagage nutritionnel des cellules grâce à des ajouts ciblés. Ces résultats pourraient déboucher sur la mise au point d'une stratégie de gestion des concentrations cellulaires pour maximiser la production des MS. Par exemple en ajoutant du P_i à des cellules dont la division a préalablement été stoppée en raison d'une limitation en N, on a pu augmenter le bagage nutritionnel des cellules et leur capacité de production des MS. Le suivi des concentrations intracellulaires, couplé à une stratégie de gestion de ces concentrations, pourrait donc mener à des taux de production optimisés et à un meilleur contrôle de la production au niveau bioprocédé.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Ce travail a abouti au développement de plusieurs techniques et méthodes innovatrices visant à caractériser l'état physiologique et nutritionnel des cellules de plantes cultivées. D'une part la mise au point d'un respiromètre spécialement adapté aux cellules végétales a permis de mesurer avec précision la consommation en oxygène (OUR) de nos suspensions végétales ainsi que leur taux de consommation spécifique en oxygène (q_{O2}) qui est indicateur de l'activité respiratoire des cellules. Ces données sont importantes au niveau de la caractérisation cellulaire mais aussi au niveau bioprocedé. En effet des mesures ponctuelles du q_{O2} en cours de culture permettent l'estimation en continu de la concentration cellulaire dans un bioréacteur à l'aide de bilans sur les équilibres gazeux et de mesures du coefficient du transfert de masse ($K_L a$).

La mise au point d'une méthode fiable et rapide pour mesurer la concentration cellulaire est une percée dans le domaine. En l'absence de méthode simple pour compter les cellules, la concentration en poids sec a été largement utilisée jusqu'à présent pour évaluer la prolifération cellulaire en culture de cellules végétales. Cependant, évaluer la concentration cellulaire à partir de la concentration en biomasse sèche mène souvent des résultats erronés car la masse spécifique des cellules végétales varie au cours de la culture en raison de l'accumulation des nutriments. La mise au point de cette méthode de comptage par plaque multi-puits permet désormais de faire un suivi de routine de la concentration cellulaire. Cette donnée pourra par exemple être utilisée pour planifier les repiquages et standardiser les taux d'inoculation, comme c'est déjà le cas avec les cellules microbiennes et animales, et permettra peut être d'augmenter significativement la reproductibilité des procédés de biotechnologie végétale..

Ce travail a aussi permis de mettre en évidence le rôle crucial du statut nutritionnel des cellules de plantes sur leur capacité à produire des métabolites secondaires après élicitation. En effet le bagage nutritionnel que les cellules acquièrent lors de la phase de prolifération cellulaire influence directement la quantité de MS produits pendant la phase

de production. De plus nous avons démontré qu'il est possible de manipuler le bagage nutritionnel des cellules de plantes en utilisant une limitation nutritionnelle pour ralentir la division tout en faisant des ajouts ciblés pour gonfler les réserves cellulaires. Cette stratégie pourrait permettre d'optimiser la production de métabolites secondaires et d'éviter les pertes de capacité de production fréquemment observées en culture de cellules et qui limitent l'application industrielle de ces procédés.

Cette stratégie de gestion des réserves intra-cellulaires ne se limite pas à l'optimisation de la production de métabolites secondaires. Elle pourrait théoriquement être adaptée à d'autres applications impliquant des cellules de plantes comme par exemple l'optimisation de la production de protéines recombinantes. La manipulation des concentrations intracellulaires dans le but de maximiser la production de molécules d'intérêt pourrait aussi être appliquée à d'autres cellules, à condition qu'elles aient la capacité de stocker des nutriments au niveau intracellulaire, comme par exemple les cellules animales ou les bactéries formant des polymères.

Ce travail n'est bien sur que la première ébauche vers une compréhension des phénomènes qui relient le statut nutritionnel des cellules de plantes et leur capacité a produire des métabolites secondaires. Beaucoup de travail reste à faire pour comprendre les subtiles interactions qui régissent l'accumulation des différents nutriments dans les cellules. La RMN *in vivo* est un outil très interessant pour ce faire puisqu'elle permet de mesurer les concentrations en metabolites directement dans les différents compartiments cellulaires sans avoir à faire d'extraction. Dans le cadre de ce travail nous n'avons utilisé qu'une partie infime des possibilités de cet outil d'analyse. Cependant la RMN *in vivo* constitue un outil de choix pour mieux comprendre les interactions entre la composition du milieu de culture et l'évolution du statut nutritionnel des cellules de plantes.

Les résultats presentés dans cette thèse ouvrent une nouvelle porte vers une meilleure reproductibilité des procédés de production et la possibilité d'un nouvel outil d'optimisation. Un suivi de routine des concentrations intracellulaires et de la

concentration cellulaire des suspensions végétales pourrait enfin permettre une normalisation des conditions de culture afin d'obtenir une stabilisation de la capacité de production des cellules à long terme. Si cette hypothèse est vérifiée, la gestion des concentrations intracellulaires pourrait être l'outil qui permettra enfin de généraliser l'utilisation des cellules de plantes au niveau commercial. Pour l'instant les méthodes analytiques permettant d'évaluer les concentrations intracellulaires en nutriments sont fastidieuses et donc difficilement utilisables à grande échelle pour un suivi de routine. Il faudrait donc dans un premier temps mettre en place des procédures analytiques à haut débit en utilisant par exemple la technologie du lecteur de plaque multi-puits.

La normalisation des procédés de culture par la généralisation des mesures des concentrations intracellulaire et de concentration cellulaire pourrait enfin permettre au domaine des biotechnologies végétales de tenir des promesses faites il y a plus de 40 ans : parvenir à produire des phytomolécules *in vitro* à l'échelle industrielle.

RÉFÉRENCES

ABE, S., OHTA, Y. 1983. Lulunularic acid in cell suspension cultures of *Marchantia polymorpha*. Phytochemistry. 22: 1917-1920.

AMINO, S., FUJIMARA, T., KOMAMINE, A. 1983. Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. *Physiologia Plantarum*. 59: 393-396.

AMORIN, H.B., DOUGALL, D.K., SHARP, W.R.1977. The effect of carbohydrate and nitrogen concentration on phenol synthesis in Paul's Scarlet Rose cells grown in tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 39: 91-95.

ARCHAMABAULT, J., WILLIAMS, R.D., BEDARD, C., CHAVARIE, C. 1996. Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. Shake flask suspension cultures. *Journal of Biotechnology*. 46: 95-105.

ASLAM, M., TRAVIS, R.L., HUFFAKER, R.C. 1992. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley seedings. *Plant Physiology*. 99: 1124-1133.

ASLAM, M., TRAVIS, R.L., RAINS, D.W. 1996. Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. *Plant Physiology*. 112: 1167-1175.

AVIGAD, G., DEY, P.M. 1997. Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. *Plant Biochemistry*. Sous la direction de P.M. Dey et J.B. Harborne. Academic Press : London. P. 143-204.

BAILEY, J.E., OLLIS, D.F. 1986. *Biological Engineering Fonfamentals*. 2nd Edition. McGraw-Hill, New York. Editeurs: Verma, K., Martin, C.C. p.123

BAIRD, R.B., KUO, C.L., SHAPIRO, J.S., YANKO, W.A. 1974. The fate of phenolics in wastewater-determination by direct-injection GLC and Warburg respirometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2: 165-78.

BAKER, S.S., RUGH, C.L., KAMALAY, J.C. 1990. RNA and DNA isolation from recalcitrant plant tissues. *BioTechniques*. 9: 268–272.

BANKS-IZEH, M.S., POLITO, W.B. 1980. Changes in ploidy level in calluses derived from two growth phases of *Hedera helix* L., the English ivy. P1. *Science Letters* 18: 161-167.

BEN-HAYYIM, G., KOCHBA, J. 1983. Aspects of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of Citrus *sinensis*. *Plant Physiology*. 72: 685-690.

BENNICI, A., BUIATTI, M., D'AMATO, F., PAGLIAI, M. 1971. Nuclear behaviour in Haplopappus gracilis grown in vitro in different culture media, Coll. Int. CNRS 193, *Les cultures de tissus de plantes*. 245–253.

BERLIN, J. 1988. Biotechnology in agriculture and forestry. *Medicinal and aromatic plants*. Sous la direction de P.S. Bajai. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag.. Volume. 4. pp. 37-59.

BHATT, P.N., BHATT, D.P, SUSSEX, I. 1983. Studies on some factors affecting solasodine contents in tissue cultures of *Solanum nigrum*. *Physiologia Plantarum*. 57: 159-162.

BIELESKI, R.L. 1973. Phosphate pools, Phosphate transport, and Phosphate availability. *Annual Review in Plant Physiology*. 24: 225-252

BINZEL, M.L., HASEGAWA, P.M., HANDA, A.K., BRESSAN, R.A. 1985. Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology*. 78: 118-125.

BLEVINS, D.G., REINBOTT, T.M. 1999. Impact of phosphorus nutrition magnesium, calcium and water status of plants. *Phosphorus in plant biology : Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes*. Sous la direction de J.P Lynch et J. Deikman. Current topics in plant physiology: an American Society of Plant Physiologist Series. Rockville, MD. P. 197-206.

BLOM, T. 1991. *Transport and accumulation of alkaloids in plant cells*. Ph.D. Thesis, Leiden University, Leiden, Holland.

BUTCHER, D.N., STREET, H.E. 1960. The effect of gibberellins on the growth of excised tomato roots. *Journal of Experimental Botany*. 11: 206-216.

CAREW, D.P., KRUEGER, R.J. 1977. *Catharanthus roseus* tissue culture : the effects of medium modifications on growth and alkaloid production. *Journal of. Natural Products*. 4: 326-336.

CARROLL, A.D., FOX, G.G., LAURIE, S., PHILLIPS R., RATCLIFFE, RG. STEWART, G.R. 1994. Ammonium assimilation and the role of y-aminobutyric acid in pH homeostasis in carrot cell suspensions. *Plant Physiol*. 106: 513-520.

CHANDLER, S.F., DODDS, J.H. 1983. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasodine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell reports*. 2: 205-208.

CHAURET, N., RHO, D., ARCHAMBAULT J. 1990. Solid-phase extraction and fluorometric detection of benzophenanthridine alkaloids from *Sanguinaria Canadensis* cell cultures. *J. Chromatography*. 519: 99-107.

CHERRY, R.S., PAPOUTSAKIS, E.T. 1986. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess Engineering*. 1: 29-41.

COLLIN, H.A. 1987. Determinants of yield of secondary products in plant tissue cultures. *Advances in Botanical Research.* 113: 145-187.

CONN, E.E. 1995. The world of phytochemicals. *Current Topics in Plant Physiology*. Sous la Direction de D.L. Gustine et H.E. Flores. American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD; P. 1-14.

COSTA L.E., MENDEZ, G., BOVERIS, A. 1997. Oxygen dependence of mitochondrial function measured by high-resolution respirometry in long-term hypoxic rats. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 42: C852-C858.

COWELL, J.K., FRANKS, L.M. 1980. A rapid method for accurate DNA measurements in single cells in situ using a simple microfluorometer and Hoechst 33258 as a quantitative fluorochrome. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 28: 206-210.

DAVIS, M.E. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Planta*. 104: 50-65.

DELROT, S., BONNEMAIN, J.-L. 1981. Involvement of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiology*. 67: 560–564.

DEUS-NEUMANN, B., Zenk, M.H. 1984. Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Med*. 50: 427–431.

DIEUAIBE-NOUBHANI, M., RAFFARD, G., CANIONI, P., PRADET, A., Raymond, P. 1996. Quantification of compartimented metabolic fluxes in maize roots tips using isotope distribution from ^{13}C- or ^{14}C-labelled glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 13147-13159.

DING, B.L., SCHOPFER, P. 1995. Oxygen dependence of elongation and oxygen uptake in maize coleoptiles. *Botanica Acta*. 108: 381-386.

DISCOSMO, F., TOWERS, G.H.N. 1984. Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. *Recent Advances in Phytochemistry Volume 18 : Phytochemical adaptations to stress*. Sous la direction de Barbara N. Timmermann, Cornelius Steelink et Frank A. Loewus: Plenum Press : New York et Londres. p. 97-175.

DO, C.B., CORMIER, F. 1990. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potentional in grape (*Vitis vinifera L.*) cell suspensions. *Plant Cell Reports*. 9: 500-504.

DO, C.B., CORMIER, F. 1991. Effects of high ammonium concentration on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera L.*) cell suspension cultured in a production medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 27: 169-174.

DO, N., ADAMS, R.P. 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques*. 10: 162–166.

DODDEMA, H., TELKAMP, G. 1979. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol. Plant.* 45: 332-338.

DOLLER, G. 1978. Influence of the medium on the production of serpentine by suspension cultures of *Catharanthus roseus. Production of natural compounds by cell culture methods*. Sous la direction de A.W. Alfermann, E. Reinhard. Gesellschaft für strahlen und Umweltforschung mbH, Munich. P. 109-116.

DORAN, P.M. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press : San Diego. 439p.

DOUGALL D.K., WEYRAUCH, KW. 1980. Growth and anthocyanin production by carrot suspension cultures grown under chemostat conditions with phosphate as the limiting nutrient. *Biotechnology and Bioengineering*. XXII: 337-352.

DUFF, S.M.G., CHOLLET, R. 1995. In vivo regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiology.* 107: 775-782.

EASTMOND, P.J., DENNIS, D.T., RAWSTHORNE, S. 1997. Evidence that malate-inorganic phosphate exchange translocator imports carbon across the leucoplast envelope for fatty acid synthesis in developing castor seed endosperm. *Plant Physiology*. 144: 851-856.

ECHEVERIA, E., GONZALEX, P.C. 2000. ATP-induced sucrose efflux from red-beet tonoplast vesicles. *Planta*. 211: 77-84??

EDLEMAN, J., HANSON, A.D. 1971. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. *Planta*. 18: 150-156.

ESCHRICH, W. 1989. Ploem unloading of photoassimilates. *Transport of photoassimilates*. Sous la direction de A., Baker, et J.A. Milburn. Longman Scientific & Technical : Essex. P. 206-263.

EYER, K.; OEGGERLI, A. Heinzle, E. 1995. On-line gas analysis in animal cell cultivation. II. Methods for OUR measurements and its application for control. *Biotechnology & Bioengineering*. 45: 54-65.

FABRE N., CLAPAROLS, C., RICHELME S., ANGELIN, M-L., FOURASTE, I., MOULIS, C. 2000. Direct characterization of isoquinoline alkaloids in a crude plant extract by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: Example of Eschscholtzia californica. *Journal of Chromatography A*. 904: 35-46.

FOYER, C.H., NOCTOR, G., LELANDAIS M., LESCURE, J.C., VALADIER, M.H., BOUTIN, J.P., HORTON, P. 1994. Short-term effects of nitrate, nitrite and

ammonia assimilation on photosynthesis, carbon partitioning and protein phosphorylation in maize. *Planta*. 192: 211-220.

FRAS, A., MALUSZYNSKA, J. 2003. Regeneration of Diploid and Tetraploid Plants of Arabidopsis thaliana via Callus. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 45: 145-152.

FURUYA, T., KOJIMA, H., SYONO, K. 1971. Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues. *Phytochemistry*. 10: 1529-1532.

GAMBORG, O.L., MILLER, RA., OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50: 151-156.

GILBERT G.A., VANCE, C.P. ALLAN, D.L. 1999. Regulation of white lupin metabolism by phosphorus availability *Phosphorus in plant biology : Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes*. Sous la direction de J.P Lynch et J. Deikman. Current topics in plant physiology: an American Society of Plant Physiologist series. Rockville, MD, p.157-167.

GNAIGER, E., STEINLECHNER-MARAN, R., MENDEZ, G., EBERL, T., MARGREITER, R. 1995. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 27: 583-597.

GNAIGER, E., LASSNIG, B., KUZNETSOV, A., RIEGER, G., MARGREITER, R. 1998. Mitochondrial Oxygen affinity, respiration control and excess capacity of cytochrome *c* oxidase. *The Journal of Experimental Biology*. 201: 1129-1139.

GNAIGER, E., MENDEZ, G., HAND, S.C. 2000. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* 97: 11080-11085.

GONG, P., GASPARRINI, P., RHO, D., HAWARI, J., THIBOUTOT, S., AMPLEMAN, G., SUNAHARA, G.I. 2000. An in situ respirometric technique to measure pollution-induced microbial community tolerance in soils contaminated with 2,4,6-trinitrotoluene. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 47: 96-103.

GREGORY, T.R. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 76: 65–101.

GROUZIS, J.-P., POULIQUIN, P., RIGAUD, J., GRIGNON, C. 1997. In vitro study of passive nitrate transport by native and reconstituted plasma membrane vesicles from corn root cells. *Biomembranes.* 1325: 329-342.

GUY, R.D., VANLERBERGHE, G.H., TURPIN, D.H. 1989. Significance of phosphoenolpyruvate carboxylase during ammonium assimilation: carbon isotope discrimination in photosynthesis and respiration by the N-limited green alga *Selenastrum minitum. Plant Physiology.* 89: 1150-1157.

HALLER, T., ORTNER, M., GNAIGER, E. 1994. A respirometer for investigating oxidative cell metabolism: toward optimization of respiratory studies. *Analytical Biochemistry.* 218: 338-342.

HAMMOND, D.G., KUBO, I. 2000. Alkanols inhibit respiration of intact mitochondria and display cutoff similar to that measured in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimetal Therapeutics*. 293: 822-828.

HAO, Y.J., DENG, X.X. 2003. Single-cell-derived sibling lines are established as an experimental system to assess chromosome number variations in embryogenic callus cultures of sweet orange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 73: 275-280.

HARBORNE, J.B. 1997. Biochemical Plant Ecology. *Plant Biochemistry*. Sous la direction de P.M. Dey et J.B. Harborne. Academic Press : New York. Chapter 14, p.503.

HATZFELD, W.-D., DANCER, J., STITT, M. 1990. Fructose-2,6-biphosphate, metabolites and "coarse" control of pyrophosphate : fructose-6-phosphate phospho-transferase during triose-phosphate cycling in heterotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta* 180: 205-211.

HERNANDEZ, L.F., PALMER, J.H. 1988. Fluorescent staining of primary plant cell walls using bisbenzimide (33258 Hoechst) fluorochrome. *Stain Technology*. 63: 190-192.

HOEMANN, C.D., SUN, J., CHRZANOWSKI, V. BUSCHMANN, D. 2002. A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage. *Analytical Biochemistry*. 300: 1-10.

HOLE, D.J., EMRAN, A.M., FARES, Y., DREW, M.C. 1990. Introduction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiology*. 93: 642-647.

HOLTON, T.A., CORNISH, E. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*. 7; 1071-1083.

HUA, J., ERICKSON, L.E., YIIN, T.Y., GLASGOW, L.A. 1993. A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability. *Critical Reviews in Biotechnology*. 13: 305-328.

HUBER, J.L., HUBER, S.C. 1992. Site specific phosphorylation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *The Biochemical Journal*. 283: 877-882.

HUBER, S.C., HUBER, J.L., CAMPBELL, W.H., REDINBAUGH, M.G. 1992. Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involve protein phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 296: 58-65.

IKEDA, T., MATSUMOTO, T., NOGUCHI, M. 1976. Effects of nutritional factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry*.. 40: 1765-1770.

ISAAC, R.A. JOHNSON, W.C. 1976. Determination of total nitrogen in plant tissue using a block digestor. *J. AOAC*. 59: 98-100

JAMES, W.O. 1953. Oxygen effects. *Plant respiration*. Ssous la direction de W.O. James. Clarendon Press : Oxford. P. 143-167.

JOLICOEUR, M., BOUCHARD-MARCHAND, É., BÉCARD, G., PERRIER, M. 2003. Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. *Eco. Model* 163: 247-267.

JORJANI, P., OZTURK, S.S. 1999. Effect of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. *Biotechnology and Bioengineering.* 64: 349-356.

KAISER, W.M., SPILL, G. 1991. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis: II. *In vitro* modulation by ATP and AMP. *Plant Physiology.* 96: 368-375.

KANG, F., RAWSTHORNE, S. 1996. Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* 1999: 321-327.

KAO, K.N. 1982. Staining methods for protoplasts and cells. *Plant tissue culture methods* (2nd revised edition). Sous la direction de L.R. Wetter et F. Constabel. National Research Council of Canada : Saskatoon. P. 67-71

KARLSSON, S.B., VASIL, I.K. 1986. Growth, cytology and flow cytometry of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* Jacq. and *Pennisetum purpureum* Schum. *Journal of Plant Physiology.* 123: 211-227

KAWAMURA, Y., TAKASHASHI, M., ARIMURA, G., ISAYAMA, T., IRIFUNE, K., GOSHIMA, N., MORIKAWA, H. 1996. Determination levels of NO_3^-, NO_2^- and NH_4^+ ions in leaves of various plants by capillary electrophoresis. *Plant and Cell Physiology.* 37: 878-880.

KIERAN, P.M., MALONE, D.M., MACLOUGHLIN, P.F. 2000. Effects of Hydrodynamic and Interfacial Forces on Plant Cell Suspension Systems. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 67: 139-177.

KIM, I.S., KIM, S. JANG, A. 2001. Activity monitoring for nitrifying bacteria by fluorescence in situ hybridization and respirometry. *Environmental Monitoring and Assessment.* 70: 223-231.

KNOBLOCH, K.H., BAST, G., BERLIN, J. 1982. Medium- and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus. Phytochemistry.* 21: 591-594.

KNOBLOCH, K.H., BERLIN, J. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus. G. Don. Z. Naturforsch* 35: 551-556.

KNOBLOCH, K.H., BERLIN, J. 1981. Phosphate mediated regulation of cinnamoyl putrescine biosysnthesis in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum. Planta Medica.* 42: 167-172

KONDOROSI, E., ROUDIER, F., GENDREAU, E. 2000. Plant cell-size control: Growing by ploidy? *Current Opinion in Structural Biology.* 3: 488–492.

KOVARICK, A., FOJTOVA, M. 1999. Estimation of viable cell count after fluorescein diacetate staining using phosphoimager analysis. *BioTechniques*, 27: 685-688

KYUNG, Y.S., PESHWA, M.W., GRYTE, D.M., HU, W.S. 1994. High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements. *Cytotechnology.* 14: 183-190.

LABARCA, C., PAIGEN, K. 1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochemistry*. 102: 344-352

LALOUE, M., COURTOIS, D., MANIGAULD, P. 1980. Convenient and rapid fluorescence staining of plant cell nuclei with "33258" Hoechst. *Plant Science Letters*. 17: 175-179

LAM, H.M., COSCHIGANO, K., OLIVEIRA, I.C., MELO-OLIVEIRA, R., CORUZZI, G. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 569-593.

LAMBOURSAIN, L. AND JOLICOEUR, M. 2004. Determination of cell concentration in a plant cell suspension using a fluorescence microplate reader. *Plant Cell Reports* (soumis).

LAMBOURSAIN, L., ST-ONGE, F., JOLICOEUR, M. 2002. A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnology Progress*. 18: 1377-86.

LEA, P.J., BLACKWELL, R.D., JOY, K.W. 1992. Ammonia assimilation in higher plants. *Nitrogen Metabolism of Plants*. Sous la direction de K. Mengel et D.J. Pilbeam. Clarendon Press : Oxford. P. 153-186.

LEE, R.B., RATCLIFFE, R.G. 1991. Observations on the subcellular distribution of the ammonium ion in maize root tissue using *in vivo* ^{14}N-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*. 183: 359-367.

MADORE, M.A., LUCAS, W.J. 1989. Transport of photoassimilates between leaf cells. *Transport of Photoassimilates*. Sous la direction de D.A. Baker et J.A. Milburn. Longman Scientific & Technical : Essex. p. 49-78.

MALBOOBI, M.A., HANNOUFA, A., TREMBLAY, L. LEFEBVRE, D.D. 1999. Toward an understanding of gene regulation during the phosphate-starvation response. *Phosphorus in plant biology : Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes*. Sous la direction de J.P Lynch et J. Deikman, Current Topics in Plant Physiology: an American Society of Plant Physiologist Series. Rockville, MD. P. 215-216.

MALUCELLI, M.I., NIERO, R., LUCCHIARI, P.H., SOUZA, M.D., BRUZZO, D., ALVES, R.C., MIGUEL, O., BACILA, M. 1995. Evaluation of the polarographic technique for assay of the viability of freeze-dried BCG vaccine: II. Viability of the vaccine assessed by polarography, Warburg respirometry and colony counting. *Vaccine*. 13: 273-278.

MANTELL S.H., SMITH H. 1983. Cultural factors that influence secondary metabolites accumulations in plant cell and tissue cultures. *Plant Biotechnology*. Sous la direction S.H. Mantell et H. Smith. Society for Experimental Biology Seminar Series 18. Cambridge University Press : Cambrige:. p. 75-108.

MARSILLI-LIBELLI, S., VAGGI, A. 1997. Estimation of respirometric activities in bioprocesses. *Journal of Biotechnology*. 52: 181-192.

MARTINOIA E. HECK U. WIEMKEN A. 1981. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature*. 289: 292-293.

McRAE, S.R., CHRISTOPHER, J.T., ANDREW, J., SMITH, C. HOLTUM, J.-A.M. 2002. Sucrose transport across the vacuolar membrane of *Ananas comosus*. *Functional Plant Biology* 29: 717 - 724

MELZER, E., O'LEARY, M. 1987. Anapleurotic fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C_3 plants. *Plant Physiology*. 84: 58-60.

MIFLIN, B.J., LEA, P.J. 1980. Ammonia assimilation. *The Biochemistry of Plants. Volume 5*. Academic Press : New York. P. 169 - 202.

MILLER, A.J., COOKSON, S.J., SMITH, S.J., WELLS, D.M. 2001. The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 514-549.

MILLER, A.J., SMITH, S.J. 1996. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany*. 47: 843-854.

MIMURA, T. 1999. Phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology*. 191: 149-200.

MIMURA, T., DIETZ, K.-J., KAISER, W., SCHRAMM, M.-J,. KAISER, G.,. HEBER, U. 1990. Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* 180: 139-146.

MIZUKAMI, H., KONASHIMA, M., TABATA, M. 1977. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus cultures. *Phytochemistry*. 16: 1183-1186.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

MURCHIE, E.H., FERRARIO-MÉRY, S., VALADIER, M.-H., FOYER, C.H. 2000a. Short-term nitrogen induced modulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco and maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1349-1356.

MURCHIE, E.H., CHEN, Y., HUBBART, S., PEN, S., HORTON, P. 2000b. Interactions between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice. *Plant Physiology*. 119: 553–563.

NASH, D.T., DAVIES, M.E. 1972. Some aspects of growth and metabolism of Paul's scarlet rose cell suspension. *Journal of Experimental Botany*. 23: 75-91.

NEUHAUS, H.E., EMES, M.J. 2000. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. Annual *Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 111-140.

NEWBURY, H.J., POSSINGHAM, J.V. 1977. Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds. *Plant Physiology*. 60: 543–547.

NICHOLOSO, F.T., VAL, J., VAN DER KEUR, M., VAN IREN, F. KIJNE, J. 1994. Flow cytometric cell counting and DNA estimation for the study of plant cell population dynamics. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 39: 251-259.

NURSE, P. 1985. The genetic control of cell volume. *The Evolution of Genome Size*. Sous la direction de T. Cavalier-Smith. John Wiley & Sons : Chichester, UK. P. 185–196.

OEXLE, H., GNAIGER, E., WEISS, G. 1999. Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. 1413: 99-108.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) International. 1997. Method 972.43. 16th AOAC International., Arlington. VA

OHLROGGE, J.B., JAWORSKI, J.B. 1997. Regulation of fatty acids synthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 109-136.

OKAZAKI, M., HINO, F., KOMINAMI, K., MIURA, Y. 1982. Effects of plant hormones on formation of scopoletin and scopolin in tobacco tissue cultures. *Agricultural Biological Chemistry*. 46: 609-614.

OLSSON, G. HANSSON, O. 1976. Stochastic modelling and computer control of a full scale wastewater treatement plant. *Symposium on models in air and water pollution.* The Institute of Measurement and Control : London. P. 22-24.

OZTURK, S.S., BLACKIE, J., WU, P., TATICEK, R., KONSTANTINOV, K., MATANGUIHAN, C., TSAI, Y., YOON, S., THRIFT, J., NAVEH, D. 1996. On line monitoring for consistent and optimal production of biologicals from mammalian cells fermentation. *Animal cell technology*. Sous la direction de M. Corrando. Kluwer : Nederlands.

PAJUELO, P., PAJUELO, E., FORDE, B.G., MARQUEZ, A.J. 1997. Regulation of the expression of ferredoxin-glutamate synthase in barley. *Planta*. 203: 517-525.

PANOV, A., SCARPA, A. 1996. Mg2+ Control of respiration in isolated rat liver mitochondria. *Biochemistry*. 35: 12849-12856.

PAUL, M.J., STITT, M. 1993. Effect of nitrogen and phosphorous deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant, Cell and Environment*. 16: 1047-1057.

PLAXTON, W.C. 1999. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes*. Sous la direction de J.P. Lynch et J. Deikman. Current topics in plant physiology: American Society of Plant Physiologist. Rockville, MD; P. 164-176.

PREISS, J. 1991. Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulations. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. 7: 59-114

PREISS J, SIVAK M. 1998. Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis. *Genetic Engineering*. Sous la direction de J.K. Setlow. Plenum Press : New York. P. 177-223.

QUICKER, G., SCHUMPE, A., KÖNIG, B., DEKWER, W.D. 1981. Comparison of measures and calculated oxygen solubilities in fermentation media. *Biotechnology &. Bioengineering*. 23: 635-650.

RAGHOTHAMA, K.G. 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review Physiology Plant Molecular Biology*. 50: 665-693.

RAGHOTHAMA, K.G., MUCHHAL, U.S., KIM, D.H., BUCHER, M. 1999. Molecular regulation of plant phosphate transporters. *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes*. Sous la direction de J.P. Lynch et J. Deikman. Current topics in plant physiology: American Society of Plant Physiologist. Rockville, MD. P. 271-280.

RAGO, R., MITCHEN, J., WILDING, G. 1990. DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by cell lysis by freezing in distilled water. *Analytical Biochemistry*. 191: 31–34.

RATCLIFFE, R.G., 1996. In vivo RMN spectroscopy: Biochemical and Physiological applications to Plants. *Nuclear Magnetic Resonance in Plant Biology*. Sous la direction de Y. Shachar-Hill et P.E. Pfeffer. American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, USA. Vol. 16, p. 1.

REID, R. MIMURA, T. SMITH, A. 1999 Phosphate/sodium symport in *Chara Coranilla*: A Hybrid ATPase? *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes*. Sous la direction de J.P Lynch et J. Deikman. Current Topics in Plant Physiology: American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD; P. 367-369.

RHODES, M.J.C., PARR, A.J., WALTON, N.J. 1997. Studies of secondary metabolic pathways in transformed roots. *Hairy roots – Culture and applications*. Sous la direction de P. Doran. Harwood Academic : Amsterdam. p. 31.

RIJHWANI, S.K., HO, C.H., SHANKS, J.V. 1999. *In vivo* ^{31}P and multilabel ^{13}C NMR measurements for evaluation of plant metabolic pathways. *Metabolic Engineering*. 1: 12-25.

ROBERTS, J.K., JARDETZKY, O. Monitoring of cellular metabolism by NMR. *Biochimie Biophysica Acta*. 639: 53-76.

ROBINSON, S.A., SLADE, A.P., Fox, G.G., PHILLIPS, R., RATCLIFFE, R.G., STEWART, G.R. 1991. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiologist*. 95: 509-516.

ROBY, C., MARTIN, J.B., BLIGNY, R., DOUCE, R. 1987. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. *The Journal of Biological Chemistry*. 262: 5000-5007.

RODRIGUEZ 1999. *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes.* Sous la direction de J.P Lynch et J. Deikman. Current Topics in Plant Physiology: American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD; Vol. 19, p. 354.

ROSCHER, A., LYNDON, E., RAYMOND, P. ROBY, C. 1998. Unidirectional steady state rates of central metabolism enzymes measured simultaneously in a living plant tissue. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 25053-25061.

RYE, H.S., DABORA, J.M., QUESADA, M.A., MATHIES, R.A., GLAZER, A.N. 1993. Fluorometric Assay Using Dimeric Dyes for Double- and Single-Stranded DNA and RNA with Picogram Sensitivity. *Analytical Biochemistry*. 213: 144-150.

SAKUTA, M., TAKAGI, T., KOMAMINE, A. 1987. Effects of nitrogen source on betacyanm accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum*. 71: 459-463.

SASSE, F., HECKENBERG, U., BERLIN, J. 1982. Accumulation of ß-carboline alkaloids and serotonin by cell cultures of *Peganum harmala* L. *Plant Physiology*. 69: 400-404.

SCHEIBLE, W.R., GONZALEX-FONTES, A., LAUERER, M., MÜLLER-ROBER, B., CABOCHE, M., STITT, M. 1997. Accumulation of nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell*. 9: 783-798.

SCHEIBLE, W.R., KRAPP, A., STITT, M. 2000. Reciprocal changes of phosphenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment*. 23: 1155–1167.

SCHEID, O.M., JAKOVLEVA, L., AFSAR, K., MALUSZYNSKA, J., PASZKOWSKI., J. 1996. A change of ploidy can modify epigenetic silencing. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93: 7114-7119.

SCHRIPSEMA, J. 1991. Thèse de doctorat de l'université de Leiden (NL) intitulée: *Factors involved in the production of Tabernaemontana divaricata plant cell suspension cultures.*

SCHWARZACHER, T., WANG, M.L., LEITCH, A.R., MILLE, N., MOORE, G., HESLOP-HARRISON, J.S. 1997. Flow cytometric analysis of the chromosomes and stability of a wheat cell culture line. *Theoretical and Applied Genetics.* 94: 91-97.

SCOWCROFT, W.R., BRETTELL, R.I.S., RYAN, S.A., DAVIES, P.A. PALLOTTA, M.A. 1987. Somaclonal variation and genomic flux. *Plant Tissue and Cell Culture, Plant Biology Vol. 3.* ESous la direction de C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett et D.D.Biesboer. ARL : New York. P. 275-286.

SCRAGG, A.H., ASHTON, S., YORK, A., BOND, P., STEPAN-SARKISSIAN, G., GREY, D. 1990. Growth of Catharanthus roseus suspensions for maximum biomass and alkaloid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 12: 292-298.

SHERI, A., BRANDENBUR,G., WILLIAMSON, C.L., SLOCUM, R.D. 1998. Characterization of a cDNA Encoding the Small Subunit of Arabidopsis Carbamoyl Phosphate Synthetase. *Plant Physiology.* 117: 717-720.

SHULER, M. L., KARGI, F. 1992. *Bioprocess engineering : basic concepts.* Prentice Hall : Englewood Cliffs, New Jersey.

SIDDIQI, M.Y., GLASS, A.D.M., RUTH, T.J. 1991. Studies on the uptake of nitrate in barley: III. Compartmentation of NO_3^-. *Journal of Experimental Botany.* 42: 1455-1463.

SINGER, V.L., JONES, L.J., YUE, S.T., HAUGLAND, R.P. 1997. Characterization Of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution

Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *Analytical Biochemistry*. 249: 228-238.

SMITH, A.M., DENYER, K., MARTIN, C. 1997. The Synthesis of the Starch Granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 67-87.

SONG, K., LU, P., TANG, K., OSBORN, T. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 92: 7719-7723.

SPERL, W., SKLADAL, D., GNAIGER, E., WYSS, M., MAYR, U., HAGER, J., GELLERICH, F.N. 1997. High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 174: 71-78.

STEINLECHNER-MARAN, R., EBERL, T., KUNC, M., MARGREITER, R., GNAIGER, E. 1996. Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. *American. Journal. Physiology - Cell Physiology*. 40: C2053-C2061.

STEINLECHNER-MARAN, R., EBERL, T., KUNC, M., SCHROCKSNADEL, H., MARGREITER, R., GNAIGER, E. 1997. Respiratory defect as an early event in preservation-reoxygenation injury of endothelial cells. *Transplantation*. 63: 136-142.

STEURER, W., STADLMANN, S., ROBERTS, K., FISCHER, M., MARGREITER, R., GNAIGER, E. 1999. Quality Assessment of Isolated Pancreatic Rat Islets by High-Resolution Respirometry. *Transplantation Proceedings*. 31: 650-650.

STEWARD, N., MARTIN, R., ENGASSER, J.M., GOERGEN, J.L. 1999. A new methodology for plant cell viability using intracellular esterase activity. *Plant cell reports*. 19: 171-176.

STEWARD, N., MARTIN, R., ENGASSER, J.M., GOERGEN, J.L. 1999. Determination of growth and lysis kinetics in plant cell suspension cultures from the measurement of esterase release. *Biotechnology & Bioengineering*. 66: 114-121.

STITT, M., MÜLLER, C., MATT, P., GIBON, Y., CARILLO, P., MORCUENDE, R., SCHEIBLE, W.-R., KRAPP, A. 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 53: 959-970.

SUGIHARTO, B., SUGIYAMA, T. 1992. Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. *Plant Physiology* 98: 1403-1408.

SUN, J.S., GIBSON, K.M., KIIRATS, O., OKITA, T.W. EDWARDS, G.E. 2002. Interactions of nitrate and CO2 enrichment on growth, carbohydrates, and rubisco in Arabidopsis starch mutants. Significance of starch and hexoses. *Plant Physiology* 130: 1573-1583.

TAIZ, L., ZEIGER, E. 1998. *Plant physiology*, 2n^{d} Edition. Sinauer associates. : Sunderland, Massachusets. Pages 435-665.

TAL, B., GRESSEL, J., GOLDBERG, I. 1982. The effect of medium constituents on growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells grown in batch cultures. *Planta Medica*. 44: 111-115.

TOUCHETTE, B.W., J.M. BURKHOLDER. 1999. Phosphorus availability and plant metabolism in a submersed marine angiosperm (*Zostera marina* L.): an ecological perspective. *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes.* Sous la direction de J.P Lynch et J. Deikman. Current Topics in Plant Physiology: American Society of Plant Physiologist. Rockville, MD. P. 309-310.

TRUESDALE, G.A., DOWNING, A.L., LOWDEN, G.F. 1955. The solubility of oxygen in pure water and seawater. *Journal of. Applied Chemistry.* 5: 53-62.

TRULL, M.C., TOMSCHA, J., DEIKMAN, J., 1999. Arabidopsis thaliana mutants defective in the phosphorus starvation response. *Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes.* Sous la direction de J.P Lynch et J. Deikman. Current Topics in Plant Physiology: American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD; P.281-289.

VAN DER LEIF, M., SMITH, S.J., MILLER, A.J. 1998. Remobilization of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta.* 205: 64-72.

VAN GULIK, W. 1990. *Growth kinetics of plant cells in suspension culture.* Ph.D. thesis. Delft University of Technology, Delft, Holland.

VAN QUY, L., FOYER, C., CHAMPIGNY, M.-L. 1991a. Effect of light and NO on wheat leaf phophoenolpyruvate carboxylase activity : evidence for modulation of the C_3 enzyme. *Plant Physiology.* 97: 1476-1482.

VAN QUY, L., LAMAZE, T., CHAMPIGNY, M.-L. 1991b. Short-term effects of nitrate on sucrose synthesis in wheat leaves. *Planta* 185: 53-57.

VANKOVA, R., KUNKOVA, G., OPATRNA, J., SUSSENBEKOVA, H., GAUDINOVA, A., VANEK, T. 2001. Two dimensional spectroscopy – A new tool for the determination of plant cell viability. *Plant Cell Reports*, 20:41-47.

VON ADERKAS, P., PATTANAVIBOOL, R., HRISTOFOROGLU, K. MA, Y. 2003. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte cultures of larch. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 75: 27-34.

VON WIRĚN, N., GAZZARRINI, S., FROMMER, W.B. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*. 196: 191-199.

WALKER, V.K. 1999. Dans : *Phosphorus in plant biology : Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes*. Eds. : J.P Lynch et J. Deikman, Current topics in plant physiology : an American society of plant physiologist series. Vol. 19, p252.

WANG, C., TILLBERG, J.E. 1997. Effects of short-term phosphorus deficiency on carbohydrate storage in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist*. 136: 131-135.

WANG, H.L., LEE, P.D., LIU, L.F. SU, J.C. 1999. Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. *Bot Bull Acad Sin*, 40:219-225.

WHITMER, S., CANEL, C., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 2003. Long-term instability of alkaloid production by stably transformed cell lines of Catharanthus roseus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74: 73-80.

WINDERICKX, R.F., THEVELEIN, J.M. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*. 26: 310-317.

YAMAKAWA, T., KATO, S., ISHIDA, K., KODAMA, T., MINODA, Y. 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry*. 47: 2185-2191.

YEOMAN, M.M. 1987. Techniques, characteristics, properties and commercial potential of immobilized plant cells. *Cell Culture and Somatic Cell genetics 4*. Sous la direction de F. Constabel et I.K. Vasil. Academic Press : New York and London. P. 197-215

YEOMAN, M.M. YEOMAN, C.J. 1996. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist*. 134: 553-569.

YOONG, E.T., LANT, P.A. 2001. Biodegradation of high strength phenolic wastewater using SBR. *Water Science &. Technology*. 43: 299-306.

ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., STOCKIGT, J., WEILLER, E.J., DEUS, B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant tissue culture and its biotechnological applications.* Sous la direction de de W. Barz, E. Reinhard, M.H. Zenk. Springer : Heidelberg/ Berlin / New-York. P. 27-43

ZIMAKOWSKA-GNOINSKA, D., BECH, J. 2000. Estimation of the soil respiration using the constant pressure volumetric respirometer and the flow-through respiromètre. *Environmental Monitoring and Assessment*. 64: 583-590.

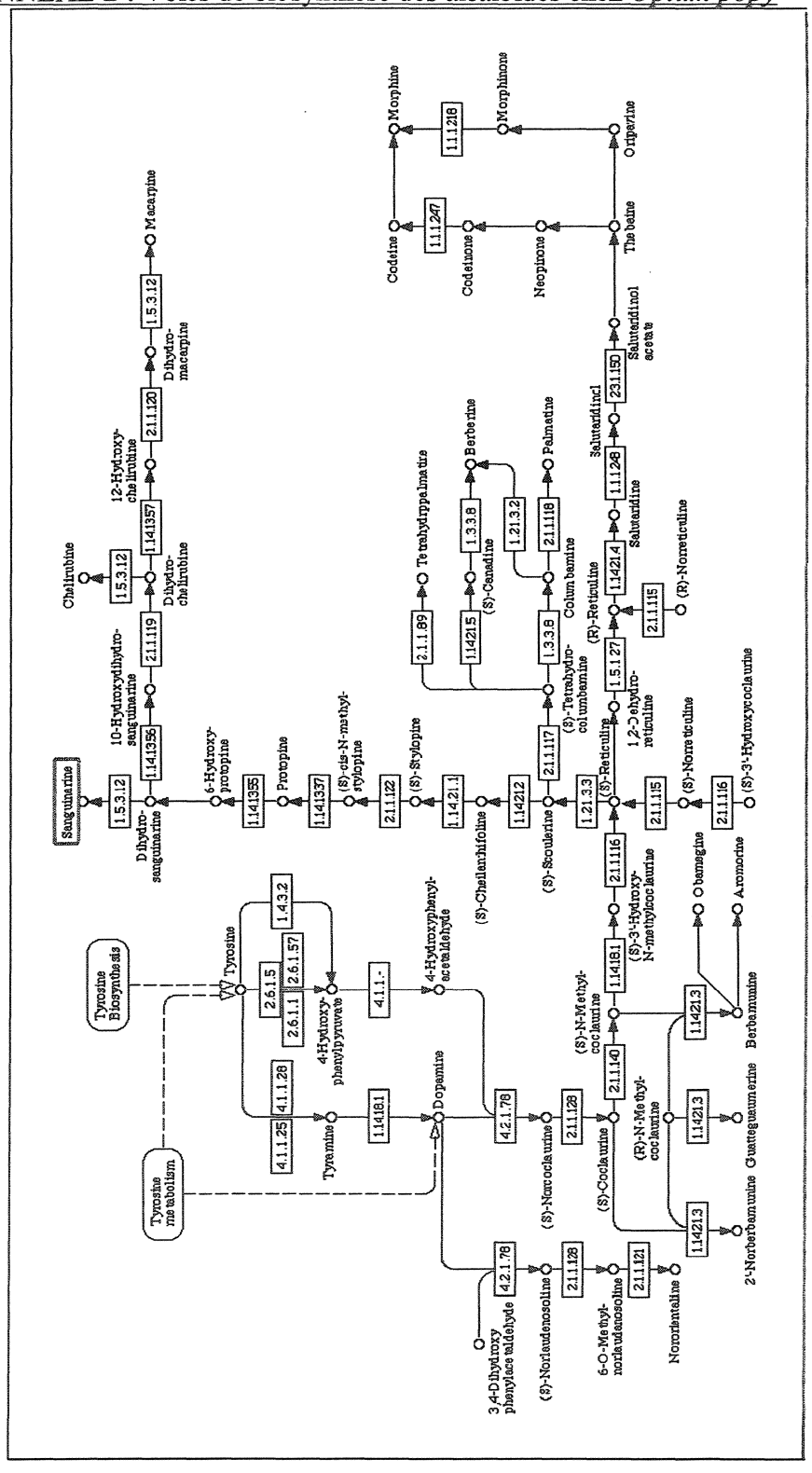
ANNEXES

ANNEXE 1 : Composition des milieux MS et B5

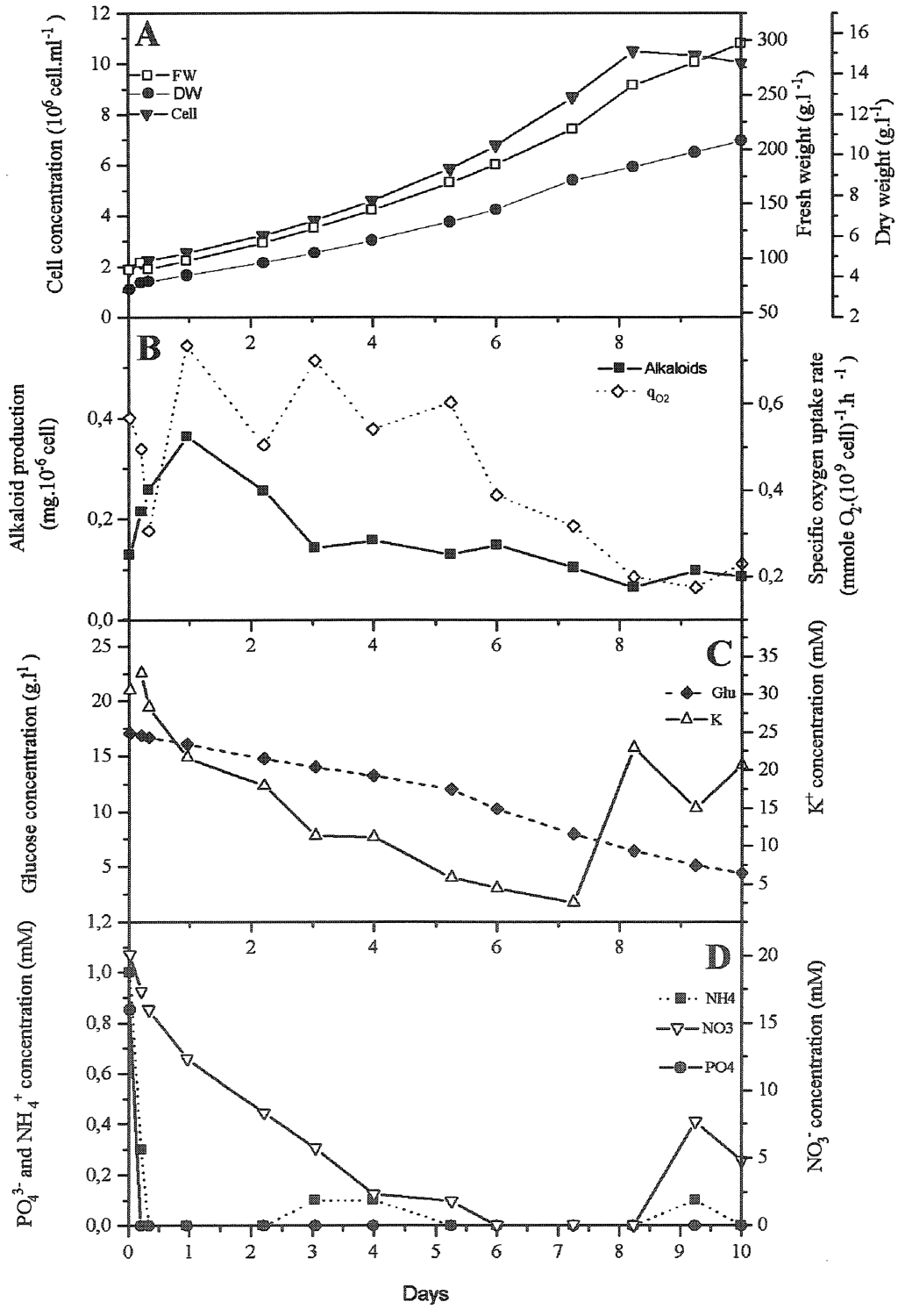
	MS[a]	B5[b]
KNO_3	18.79 mM	24.73 mM
NH_4NO_3	20.61 mM	--
$(NH_4)_2SO_4$	--	1.01 mM
KH_2PO_4	1.26 mM	--
NaH_2PO_4	--	1.09 mM
$CaCl_2$	2.99 mM	1.02 mM
$MgSO_4 7H_2O$	1.50 mM	1.01 mM
$CoCl_2\ 6H_2O$	0.11 µM	0.11 µM
$CuSO_4\ 5H_2O$	0.10 µM	0.10 µM
FeNa EDTA	0.10 mM	0.10 mM
H_3BO_3	0.10 mM	38.52 µM
KI	5.00 µM	4.52 µM
$MnCl_2\ H_2O$	0.10 mM	59.16 µM
$Na_2MoO_4\ 2H_2O$	1.03 µM	1.03 µM
$ZnSO_4 7H_2O$	29.91 µM	6.96 µM
Nicotinic acid	4.06 µM	8.12 µM
Pyridoxin-HCl	2.43 µM	4.86 µM
Thiamine-HCl	0.30 µM	29.65 µM
Myo-inositol	0.56 mM	0.56 mM

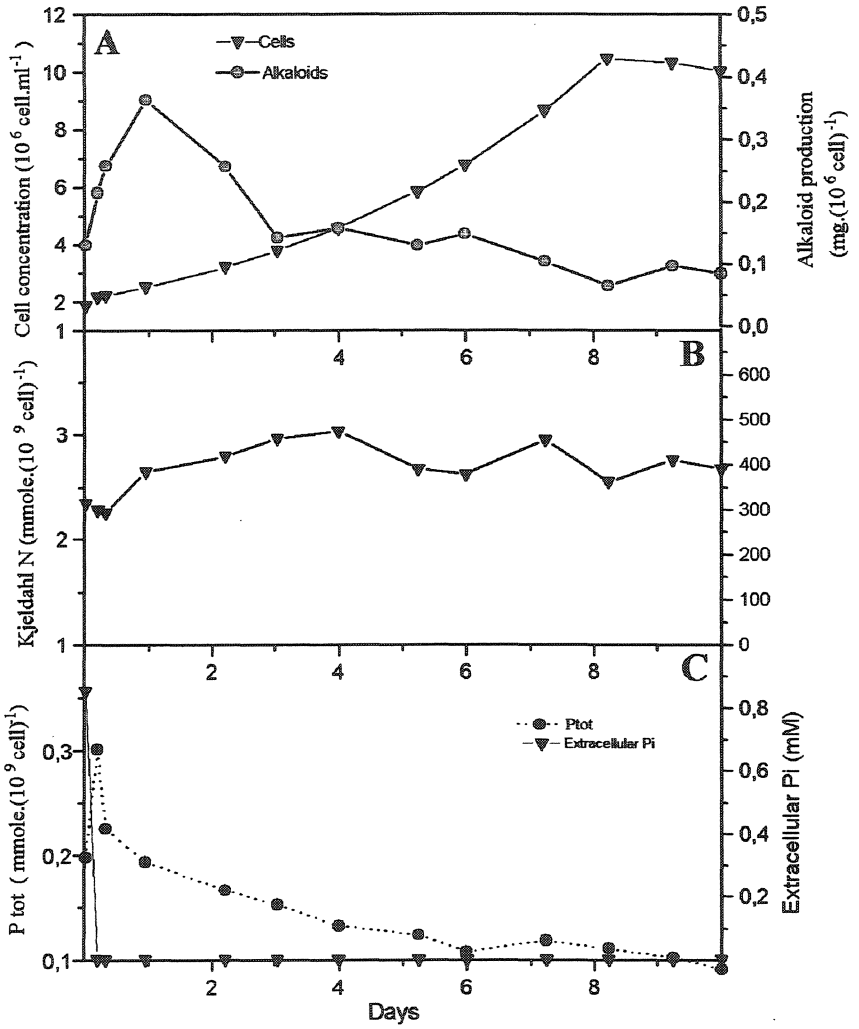
[a] Murashige et Skoog (1962)
[b] Gamborg et col. (1968)

ANNEXE 2 : Voies de biosynthèse des alcaloides chez *Opium popy*

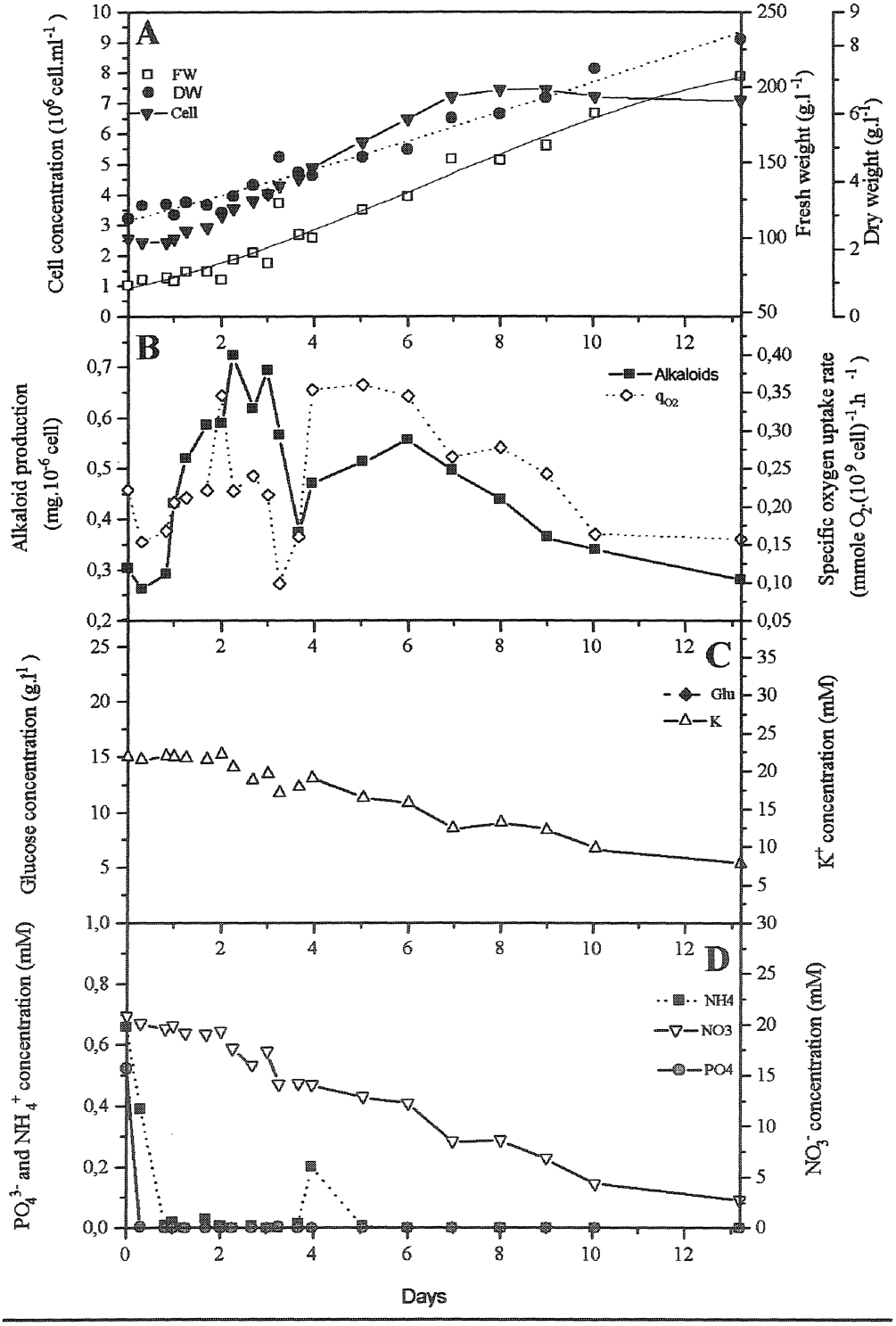


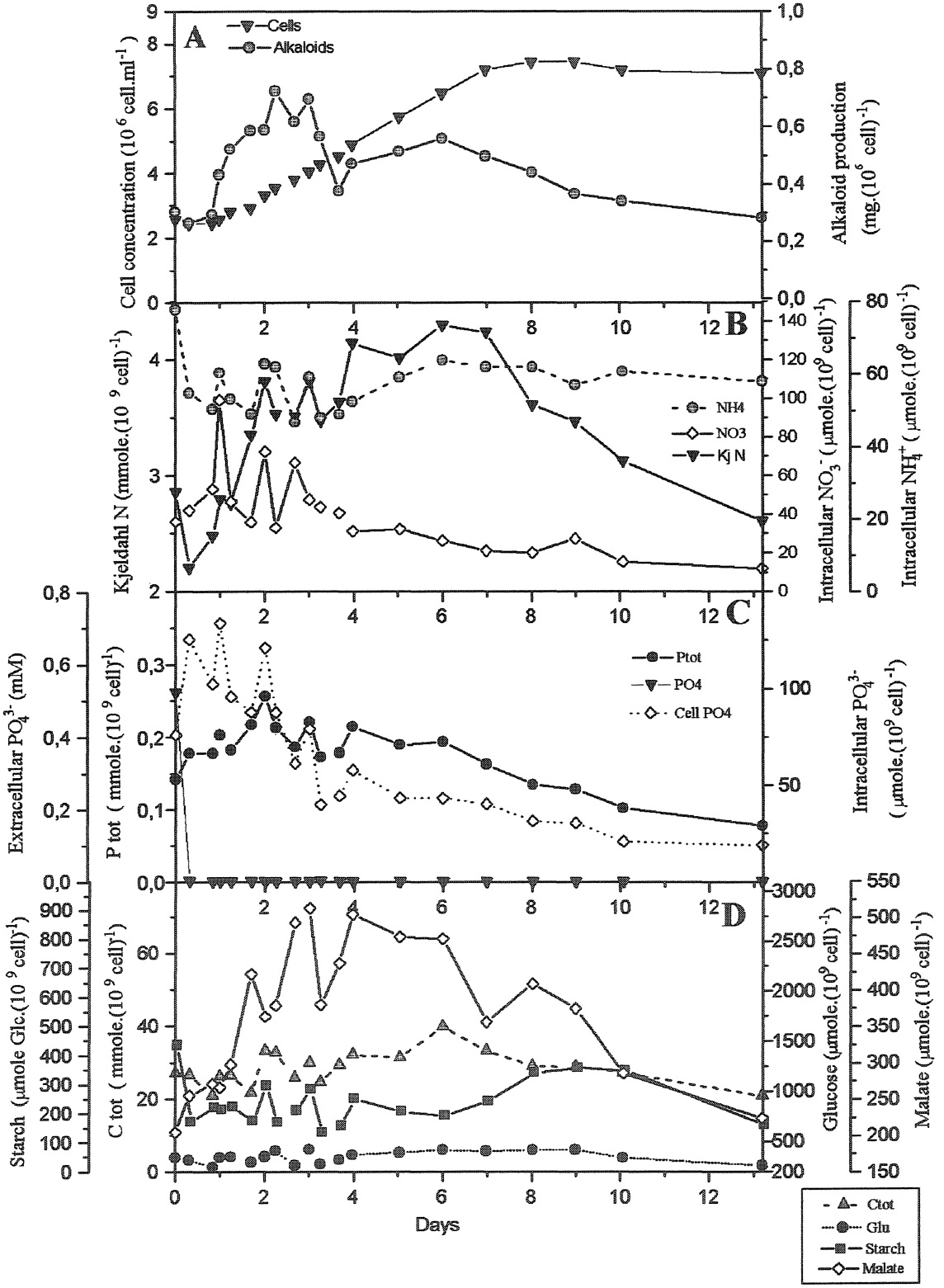
ANNEXE 3: Suivi de la suspension CS1 pendant la durée d'une sous-culture




A
Cells
Alkaloids
Cell concentration (10^6 cell.ml^{-1})
Alkaloid production (mg.(10^6 cell)$^{-1}$)
B
Kjeldahl N (mmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
C
Ptot
Extracellular Pi
P tot (mmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
Extracellular Pi (mM)
Days

ANNEXE 4: Suivi de la suspension CS2 pendant la durée d'une sous-culture




A
Cells
Alkaloids
Cell concentration (10^6 cell.ml^{-1})
Alkaloid production (mg.(10^6 cell)$^{-1}$)
B
NH4
NO3
Kj N
Kjeldahl N (mmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
Intracellular NO_3^- (µmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
Intracellular NH_4^+ (µmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
C
Ptot
PO4
Cell PO4
Extracellular PO_4^{3-} (mM)
P tot (mmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
Intracellular PO_4^{3-} (µmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
D
Ctot
Glu
Starch
Malate
Starch (µmole Glc.(10^9 cell)$^{-1}$)
C tot (mmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
Glucose (µmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
Malate (µmole.(10^9 cell)$^{-1}$)
Days