NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI®

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DES MOYENS DE MODULATION ET SUIVI EN CONTINU PAR FLUORESCENCE DU MÉTABOLISME CELLULAIRE

STEVE HISIGER
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
AOÛT 2004

© Steve Hisiger, 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: 0-612-97952-0
Our file Notre référence
ISBN: 0-612-97952-0

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

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DES MOYENS DE MODULATION ET SUIVI EN CONTINU PAR FLUORESCENCE DU MÉTABOLISME CELLULAIRE

présenté par: HISIGER Steve
en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

Mme DESCHÊNES Louise, Ph.D., présidente
M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et directeur de recherche
M. MATTON Daniel Philippe, Ph.D., membre et codirecteur de recherche
M. GROLEAU Denis, Ph.D., membre

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche Mario Jolicoeur qui m'a accueilli au Québec dès ma descente d'avion puis dans ses laboratoires. Je voudrais le remercier également pour l'aide financière apportée pendant ma maîtrise ainsi que pour ses encouragements pendant mes travaux.

Je remercie mon codirecteur de recherche, Daniel Philippe Matton, qui m'a accueilli dans son équipe pour la réalisation des travaux de biologie moléculaire.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'unité de recherche Bio-P2, à savoir dans le désordre Laurence, Audrey, Maya, Caroline, Mathieu L., Mathieu C., Jingkui, Dora pour leurs discussions enrichissantes et leur soutien moral.

Je remercie aussi Fred qui a été mon complice aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de Polytechnique.

Je tiens à remercier tous mes amis les plus éloignés Fabien, Richard, Ken et Régis qui ont toujours cru en moi.

Enfin, je tiens à remercier Anne qui m'a profondément aidé et soutenu pendant toute la durée de ma maîtrise par ses encouragements, ses conseils, son aide au laboratoire et surtout par sa présence.

Résumé

Les plantes représentent une importante source de composés d'intérêt pour plusieurs secteurs industriels, notamment le domaine pharmaceutique. Leur métabolisme secondaire permet la biosynthèse de composés de structure complexe, difficiles à synthétiser chimiquement. Toutefois, malgré l'avènement de la biotechnologie, la production de ces métabolites secondaires est encore majoritairement effectuée à partir de plantes entières. En dépit d'un développement important des activités de recherche, très peu de succès industriels ont été enregistrés pour la culture *in vitro* de cellules végétales. La connaissance insuffisante des voies de biosynthèse et de leur régulation en est une des causes principales. Ainsi, la vincristine et la vinblastine, deux anticancéreux produits par la plante *Catharanthus roseus*, n'ont toujours pas été produits à ce jour en culture *in vitro*. Au cours du développement d'un procédé industriel visant à produire ces molécules, outre l'augmentation de la productivité, la mise en place de moyens de mesure en temps réel de la production des composés d'intérêt ainsi que du suivi de la biomasse représente une étape essentielle.

Ce projet expose le développement d'une méthode de purification des alcaloïdes de *C. roseus* ainsi que le suivi de différentes cultures cellulaires à l'aide d'une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde. Une modulation du métabolisme secondaire de *C. roseus* en vue de restaurer *in vitro* la voie de biosynthèse de la vinblastine est également présentée.

Le décryptage du métabolisme secondaire nécessite l'identification des molécules qui sont synthétisées. Pour ce faire une méthode analytique a été développée. Ainsi, l'adaptation d'une méthode HPLC à l'analyse par LC-MS a permis d'identifier plusieurs dérivés de la tabersonine dans les cultures de *C. roseus*, comme la löchnericine et l'hörhammericine. Cependant, la présence de composés de masse moléculaire identique a limité l'identification des autres dérivés. Afin de pouvoir purifier ces molécules à partir

d'un extrait brut de racines transformées, une méthode HPLC semi-préparative a été développée. Les fractions ont présenté une grande pureté ($\geq$ 98 %). Cependant, leur faible concentration a empêché une identification des composés indéterminés par RMN.

Afin de disposer d'un système d'étude homogène pour effectuer des mesures de fluorescence en bioréacteur, une suspension cellulaire de *C. roseus* a été développée à partir de racines transformées. Un bioréacteur a été adapté pour répondre aux exigences de la culture de cellules végétales en installant un ruban hélicoïdal double comme agitateur. Le suivi de la culture de cellules en suspension de *C. roseus* en bioréacteur et d'*Eschscholtzia californica* en flacons agités a été effectué grâce à une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde. La fluctuation des conditions environnementales (notamment la variation de la concentration en oxygène dissous) dans la culture en flacons empêche d'utiliser le signal de fluorescence de NAD(P)H comme rapporteur directe de la biomasse. Son utilisation comme indicateur de l'activité métabolique est discutée. Le suivi de la production des alcaloïdes totaux fluorescents d'*E. californica* a été réalisé. Toutefois, la similarité de leurs spectres de fluorescence empêche un suivi individuel de ces composés. Les signaux correspondant au tryptophane, à la tryptamine, aux fluoropohores NAD(P)H et riboflavines (riboflavine et dérivés) ont pu être suivis *in situ* dans la culture de *C. roseus* en bioréacteur. Comme la concentration en oxygène dissous est contrôlée à un point de consigne (60 % de saturation) dans le bioréacteur, la concentration cellulaire a pu être corrélée avec l'évolution du signal de NAD(P)H et de FMN. Cependant, le signal de NAD(P)H diverge fortement après élicitation. La production d'un alcaloïde indéterminé qui fluoresce aux mêmes longueurs d'onde masque ce signal. Bien que la production d'ajmalicine et de serpentine n'ait pas été détectée dans la culture en suspension par la méthode d'analyse HPLC, des essais ont démontré que ces deux alcaloïdes sont quantifiables par la sonde. La mesure de la fluorescence des cellules végétales en suspension apparaît donc comme un outil d'étude non-invasif permettant l'analyse de l'état de la culture en temps réel.

Ce procédé de mesure par fluorescence a été transposé à la production d'une protéine recombinante modèle (GFP) par la levure *Pichia pastoris* et la lignée de cellules animales NSO. Le signal de fluorescence du NAD(P)H a montré une bonne corrélation avec les mesures effectuées avec une autre technique analytique pour la culture de levures. Outre le suivi effectif de la production de GFP, l'évolution de la biomasse pendant la phase de croissance exponentielle a été estimée par mesure des signaux de fluorescence du tryptophane, du NAD(P)H et des riboflavines. Le changement métabolique survenu suite à la modification de la source de carbone pendant la phase de production de la GFP a également été détecté par fluorescence (via le signal de NAD(P)H). En dépit de l'important bruit de fond dû à l'autofluorescence du milieu et du sérum, la synthèse de GFP a pu être suivie dans la culture en bioréacteur de cellules NSO. La présence de composés fluorescents dans le milieu interférant avec les mesures de la sonde, ainsi que la faible concentration cellulaire ($2{,}5.10^6$ cellules par mL), n'ont pas permis de suivre de façon efficace les fluorophores intracellulaires. L'utilisation d'une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde représente un outil adéquat pour la culture des différents types cellulaires dans des milieux définis car elle permet à la fois d'estimer la biomasse et la concentration d'une protéine recombinante qui peut être couplée à la GFP.

L'utilisation de la sonde à fluorescence pour le suivi de cultures *in vitro* de cellules de *C. roseus* produisant les anticancéreux vinblastine et vincristine serait une application industrielle intéressante. Toutefois, ces deux molécules ne sont pas synthétisées dans ce type de culture. Pour faire face à ce problème, une modulation du métabolisme secondaire de *C. roseus* a été également proposée au cours de ce projet. Afin de restaurer la voie de biosynthèse de la vindoline, bloquée dans les cultures *in vitro*, une approche de génie génétique a été entreprise. Dans un premier temps, les gènes codant les deux dernières enzymes de cette voie (*D4H* et *DAT*) qui ne s'expriment que dans les parties aériennes de la plante ont été isolés à partir d'ARN messagers de feuilles. Des constructions génétiques ont été réalisées en plaçant la partie codante de ces gènes

sous le contrôle du promoteur du gène de la strictosidine synthase (*STR1*) qui s'exprime dans les racines et est élicité par l'acide jasmonique. Afin de mettre au point un protocole d'insertion de gènes par *Agrobacterium tumefasciens* dans des racines transformées de *C. roseus*, une construction similaire a été réalisée en remplaçant les gènes des enzymes d'intérêt par celui de la GFP. Malgré plusieurs essais d'optimisation, aucune insertion du transgène n'a été observée. Il serait donc nécessaire d'employer d'autres méthodes de transfection afin de vérifier si l'expression des gènes *DAT* et *D4H* est suffisante pour restaurer la synthèse de vindoline dans des cultures *in vitro*.

Abstract

Plant cells are a source of diverse chemical compounds of interest, especially for pharmaceutical purposes. Secondary metabolism enables the biosynthesis of complicated chemical structures which are difficult to obtain by organic synthesis. In spite of the development of biotechnology, secondary metabolism products are still performed by cultivation of whole plants. Few industrial successes have been recorded for *in vitro* culture. However, research in this area is very active. The insufficient knowledge of metabolic pathways and of their regulation is one of the major reasons for these unsuccessful attempts. Thus, the two anticancer alkaloids vinblastine and vincristine from *Catharanthus roseus*, have not yet been obtained from *in vitro* cultures. The development of real-time monitoring tools for biomass and productivity estimation is an essential step in the achievement of an industrial process, in addition to productivity enhancement.

This project exposes the development of alkaloid purification methods from *C. roseus*. Monitoring of different cell cultures has been investigated using a multiwavelength fluorescence sensor. A modulation of *C. roseus'* secondary metabolism by genetic engineering is also presented and discussed.

Many tabersonine derivative compounds, such as hörhammericine and löchnericine, were purified and identified by both HPLC and LC/MS. However, many unknown molecules still remain and their identification is limited since many of these compounds are similar regarding both their UV spectrum and their molecular weight. A semi-preparative HPLC method was developed to obtain pure fractions from *C. roseus* hairy roots. Nevertheless, the concentrations were not high enough for NMR analysis.

A cell suspension from *C. roseus* hairy roots has been developed to obtain a homogenous system for fluorescence measurements. A bioreactor was adapted for plant cell culture in setting a double helical ribbon impeller to prevent shear stress damages to the cells. *C. roseus* and *Eschscholtzia californica* cell suspensions in bioreactor and in

flasks respectively, were monitored using a multiwavelength fluorescence sensor. *E. californica* flask cultures were limited by environmental fluctuations (especially dissolved oxygen), preventing the use of the NAD(P)H signal as biomass reporter. Its use as an indicator of metabolic activity was discussed. Total fluorescent alkaloids detection was achieved. However, their similar fluorescence spectra prevent individual monitoring. Tryptophan, tryptamine, NAD(P)H and riboflavins fluorescence signals were successfully monitored in the bioreactor culture of *C. roseus.* As the dissolved oxygen concentration was kept constant (60% of oxygen saturation) inside the bioreactor, NAD(P)H and riboflavins signals were correlated with cell concentration. However, the NAD(P)H signal diverged from off-line analysis after elicitation with jasmonic acid. The production of an alkaloid which fluoresces at the same wavelength than that for NAD(P)H was observed. Although serpentine and ajmalicine were not detected in the culture, calibration experiments showed that they could be followed by the fluorescence probe. Fluorescence monitoring represents a non-invasive tool for real-time plant cell monitoring.

The fluorescence process was transposed for recombinant protein (GFP) production monitoring in *Pichia pastoris* yeast culture and NSO mammalian cell culture. For the yeast culture, the fluorescence signal from NAD(P)H matched with off-line data. In addition to on-line GFP production, biomass was estimated from the NAD(P)H, tryptophan and riboflavins signals. Metabolic pathway changed with switching the carbon source from glycerol to methanol. The metabolic response of the yeast cells was detected in real-time by NAD(P)H signal measurements. Despite the fluorescence background of the medium and serum in NSO culture, GFP monitoring was achieved. However, the high fluorescence interference from medium and the low cell concentration ($2,6.10^6$ cells per mL) prevented monitoring of the endogenous fluorophores. By reducing the amount of interferring fluorescent compounds in the medium, the multiwavelength fluorescence sensor should be very useful for different cellular types. Indeed, as demonstrated, it allows for *in situ* biomass and protein production estimation.

Modulation of the secondary metabolism from *C. roseus* was also investigated in this project. In order to restore the vindoline pathway blocked in *in vitro* cultures, a genetic engineering approach was attempted. In a first step, genes encoding the last two enzymes in the vindoline pathway (*D4H* and *DAT*) were isolated from mRNA extracted from leaves. Genetic constructions were established. The cDNAs were placed under the control of the strictosidine synthase promoter (*STR1*), which is active in roots and can be elicited by jasmonic acid. A similar construction using the *STR1* promoter to drive *GFP* gene expression was prepared to develop an *Agrobacterium tumefasciens* mediated transformation protocol. Despite many optimization attempts, no *GFP* gene insertion was observed in *C. roseus* hairy roots. It would be necessary to use other transfection methods in order to check if *DAT* and *D4H* gene expression is sufficient for unblocking the vindoline pathway.

Table des matières

Remerciements ..... **iv**

Résumé ..... **v**

Abstract ..... **ix**

Table des matières ..... **xii**

Liste des tableaux ..... **xv**

Liste des figures ..... **xvi**

Liste des annexes ..... **xx**

Liste des abréviations ..... **xxi**

Chapitre 1 - Introduction **1**

1.1- Problématique 1
1.2- Objectifs 5
1.3- Organisation du projet et du mémoire 6

Chapitre 2 – Revue de littérature **9**

2.1- Métabolisme secondaire des cellules végétales 9
2.2- Modes de culture de cellules végétales pour la production de métabolites secondaires 13
2.2.1- Culture en champs 13
2.2.2- Culture *in vitro* 14
2.2.2.1- Suspension cellulaire 14
2.2.2.2- Cultures de cellules organisées 16
2.3- Induction du métabolisme secondaire 20
2.4- Métabolisme secondaire de *Catharanthus roseus* 28

Chapitre 3 – Développement d'une méthode analytique et adaptation d'un bioréacteur **33**

3.1- Adaptation d'une méthode analytique pour l'étude du métabolisme secondaire de *Catharanthus roseus* par spectrométrie de masse 33
3.1.1- Problématique 33
3.1.2- Objectifs 35
3.1.3- Matériel et méthodes 35
3.1.4- Résultats 39
3.2- Analyse d'un extrait racinaire de *C. roseus* par LC/MS 42
3.2.1- Objectifs : 42
3.2.2- Matériel et méthodes 42
3.2.3- Résultats 42

3.3- Mise au point d'une méthode semi-préparative pour la purification d'alcaloïdes indoles de *Catharanthus roseus* 44
3.3.1- Objectifs 44
3.3.2- Matériel et méthodes 44
3.3.3- Résultats 46
3.4- Adaptation d'un bioréacteur pour la culture de cellules végétales et animales 48
3.4.1- Objectif 48
3.4.2- Matériels et méthodes 48
3.4.3- Résultats 51
Chapitre 4 – Établissement d'une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus* à partir de racines transformées 58
4.1- Introduction 58
4.2- Problématique 59
4.3- Matériel et méthodes 59
4.4- Résultats 61
Chapitre 5 – Suivi de cultures de cellules végétales en suspension par fluorescence *in situ* 66
5.1- Présentation de l'article 66
5.2- Manuscript # 1 68
Plant cell culture monitoring using an *in situ* multi-wavelength fluorescence probe ... 68
5.2.1- Abstract 68
5.2.2- Introduction 69
5.2.3- Materials and Methods 70
5.2.3.1- *Eschscholzia californica* suspension cell culture 70
5.2.3.2- *Catharanthus roseus* suspension cell culture 71
5.2.3.3- Bioreactor design and operation 72
5.2.3.4- Elicitation 72
5.2.3.5- Fluorescence Measurement 73
5.2.3.6- Alkaloids extraction and analysis 73
5.2.3.7- Analysis of *C. roseus* NAD(P)H content 76
5.2.4- Results and Discussion 77
5.2.4.1- Calibration of the multi-wavelength probe 77
5.2.4.2- Monitoring of *E. californica* suspension cell culture 81
5.2.4.3- Monitoring of *C. roseus* suspension cell culture 85
5.2.5- Conclusion 92
5.2.6- Acknowledgments 92
5.2.7- References 92
Chapitre 6 – Suivi de la l'activité métabolique et de la production d'une protéine recombinante par une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde 98
6.1- Présentation de l'article 98
6.2- Manuscrit # 2 100

A Multi-wavelength Fluorescence Probe: Is One Probe Capable for On-Line Monitoring of Recombinant Protein Production and Biomass Activity? 100
6.2.1- Abstract 100
6.2.2- Keywords 101
6.2.3- Introduction 101
6.2.4- Material and methods 103
6.2.4.1- Pichia pastoris 103
6.2.4.2- NSO 104
6.2.4.3- Glycerol analysis 105
6.2.4.4- Off-line NAD(P)H measurement 106
6.2.4.5- In situ Fluorescence Measurement 106
6.2.4.6- Protein extraction and Western Blot 107
6.2.4.7- Off-line fluorescence GFP analysis 108
6.2.5- Results and discussion 109
6.2.5.1- Monitoring of *Pichia pastoris* bioreactor culture 109
6.2.5.2- NSO cell culture 116
6.2.6- Conclusion 120
6.2.7- Acknowledgments 121
6.2.8- References 121
Chapitre 7 – Modification du métabolisme secondaire de racines transformées de *Catharanthus roseus* par génie génétique 126
7.1- État de la recherche 126
7.1.1- Utilisation générique du génie génétique 126
7.1.2- Génie génétique et alcaloïdes 128
7.1.3- Problématique 132
7.2- Choix des éléments cibles de la construction génétique 135
7.2.1- Choix des gènes d'intérêts 136
7.2.2- Choix du promoteur 137
7.2.3- Choix du terminateur 137
7.3- Construction des vecteurs d'expression 138
7.3.1- Matériel et méthodes 138
7.3.2- Résultats 142
7.4- Insertion des gènes clonés dans des racines transformées de *C. roseus* 148
7.4.1- Matériel et méthodes 151
7.4.2- Résultats 152
7.4.3- Conclusion 155
Chapitre 8 – Discussion générale 156
Chapitre 9 – Conclusion et recommandations 164
Bibliographie 167
Annexes 198

Liste des tableaux

Tableau 2.1. Les deux grandes familles de métabolites secondaires 10

Tableau 2.2. Composés végétaux d'intérêts pharmaceutiques 12

Tableau 3.1. Méthode finale de séparation des alcaloïdes indoles de *C. roseus* pouvant être utilisée en LC/MS. 41

Tableau 3.2 Masse des principaux composés présents dans un extrait racinaire de *C. roseus* analysés par LC/MS 43

Tableau 3.3. Coefficients de transfert en oxygène (K_La) obtenus pour les différentes configurations de bioréacteur. 55

Tableau 3.4 OUR et OTR calculés pour les différentes configurations de bioréacteur. 56

Tableau 4.1. Les différents milieux et combinaisons hormonales testés pour l'induction de cals à partir de racines transformées de *Catharanthus roseus*. 60

Tableau 7.1 Exemples de modification du métabolisme secondaire par génie génétique 131

Tableau 7.2. Démarche expérimentale des étapes d'isolement des gènes et de construction des vecteurs d'expression 138

Tableau 7.3 Résultats des essais de transformation avec p1302-str1 153

Liste des figures

Figure 2.1. Culture *in vitro* pour la production de métabolites secondaires 19

Figure 2.2. Mécanismes d'élicitation d'une cellule végétale. 27

Figure 2.3 Voie de biosynthèse simplifiée des principaux alcaloïdes de *Catharanthus roseus*. 29

Les réactions sont indiquées par des flèches. Les flèches en traits discontinus indiquent une succession de réactions. (Adapté de Meijer et al., 1993c) 29

Figure 3.1 Courbe de Van Deemter (H en fonction de υ)..... 37

Figure 3.3 À gauche : Capacités de pics en fonction du nombre de plateaux théoriques. À droite : capacité de pics en fonction du temps de gradient. 39

Figure 3.2 Nombre de plateaux théoriques (N) calculés en fonction du débit avec un gradient linéaire de 20 minutes. 40

Figure 3.4 Chromatogramme HPLC d'un extrait racinaire de *C. roseus* séparé par la méthode semi-préparative..... 46

Figure 3.5 : Schéma du bioréacteur dans la configuration pour la culture de levures 52

Figure 3.6 : Schéma du bioréacteur dans la configuration pour la culture de cellules animales. 53

Figure 3.7 : Schéma du bioréacteur dans la configuration pour la culture de cellules végétales. 54

Figure 4.1 Pourcentage de formation de cals en fonction du milieu utilisé. 62

Figure 4.2 Développement de racines transformées de *C. roseus* sur milieu solide après 30 jours de culture. 64

Figure 4.3: Courbe de croissance de la lignée CR1..... 65

Sample analysis 73

Figure 5.1. Fluorescence spectra of benzophenanthridine alkaloids. 78

Figure 5.2. : Fluorescence spectra of *C. roseus* metabolites using the multi-wavelength fluorescence probe. 80

Figure 5.3. Fluorescence signals from *E. californica* culture. 82
Figure 5.4. Fluorescence signal corresponding to alkaloids from *E. californica* culture. 84
Figure 5.5. Estimation of *C. roseus* biomass by fluorescence signals. 87
Figure 5.6. A: Total NAD(P)H concentration in the *C. roseus* culture 88
Figure 5.7 Fluorescence signal of TIAs precursors from C. roseus. 89
Figure 5.8. Alkaloids from C.roseus culture determined off-line by HPLC analysis 91
Figure 6.1. *Pichia pastoris* two-phase culture. 110
Figure 6.2. On-line fluorescence measurement for three *Pichia pastoris* fluorophores used for biomass estimation during exponential growth phase..... 111
Figure 6.3. NAD(P)H fluorescence signal (330/450 nm) from *Pichis pastoris* culture 113
Figure 6.4. A. GFP production of the *Pichia pastoris* cell culture 115
Figure 6.5. Growth curve of NSO cell culture..... 116
Figure 6.6. Fluorescence signals for on-line estimation of NSO cell concentration. 119
Figure 6.7. GFP production in NSO cell culture..... 120
Figure 7.1. Voie de synthèse de la strictosidine. 129
Figure 7.2 Schéma métabolique de la biosynthèse de vindoline 134
Figure 7.3 Optimisation de la concentration en sels Mg^{2+} pour l'amplification des ADNc des gènes *D4H* et *DAT* 143
Figure 7.4. Vérification des constructions par digestion enzymatique 144
Figure 7.5. Vérification de la construction pBK-str1-dat par PCR 145
Figure 7.6. Détail des constructions pBK-str1-dat et pBK-str1-D4h. 146
Figure 7.7 Digestion SalI/NcoI de p1302-str1 147
Figure 7.8 Schéma du T-DNA de la construction p1302-Str1 147
Figure 7.9. Principe de l'insertion d'un transgène par le système binaire *d'A. tumefasciens*. 150
Figure A.1 Analyse HPLC d'un extrait racinaire de Catharanthus roseus. 198

Figure A2 Analyse HPLC d'un extrait racinaire de Catharanthus roseus. **199**
Figure A.3 Élution séquentielle des composés présents dans un extrait racinaire de *C. roseus* après séparation sur colonne extractive SPE C18. ..... **200**
Figure A.4 Analyse de pureté du composé T1 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*. **202**
Figure A.5 Analyse de pureté du composé T2 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus* **203**
Figure A.6 Analyse de pureté du composé R1 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*. **204**
Figure A.7 Analyse de pureté du composé T3 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*. **205**
Figure A.8 Analyse de pureté du composé Tabersonine après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*. **206**
Figure A.9 Analyse de pureté du composé T4 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*. **207**
Figure B.1. Séquence protéique et séquence codante du gène de la D4H de *C. roseus*. **209**
Figure B.2. Séquence protéique et séquence codante du gène de la DAT de *C. roseus*. **210**
Figure B.3 Séquence nucléotidique du promoteur *STR 1* de la strictosidine synthase de *C. roseus*. **211**
Figure B.4. Carte de restriction du plasmide pBK-CMV **212**
Figure B.5. Carte de restriction du T-DNA du plasmide pCambia-1302 ..... **213**
Figure B.6. Séquençage de la construction p1302-Str1 avec l'amorce sens du promoteur *STR1* **214**
Figure D1. Spectre de fluorescence 2-dimensions (excitation / emission) de racines transformées de C. roseus après 72 h d'élicitation à l'acide jasmonique à 25 mg/L. **216**

Figure D2. Spectre d'émission de fluorescence des racines, de la tryptamine pure et de la serpentine pure pour une excitation à 270 nm..... 217

Liste des annexes

Annexe A. Adaptation d'une méthode HPLC pour l'identification de composés inconnus synthétisés par des racines transformées de *Catharanthus roseus* 198

Annexe A.1 Protocole de séparation d'alcaloides d'un extrait racinaire de *C. roseus* par élution séquentielle sur colonne SPE C18..... 201

Annexe B. Modification du métabolisme secondaire de *C. roseus* par Génie Génétique 208

Annexe C. Mesures de fluorescence 2D de racines transformées de *C. roseus* 215

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Partie codante d'un gène

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

D4H : Désacétoxyvindoline-4-hydroxylase

DAT : Déacétylvindoline-4-O-acétyltransférase

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

ESI : Ionisation par « electrospray »

G10H : Géraniol-10-hydroxylase

GFP : Protéine autofluorescente émettant dans la région verte du spectre visible

H : Hauteur d'un plateau théorique

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

IPP : Isopentényl pyrophosphate

Kla : Constante de transfert de matière

L : Longueur de la colonne

LB : Milieu défini par Luria et Bertani

LC/MS : Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

M3P3S : Milieu minimum contenant 3 fois la concentration en phosphate et saccharose

MMLV : Virus de la leucémie de Moloney

MS : Milieu défini par Murashige et Skoog

N : Nombre de plateaux théoriques

NAA : Acide α-naphtalénique

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NMT : 16-méthoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine-N-méthyl transférase

OTR : Taux de transfert d'oxygène

OUR : Taux de consommation d'oxygène par les cellules

P_c : Capacité de pics

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

pH : Potentiel hydrogène

Pwo : ADN polymérase de *Pyrococcus woesei*

RH : Réponse hypersensible

RHD : Ruban hélicoïdal double

Ri-T-DNA : Plasmide *d'Agrobacterium rhizogenes* transféré à la plante et induisant la maladie des racines chevelues

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Espèces oxygène réactives

Rpm : Rotations par minute

SM : Spectrométrie de masse

SPE : Extraction sur phase solide

STR1 : Strictosidine synthase

T16H : Tabersonine-16-hydroxylase

TDC : Tryptophane décarboxylase

T-DNA : ADN d'*Agrobacterium* transféré à la plante

T_g : Durée du gradient

UV : Rayons ultra-violets

$w_{1/2}$: Largeur du pic à mi-hauteur

Chapitre 1 - Introduction

Depuis des millénaires, l'Homme a su tirer parti des végétaux qui l'entourent. Son existence est irrémédiablement reliée à celle des plantes. Par l'action d'un métabolisme particulier qu'est la photosynthèse, les végétaux fournissent l'oxygène indispensable à sa survie. Au cours de l'Évolution, l'Homme a acquis des connaissances lui permettant d'utiliser les plantes à son intérêt. Il s'est servi de leurs fruits comme source de nourriture, puis a peu à peu réussi à domestiquer certaines espèces et à apprendre à les cultiver. C'est le début de l'agriculture. Les différentes espèces végétales nécessitent chacune des conditions de culture particulières qui déterminent leur croissance. De source de nourriture, les plantes se sont révélées par la suite d'un énorme intérêt médicinal. En effet, elles synthétisent de nombreuses molécules complexes ayant démontré un formidable potentiel pharmaceutique.

1.1- Problématique

La culture de cellules végétales pourrait jouer au cours des prochaines années un rôle industriel important. En effet, ces cellules peuvent être utilisées pour la synthèse de composés naturels d'intérêt, mais peuvent également servir de plate-forme pour la production de protéines recombinantes.

Si de nombreux composés d'origine végétale sont à ce jour connus et commercialisés, le potentiel de production de molécules présentant un intérêt médical reste encore à découvrir. En effet, la plupart sont issues du métabolisme secondaire de la plante. Cela signifie que ces molécules n'ont pas une implication directe dans la croissance, contrairement au métabolisme primaire. Ainsi, leur synthèse n'est pas essentielle pour le développement de la plante mais entre en jeu dans les mécanismes de défense ou d'attraction (e.g. pigments). De plus, chaque molécule synthétisée est parfois

unique à une espèce, ce qui démontre la quantité de principes actifs étant à découvrir quand on sait qu'il reste encore de nombreuses espèces inconnues. Même pour les espèces référencées et dont l'intérêt a été démontré, les voies de synthèse sont complexes et nombreuses. Aussi, l'inventaire de tous les composés produits par une seule espèce ne peut être envisageable à ce jour. Depuis une trentaine d'années, la recherche dans le domaine végétal a pris un essor considérable et s'est fait une place dans le domaine des biotechnologies. Bien que la quasi-totalité des molécules d'origine végétale sur le marché soient produites en champ, la culture i*n vitro* devient une alternative des plus attractives, même si très peu de succès industriels sont à ce jour référencés. En effet, il est tout-à-fait possible de cultiver des cellules végétales en suspension ou sous forme de tissus en bioréacteurs. Bien que ces derniers furent développés pour la culture d'espèces microbiennes, ils ont depuis été adaptés pour la culture de types cellulaires variés : cellules d'insectes, mammifères et végétales. Leurs avantages par rapport à la culture en champ ou en serre sont nombreux. Ils permettent la culture dans un environnement contrôlé. Les paramètres environnementaux (pH, O_2, température...) et nutritionnels sont critiques pour le développement cellulaire et la production des composés d'intérêt. De plus, comme la plupart des composés d'intérêt pharmaceutique sont issus du métabolisme secondaire, les conditions de production sont généralement différentes des conditions idéales pour la croissance (Tom et al., 1991, Raval et al., 2003). Outre la culture avec des paramètres physico-chimiques contrôlés, la culture en bioréacteur s'effectue sous asepsie. La configuration des systèmes en milieu fermé ainsi que des pratiques de manipulation rigoureuses permettent de limiter le développement à la seule espèce désirée à l'intérieur du bioréacteur. En plus du fait qu'une contamination par un pathogène peut détruire la culture, la présence d'organismes étrangers peut être fatale à l'innocuité du produit si celui-ci est destiné à être injecté au sein d'un organisme humain.

Les cellules végétales ont donc un intérêt économique indéniable pour leur capacité à synthétiser des molécules de structures complexes, comparativement à la synthèse chimique. De plus, mise à part la synthèse des composés endogènes, le

développement du génie génétique et des technologies de l'ADN recombinant a remis récemment les cellules végétales au premier plan. Depuis les années 80, l'insertion et l'expression de gènes étrangers à l'intérieur d'une espèce hôte ont ouvert une nouvelle voie au développement des biotechnologies. Les essais de production de protéines humaines par des microorganismes se sont révélés un succès (Fieschko et al., 1987, Roddie et Ludlamm 1997, Ishikawa et al., 1999). Cependant, les limites ont très vite été atteintes avec les systèmes de production initialement utilisés. Il est tout à fait intéressant d'insérer le gène exprimant une protéine d'intérêt dans une bactérie, puis d'utiliser la forte capacité d'amplification cellulaire de ces organismes pour produire la protéine exogène. Cependant, la qualité de la protéine humaine synthétisée n'est souvent pas adéquate et les modifications post-traductionnelles insatisfaisantes. Il est alors nécessaire d'avoir recours à une cellule eucaryote, telle qu'une levure, une cellule animale ou végétale. Les levures présentent un patron de glycosylation différent des cellules humaines, ce qui peut affecter l'activité de la protéine ou provoquer des réactions immunogènes. La culture de cellules animales représente une alternative pour l'expression de protéines recombinantes destinées à des fins thérapeutiques. Toutefois, le coût des milieux de culture est très important et il est parfois difficile de s'assurer qu'aucun virus transférable à l'Homme n'a contaminé le produit final. Les cellules végétales apparaissent donc comme un système d'expression potentiel car la qualité des modifications post-traductionnelles des protéines est proche du système animal, aucun virus d'origine végétale n'a été démontré comme pouvant parasiter l'être humain et les milieux de culture sont très abordables. Leur coût est environ 50 fois moins élevé que celui des milieux pour cellules animales.

Depuis plusieurs années, l'unité de recherche en bioprocédés BioP^2, et maintenant la chaire de recherche en développement d'outils de génie métabolique, étudient les relations entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaires de cellules végétales cultivées en suspension ou sous forme de racines transformées. *Eschscholtzia californica* et *Catharanthus roseus* sont les deux espèces modèles retenues à ce jour.

Elles possèdent la capacité de synthétiser des molécules d'intérêt pharmaceutique. *E. californica* produit la sanguinarine, un anti-bactérien utilisé en hygiène dentaire dont le rôle anti-tumoral a aussi été démontré, de même que la chélérythrine (Ahmad et al, 2000, Weerasinghe et al., 2001). Les molécules d'intérêt médical synthétisées par *C. roseus* sont essentiellement les deux anti-cancéreux vinblastine et vincristine ainsi que les anti-hypertenseurs ajmalicine et serpentine. L'optimisation de la production de tels composés au sein de cultures *in vitro* nécessite une connaissance approfondie des voies de biosynthèse. La mise au point de modèles nutritionnels et métaboliques est une approche préconisée par la chaire de recherche. Ceci a pour objectif final l'augmentation du rendement de la production des molécules d'intérêt. Une meilleure compréhension du métabolisme impose la mise en place d'outils métaboliques fiables. La culture en bioréacteur représente un système d'observation idéal car les paramètres de croissance peuvent être contrôlés à partir de points de consigne définis. Cependant, il est difficile d'accumuler des données analytiques sur l'état de la biomasse et le niveau de production en quantité et en qualité suffisantes. En effet, les techniques analytiques actuelles nécessitent la prise d'échantillons puis l'extraction des métabolites avant leur analyse. Des artéfacts peuvent alors apparaître puisque les composés ne sont plus dans leur environnement naturel. Pour contourner ces inconvénients, des outils de diagnostic des cultures en temps réel doivent être développés. Ainsi, l'unité de recherche a reçu le titre de chaire de recherche du Canada sur le développement d'outils de génie métabolique. Cette reconnaissance a permis la mise en place d'un mini-bioréacteur pour l'acquisition de données de résonance magnétique nucléaire en continu pendant la culture (Gmati et al., 2004).

L'utilisation de méthodes d'analyse non-invasives comme les méthodes optiques est également une voie de recherche favorisée par l'émergence de nouvelles technologies, notamment en fluorescence. Une telle approche représente un potentiel important de découverte. En effet, les techniques non-invasives donnent accès à de nouvelles données recueillies dans un contexte biologique réel. Parmi celles-ci, la fluorescence est une des plus étudiées. Elle présente à la fois une sensibilité permettant de détecter des molécules

en faible quantité (de l'ordre du micromolaire) et une spécificité définie par les spectres de fluorescence caractéristiques de chacune des molécules. Plusieurs métabolites de *C. roseus* ou *E. californica* présentent un caractère autofluorescent qui permettrait leur détection à l'intérieur de cellules vivantes et donc l'estimation de la production en temps réel, au cours de la culture.

La détermination des points clés dans les métabolismes primaire et secondaire permettrait de mieux comprendre et de modifier les voies de biosynthèse en privilégiant les flux menant au composé d'intérêt. Il s'agit alors soit d'augmenter ou de diminuer l'intensité des flux divers de la cellule (métabolisme, transport) afin de favoriser la production de molécules particulières. Dans le cas de *C. roseus,* les deux composés présentant un intérêt commercial majeur sont la vinblastine et la vincristine. Bien qu'elles soient synthétisées dans la plante entière, ces molécules ne sont pas présentes dans les culture *in vitro*. La compréhension et le déblocage des voies enzymatiques impliquées se révèlent un défi très intéressant pour la communauté scientifique. Une synthèse *in vitro* permettrait alors la mise en place d'un procédé à grande échelle qui serait indiqué comme alternative à la culture en champ. D'autre part, les connaissances acquises pourraient alors être adaptées à d'autres espèces végétales.

1.2- Objectifs

L'objectif principal de ce projet est de mettre en place et de valider l'utilisation d'une sonde à fluorescence mulit-longueurs d'onde comme outil de suivi en temps réel de la production de métabolites dans des cultures cellulaires.

Le suivi de la fluorescence à l'aide d'une sonde multi-longueurs d'onde a permis d'analyser *in situ* le métabolisme primaire et secondaire de cellules végétales. L'application du procédé au suivi de la production d'une protéine hétérologue modèle (GFP) a également été effectuée afin de vérifier que ce système de mesure *in situ* est applicable à d'autres types cellulaires (animales et levures).

Enfin, la modulation du métabolisme secondaire a été réalisée par une approche de génie génétique, en vue de débloquer la voie de synthèse menant aux alcaloïdes vincristine et vinblastine chez *Catharanthus roseus*. Afin de mener à bien cette étude, il a été nécessaire de répondre à plusieurs sous-objectifs :

- développer une lignée cellulaire de *C. roseus* à partir de racines transformées
- mettre au point une méthode de purification des métabolites secondaires en vue de leur analyse par LC/MS et RMN
- tester l'utilisation d'une sonde à fluorescence pour le suivi du métabolisme de cellules végétales en suspension
- valider l'utilisation d'une sonde à fluorescence comme outil diagnostic par le suivi de la croissance et de la production de GFP en bioréacteur (levures et cellules animales)
- isoler un promoteur endogène inductible pour l'expression de protéines recombinantes dans des cellules de *C. roseus*
- transformer les cellules avec une construction permettant l'expression de GFP dans des racines transformées
- isoler et amplifier 2 gènes intervenant dans la synthèse d'un précurseur de la vinblastine

1.3- Organisation du projet et du mémoire

La production de métabolites secondaires par des racines transformées génétiquement par *Agrobacterium rhizogenes* est un procédé efficace, qui peut s'avérer supérieur à la culture de cellules en suspension. Plusieurs configurations de bioréacteurs sont proposées dans la littérature pour ce type de production. Cependant, le principal

inconvénient de la culture en tissus est le manque d'homogénéité, ce qui est un handicap important pour la mise en place d'un système d'analyse *in situ*. En effet, ce type de culture s'effectue sans agitation, donc la biomasse reste statique. Il est alors très difficile de réaliser un échantillonnage représentatif de la culture. Afin de mettre au point un système témoin idéal, une suspension cellulaire a été développée à partir de racines transformées puis cultivée en bioréacteur.

Une méthode non-destructrice d'évaluation en temps réel de l'activité cellulaire et de la production en métabolites secondaires a été testée sur deux lignées cellulaires végétales. Pour ce faire, une sonde à fluorescence multi-longueurs d'ondes a été utilisée pour suivre une culture en suspension de *Eschscholtzia californica* en flacons agités et une culture en suspension de *Catharanthus roseus* réalisée en bioréacteur. La culture a nécessité l'adaptation d'un bioréacteur commercial (Chemap Alfa-Laval, Zurich, Suisse) aux contraintes de la culture de cellules végétales. Les mesures *in situ* de fluorescence ont été confrontées à des essais réalisés sur des échantillons de culture avec d'autres méthodes confirmées.

Les métabolites secondaires produits par les cellules ainsi que certains précurseurs ont été analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Une méthode développée au sein du laboratoire (Thikomiroff and Jolicoeur, 2002) a été modifiée pour être adaptée à une analyse par chromatographie liquide couplée à un détecteur spectrophotomètre de masse (LC/MS). Une méthode semi-préparative a également été mise en place afin de purifier les nombreux alcaloïdes indoles inconnus présents dans les extraits cellulaires.

Le système de suivi de la fluorescence a été appliqué à la production d'une protéine hétérologue autofluorescente (*Green Fluorescent Protein*), pouvant servir de modèle à la synthèse de protéines recombinantes en bioréacteur. Deux modèles cellulaires (une levure, *Pichia pastoris* et une cellule animale, NSO) reconnus pour leur utilisation dans ce domaine ont alors été testés par des cultures en bioréacteur opérées en mode cuvée.

Afin de tester la validité d'un tel procédé de suivi en continu de la production de GFP dans des cellules végétales, des transformations génétiques ont été initiées dans le but d'exprimer le gène de la GFP dans des cellules de *C. roseus*.

Une approche de génie génétique a été employée afin de tenter de débloquer la voie de synthèse d'un précurseur de la vinblastine dans des cultures *in vitro* de *C. roseus*. Les enzymes clefs impliquées dans la biosynthèse de ce précurseur sont mises en évidence selon les données de la littérature. Cette voie métabolique pourrait être restaurée en forçant l'expression des gènes réprimés. Ainsi, les gènes codant les enzymes manquantes seront sélectionnés puis intégrés dans des constructions génétiques afin de transformer des tissus végétaux.

Ce mémoire de maîtrise comporte donc neuf chapitres. Le premier expose la problématique et les objectifs du projet. Le chapitre 2 présente une revue de la littérature mettant en évidence le développement des procédés de culture des cellules végétales ainsi que l'importance du métabolisme secondaire au sein du règne végétal et son utilisation à des fins industrielles. Les méthodes analytiques développés au cours de ce projet ainsi que l'adaptation d'un bioréacteur pour la culture de cellules de plante sont présentées au chapitre 3. Le chapitre 4 décrit le développement d'une lignée cellulaire en suspension de *Catharanthus roseus*. Le suivi du métabolisme secondaire et de l'activité cellulaire de cellules de plantes par une sonde à fluorescence multicannaux est proposé au 5ème chapitre sous la forme d'une publication soumise à *Biotechnology Progress*. Le 6ème chapitre présente le suivi *in situ* de la production d'une protéine hétérologue en bioréacteur et s'articule autour d'un article scientifique soumis à *Journal of Biotechnology*. La modification du métabolisme secondaire de *C. roseus* par génie génétique est exposée au chapitre 7. Une discussion générale des résultats obtenus au cours de ce projet de recherche fait l'objet du 8ème chapitre et les conclusions et recommandations sont apportées au chapitre 9.

Chapitre 2 – Revue de littérature

2.1- Métabolisme secondaire des cellules végétales

Contrairement au métabolisme primaire, les composés issus du métabolisme secondaire de végétaux ne participent pas directement à la croissance, au développement et à la synthèse énergétique. Toutefois, ils possèdent néanmoins plusieurs rôles importants dans le règne végétal au niveau de l'interaction entre la plante et son environnement. Ils peuvent exercer un pouvoir attracteur sur les insectes pollinisateurs, agir en tant que signaux moléculaires de communication pour l'établissement de symbiose entre les plantes et certains micro-organismes (exemples : champignons mycorhiziens), protéger la plante des rayons ultra-violets (Wink, 1999). L'activité principale qui leur a été accordée au cours des dernières années de recherche est leur implication dans les mécanismes de défense de la plante contre différents pathogènes (Caporale 1995, Wink, 1999). Alors qu'on estimait à plus de 100000 le nombre de ces molécules connues en 1999 (Verpoorte et al., 1999), ce nombre est en augmentation constante et seul une infime portion des métabolites secondaires d'origine végétale est actuellement mise à jour. Ces composé, de structure souvent complexe, représentent la diversité du vivant. Deux grandes classes de métabolites secondaires peuvent être différenciées suivant la présence d'un ou plusieurs atomes d'azote au sein de leur structure chimique. Le tableau 2.1. adapté de Wink (1999), illustre la diversité de ces molécules et présente quelques origines végétales en exemple. Les espèces productrices citées dans ce tableau ne représentent qu'un exemple d'origine végétale de ces composés et un même métabolite secondaire peut être produit par plusieurs genres différents.

Tableau 2.1. Les deux grandes familles de métabolites secondaires

(adapté de Wink, 1999)

Métabolites secondaires	Type	Molécule	Espèce productrice
non-azotés	Monoterpènes	Eucalytptol	*Eucalypus globulus*
	Diterpènes	Clerodane	*Croton zambesicus*
	Triterpènes	Schinol	*Juliania adstringens*
	Tetraterpènes	β-carotène	*Daucus carota*
	Sesquiterpènes	α-panasinsen	*Alpinia oxyphylla*
	Polyacétylènes	α-tertiophène	*Targetes erecta*
	Phénylpropanoïdes	Acide rosmarinique	*Rosmarinus officinalis*
	Polyketides	Anthrone	*Picramnia antidesma*
	Flavonoïdes	Lutéoline	*Reseda luteola*
azotés	Alcaloïdes	Nicotine	*Nicotiana tabacum*
	Amines	Tryptamine	*Catharanthus roseus*
	Acides aminés non-protéiques	L-canavanine	*Medicago sativa*
	Glucosinolates	Sinalbine	*Sinapis alba*
	Glycosides cyanogènes	Linamarine	*Lotus corniculatus*

Ainsi, la nicotine, produite principalement par le genre *Nicotiana*, est également synthétisée dans les racines de *Hyoscyamus* ou *Datura*. D'autres métabolites secondaires sont espèce-spécifiques et ne sont produits que par une seule espèce (comme l'alcaloïde dimérique vincristine synthétisé par *Catharanthus roseus*).

Applications des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires représentent une source inestimable de composés d'intérêt utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, la fabrication de cosmétiques, l'industrie des colorants et des parfums et biensûr, l'industrie pharmaceutique (Balandrin et Klocke, 1988, Verpoorte et Memelink, 2002). L'enjeu commercial dérivant de ces produits naturels est considérable. Aussi, selon Glaser (1999), le marché américain de produits d'intérêt médical issu des plantes était de 3 milliards de dollars américains. De plus, 25 % des composés pharmaceutiques sont basés sur l'utilisation de produits d'origine végétale (Payne et al. 1991). L'aspirine est ainsi synthétisée par acétylation du salicylate, composé naturel produit en grande quantité par la plante *Spirlea ulmaria* (Bourgaud et al. 2001). La complexité de la structure chimique de ces composés rend leur fabrication par synthèse organique économiquement impossible, dû au nombre important d'étapes nécessaires. Rao et Ravishankar (2002) présentent une revue complète sur l'utilisation de métabolites secondaires d'origine végétale dans l'industrie pharmaceutique. Le tableau 2.2. adapté de cette revue et de Facchini (2001), présente quelques-unes de ces applications.

Tableau 2.2. Composés végétaux d'intérêts pharmaceutiques

Métabolite secondaire	Espèce d'origine	Application médicale
Ajmalicine	*Catharanthus roseus*	Antihypertenseur
Artemisinine	*Artemisia annua*	Antimalarial
Ajmaline	*Raugustifolia serpentina*	Antiarrythmique
Berberine	*Coptis japonica*	Antibactérien, antitumoral
Camptothecine	*Camptotheca acuminata*	Antitumoral
Capsaicine	*Capsicum spp.*	Antiirritant
Castanospermine	*Castanospermum australe*	Inhibiteur glycosyde
Chelerythrine	*Sanguinaria canadensis*	Anti-tumoral
Codéine	*Papaver somniferum*	Sédatif
Colchicine	*Colchium autumnale*	Antitumoral
Digoxine	*Digitalis lanata*	Stimulant cardiaque
Diosgénine	*Dioscorea deltoidea*	Précurseur stéroïdien
Ellipticine	*Orchrosia elliptica*	Anti-tumoral
Emétine	*Cephaelis ipecacuanha*	Vomitif
Forscholine	*Coleus forskolii*	Traitemant de l'asthme
Ginsénosides	*Panax ginseng*	Stimulant cardiaque
Hyoscyamine	*Hyoscyamus niger*	Sédatif
Morphine	*Papaver somniferum*	Sédatif
Podophyllotoxine	*Podophyllum petalum*	Antitumoral
Quinine	*Cinchona ledgeriana*	Antimalarial
Sanguinarine	*Sanguinaria canadensis*	Antibactérien buccal
Scopolamine	*Datura stramonium*	Sédatif
Serpentine	*Catharanthus roseus*	Antihypertenseur
Shikonine	*Lithospermum erythrorhizon*	Antibactérien
Taxol	*Taxus brevifolia*	Anticancéreux
Vincristine	*Catharanthus roseus*	Anticancéreux
Vinblastine	*Catharanthus roseus*	Anticancéreux

L'enjeu économique de la production de ces composés est donc très important. L'augmentation des rendements pour ces composés est devenue une priorité et les modes de production ont été diversifiés en vue de trouver le procédé le plus productif, le plus stable et le plus reproductible.

2.2- Modes de culture de cellules végétales pour la production de métabolites secondaires

2.2.1- Culture en champs

De nombreux métabolites secondaires sont directement extraits de la plante entière. La culture de plantes en champs est donc largement utilisée. Afin de fournir un marché mondial imposant (500 tonnes par an pour la quinine) de grandes surfaces de culture doivent être employées. Les coûts de production de plantes médicinales en champs sont relativement faibles et une importante quantité de tissus végétaux peut être récupérée. Cependant, le faible rendement en métabolites secondaires nécessite la production d'une biomasse très importante. Certains métabolites sont spécifiques à une espèce. Si cette espèce nécessite des conditions de culture particulière (température, ensoleillement...) il devient alors impossible de soustraire la plante à son environnement d'origine et à délocaliser la production. La culture en champs rend les plantes sensibles à certains pathogènes qui peuvent alors détruire la récolte. L'utilisation de pesticides ne peut être employée de part la destinée pharmaceutique des produits. De plus, certaines espèces présentent une croissance lente qui est difficilement compatible avec un marché économique croissant.

L'utilisation de produits naturels en tant que principe actif pour un médicament fait l'objet de contrôles réglementés sur la production de ces composés. Il devient alors

difficile de respecter les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) dans des champs ouverts où le contrôle de l'environnement est quasi-inexistant.

Ces contraintes ainsi que la haute valeur ajoutée des molécules d'origine végétale ont convaincu la communauté scientifique et industrielle d'utiliser une nouvelle approche de production. A titre d'exemple, la vincristine, un anti-cancéreux produit dans la plante entière par la Pervenche de Madagascar, représente un marché mondial de 5 millions de dollars américains par kilogramme (Verpoorte et al., 2002).

2.2.2- Culture *in vitro*

Depuis une trentaine d'années, la culture *in vitro* de cellules végétales s'est considérablement développée. De nombreux efforts ont été réalisés quant à la sélection de lignées, l'optimisation des milieux et des conditions de culture et le développement de systèmes de cultures spécifiques. En 1991, Zenk a mis en évidence la capacité de la culture *in vitro* comme alternative pour la production de métabolites secondaires. Depuis, plusieurs modes de culture ont été mis en place afin de permettre la production de ces composés dans un environnement aseptique et contrôlé.

2.2.2.1- Suspension cellulaire

La biotechnologie s'est fortement développée par l'émergence des cultures microbiennes en bioréacteur pour la production de protéines recombinantes. Ce savoir a été adapté à la culture de cellules végétales. Ainsi, des suspensions unicellulaires peuvent efficacement être obtenues avec des cellules issues de végétaux. À partir de la plante entière, il est possible d'isoler un tissu puis d'imposer une dédifférenciation de ce tissu sur un milieu nutritif artificiel. Les amas cellulaires solides (cals) obtenus peuvent ensuite être mis en suspension dans du milieu liquide. Cette technique permet d'obtenir une suspension de cellules dédifférenciées présentant une croissance plus rapide que la plante entière et pouvant s'effectuer dans des conditions contrôlées par l'utilisation de

bioréacteurs. Les avantages de la culture *in vitro* par rapport à l'agriculture ont été récemment rappelés par Vanisree et al. (2004).

Ainsi, la culture cellulaire permet :

- une production dans des conditions contrôlées indépendantes des changements climatiques
- de protéger les cultures des microbes et insectes
- une amplification rapide de la biomasse
- un contrôle automatisé du procédé
- la mise en place de systèmes d'extraction *in situ*

De nombreux métabolites secondaires ont ainsi été produits par culture en suspension. La L-éphedrine peut être produite par des suspensions de cellules du genre *Ephedra* (O'Dowd et al., 1993), la L-Dopamine par des suspensions de *Mucuna pruriens* (Wichers et al., 1993) ou les paclitaxels par des suspensions de *Taxus spp.* (Christen et al., 1989, Srinivasan et al., 1995, Nguyen et al. 2001, Wu et al., 2001). La culture de cellules en suspension se prête particulièrement à l'étude des voies de biosynthèse menant aux composés d'intérêt et plusieurs enzymes ont été mises en évidence à partir de suspensions cellulaires. Choi et al. (2002) ont isolé la coclaurine N-méthyl transférase, une enzyme impliquée dans le biosynthèse de la berberine, à partir de cellules en suspensions de *Coptis japonica*. Certaines enzyme impliquées dans le métabolisme de *Catharanthus roseus* ont été mises à jour à partir de cultures *in vitro* (Schröder et al., 1999, Schulte et al., 2000, Cacace et al., 2003).

La culture de cellules végétales en suspension peut être effectuée en bioréacteur agité au même titre que la culture de cellules animales ou microbiennes. Néanmoins, la sensibilité des cellules au cisaillement induit par l'agitation du milieu de culture et par le bullage peut se révéler néfaste pour la croissance et la production (Tanaka et al., 1988, Hooker et al., 1990, Ho et al., 1995). À ce titre, Verpoorte et co-auteurs comparent les cellules végétales en suspension à « a bag of water with a thin cell wall » (Verpoorte et

al. 2002). Une autre caractéristique à prendre en compte pour le développement de systèmes de production est la viscosité de la suspension lors de la production de cellules végétales à haute densité (Doran, 1993, Kieran et al., 1997) qui peut provoquer des problèmes de mélange et de transfert de masse. D'autres systèmes de culture comme le lit fluidisé ont été également étudiés (Dubuis et al., 1995, Khlebnikov et al., 1995).

L'immobilisation des cellules (Jones et Veliky, 1981, Jardin et al. 1991, Rao et Ravishankar 2000) au sein d'une matrice pourrait favoriser un effet de contact entre la matrice et les cellules et protéger celles-ci du cisaillement.

Les succès commerciaux restent limités et la culture à l'échelle industrielle n'est pas encore bien établie dû aux contraintes imposées par ce type cellulaire. D'un point de vue économique, la production de métabolites secondaires dont le prix serait inférieur à 1000 dollars américains par kilogramme (Rao et Ravishankar, 2002) n'est pas envisageable en bioréacteur.

2.2.2.2- Cultures de cellules organisées

Certains métabolites secondaires ne sont pas produits dans les cultures de cellules indifférenciées. C'est le cas de la vinblastine, vincristine, morphine, codéine et scopolamine (Verpoorte et al, 2000). D'autres part, la culture d'organes végétaux, qui présentent plusieurs organisations cellulaires, permet parfois d'atteindre des rendements supérieurs en métabolites secondaires (Moreno-Valenzuela et al., 1998). On distingue principalement deux types d'organes végétaux cultivés *in vitro*, soit les pousses ou les racines.

Cultures de pousses. La culture de pousses consiste à développer uniquement la partie aérienne de la plante et à la cultiver uniquement sous forme de plantules (shoots). Les plantules peuvent être obtenues de deux manières distinctes. Un organe (feuille, tige, bourgeon floral...) peut être mis en culture sous influence de diverses combinaisons

hormonales (Massot et al., 2000). Grâce à la totipotence des cellules végétales, il va y avoir régénération d'une plantule avec réorganisation des cellules émergentes en un tissu différencié. La transformation du tissu végétal avec la bactérie *Agrobacterium tumefasciens* permet également le développement d'organes aériens et l'apport d'hormones exogènes n'est alors plus obligatoire (Bourgaud et al., 2001). On parle alors de plantules « teratomas ». Plusieurs expériences ont été menées afin de produire des alcaloïdes par ce type de culture (Saito et al., 1985, Subroto et al., 1996). St-Pierre et al., (1999) ont confirmé que la synthèse de vindoline, un précurseur des alcaloïdes anti-cancéreux de *Catharanthus roseus,* ne s'effectue que dans les parties aériennes de la plante. La différenciation des cellules en organes aériens est donc essentielle pour la synthèse de ce composé (Constabel et al., 1981, O'Keefe et al., 1997). Cependant, la croissance des plantules est plus lente que les cellules en suspension et nécessite de la lumière pour que la photosynthèse puisse être effectuée dans les parties autotrophes (Bourgaud et al., 2001). Cette dernière caractéristique implique un inconvénient pour la mise à l'échelle du procédé car, même si la culture de plantules peut être faites en bioréacteur, la plupart des cuves sont en acier inoxydable et donc opaques à la lumière.

Culture de racines. Tout comme pour la culture *in vitro* des parties aériennes de la plante, il est possible d'induire la formation de racines et de maintenir celles-ci en culture en utilisant un jeu hormonal balancé. La culture de racines peut se révéler intéressante pour la production de métabolites secondaires car elle représente parfois la partie de la plante dont la concentration en composés d'intérêt est la plus importante. Ainsi, les racines de Ginseng (Panax ginseng) sont reconnues comme une importante source de composés d'intérêt médicinal (Lee et al. 1997).

La production de racines transformées génétiquement par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* a révolutionné la culture de tissus végétaux (Flores et al., 1999, Vanisree et al., 2004). Cette bactérie Gram négatif est présente dans le sol de façon naturelle. Elle a la possibilité d'utiliser la plante pour synthétiser des opines. Ce sont des composés carbonés ou azotés qui dérivent des sucres et des acides mainés que seule la

bactérie peut alors utiliser. Les gènes codant pour la synthèse de ces opines sont présents sur un plasmide bactérien, le Ri-T-DNA *(root inducing transferred DNA*). La bactérie doit donc transférer les gènes présents sur le T-DNA aux cellules végétales. L'expression des gènes *rol A*, *rol B* et *rol C* présents sur la partie T_L (*left*) du Ri-T-DNA est suffisante pour stimuler l'apparition de racines au niveau de la zone d'infection (White et al. 1985, Spena et al., 1987, Palazõn et al. 1998, Meyer et al. 2000). Les gènes d'auxines présents sur la partie T_R (*right*) du T-DNA participent au développement des racines « chevelues » ou *hairy roots*. Ainsi, la transformation de la plante par une souche d'*A. rhizogenes* permet le développement d'un tissu racinaire, dense, très ramifié, à croissance rapide et capable de pousser sur un milieu dépourvu d'hormones (Biondi et al. 1997). La stabilité génétique de ces cultures de racines été démontrée (Baiza et al. 1999) contrairement aux lignées en suspension (Bourgaud et al., 2001).

La production de racines transformées a été utilisée pour la production de nombreux métabolites secondaires. Ainsi, des racines transformées de *Cinchona ledgeriana* ont été utilisées pour la synthèse de quinine (Hamill et al., 1989), de *Coleus forskohlii* pour la synthèse de forskolin ou de *Catharanthus roseus* pour la synthèse d'alcaloïdes indoles (Toivonen, 1993, Bhadra et al., 1993). Ces études ne sont données qu'à titre d'exemple et beaucoup d'autres articles font référence à l'utilisation de racines transformées pour la production de composés d'intérêts (Doran, 1997, Giri et Narasu, 2000, Rao et Ravishankar, 2002). Moreno-Valenzuela et al. (1998) ont même répertorié des taux de production plus élevés dans le cas de racines transformées par rapport à des cellules en suspension.

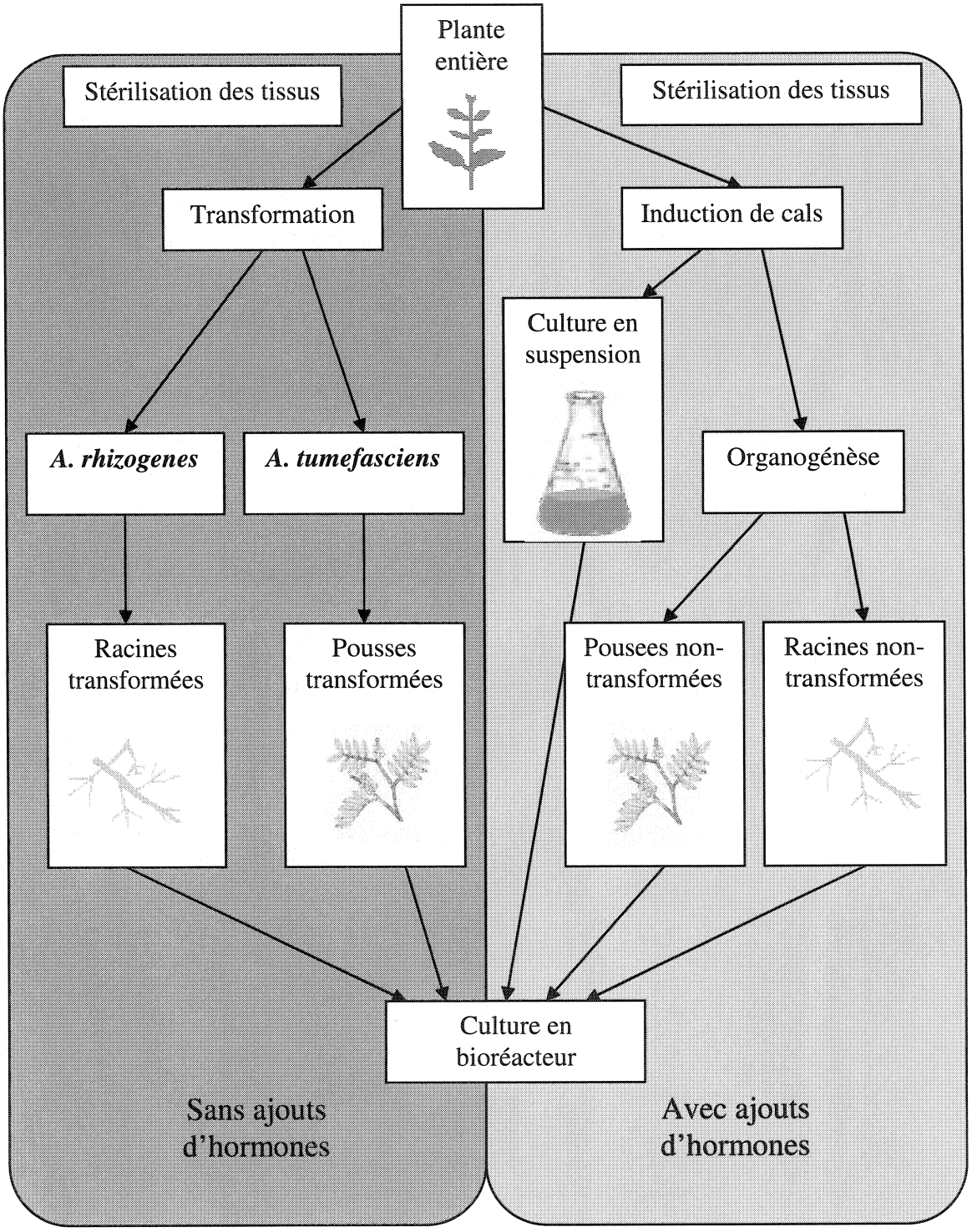


Figure 2.1. Culture *in vitro* pour la production de métabolites secondaires

L'adaptation des cultures de racines transformées à l'échelle industrielle est techniquement faisable. La contrainte majeure d'un tel système est la distribution hétérogène des racines à l'intérieur du réacteur qui peut provoquer des zones « mortes » à l'intérieur desquelles le transfert d'oxygène et de nutriments n'est plus suffisant (Williams et Doran, 2000, Shiao et Doran, 2000). La morphologie des racines empêche également une culture immergée avec une agitation traditionnelle. De nouvelles configurations de bioréacteurs adaptées à la production de ce type de tissu ont été mises au point (Toivonen et al., 1989, Nuutila et al., 1994, Holmes et al., 1997).

Un autre aspect important concerne la conservation des lignées. La cryopréservation de cellules végétales en suspension est très difficile mais est réalisable dans le cas de conservation de tissus (Yoshimatsu et al., 1996, Phunchindawan et al., 1997). Nagatome et al., (2000) ont montré que des racines transformées de tabac (*Nicotiana tabacum*) ont la capacité de reformer de nouvelles racines latérales après 370 jours de stockage à 25°C dans un milieu faible en saccharose (2,5 g/l). Ce résultat démontre que le maintien d'une lignée active peut être effectué à moindre coût.

La figure 2.1 schématise l'initiation et le développement de cultures *in vitro* de cellules végétales.

2.3- Induction du métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire produit souvent des composés cytotoxiques, tels que la vincristine ou la colchicine ainsi que des antibactériens comme la sanguinarine. Ces molécules servent d'armes de défense des plantes contre l'attaque par des pathogènes. Aussi, comme les plantes ne disposent pas de cellules immunitaires spécifiques capables de se délocaliser sur le site d'infection comme les animaux, chaque cellule possède la capacité de produire ses propres molécules de défense (Ebel et Mithöfer, 1998). Pour stimuler la production de métabolites secondaires, il est donc nécessaire de stimuler les mécanismes de défense de la plante. Eilert et al. (1987), ont montré que l'élicitation active la voie de biosynthèse des benzophénanthridines par induction. Plusieurs

paramètres peuvent modifier l'activité du métabolisme secondaire et tous ne font pas appel à l'ajout d'éliciteurs dans le milieu de culture (lumière, statut nutritionnel). La notion d'éliciteur a été proposée pour la première fois par Keen et al., en 1972. Toutefois, il est difficile de définir clairement cette notion. Il s'agit d'un composé d'origine biologique (endogène ou exogène) qui a pour effet d'induire une réponse de défense de la plante (Ebel et Mithöfer, 1998, Rao et Ravishankar, 2002). Les éliciteurs peuvent être des composés dérivés de pathogènes (parois de champignons, glycoprotéines bactériennes...) ou être des intermédiaires endogènes des voies de signalisation (acide jasmonique ou acide α-linoléique par exemple). Ainsi, plusieurs facteurs externes de stress, biotiques ou abiotiques, peuvent être reproduits en culture *in vitro* afin de stimuler l'expression du métabolisme secondaire.

Statut nutritionnel. L'activité du métabolisme secondaire des cellules végétales est étroitement lié au métabolisme primaire et donc au statut nutritionnel des cellules. On distingue 3 grandes classes de nutriments qui peuvent avoir un effet direct ou indirect sur la production des métabolites secondaires : les glucides, le nitrate et le phosphate.

Bien qu'ils soient capables de réaliser la photosynthèse et d'exprimer des chloroplastes, les tissus ou cellules en culture présentent majoritairement une croissance hétérotrophe. Ainsi, la source carbonée utilisée par les cellules provient des glucides (saccharose ou glucose) ajoutés au milieu de culture. Le niveau de sucrose extracellulaire influence le métabolisme secondaire. Ainsi, une concentration élevée en sucrose de 80 g/L a été déterminée comme optimale pour la production d'alcaloïdes dans des cultures en suspension de *Catharanthus roseus* (Knobloch et Berlin, 1980). Pour la même espèce, la concentration optimale est de 50-60 g/L pour la culture de cellules dédifférenciées sous forme de cals (Zhao et al., 2001a) et entre 30-40 g/L pour la culture de racines transformées. En augmentant la concentration en sucrose de 30 à 80 g/L, Berlin et al. (1983) ont réussi à multiplier par dix la synthèse d'alcaloïdes benzophénanthridine dans des suspensions d'*Eschscholtzia californica*. En plus de servir comme source de carbone,

le sucrose jouerait un rôle d'agent osmotique et un tel stress favoriserait la synthèse de métabolites secondaires (Rao et Ravishankar, 2002).

L'azote entre dans la synthèse des métabolites secondaires azotés comme les alcaloïdes. La cellule en a donc besoin pour effectuer leur biosynthèse. Il est généralement présent sous la forme d'ammonium et de nitrate dans les milieux de culture. Le ratio de ces deux sources d'azote influence la production de berbérine (Nakagawa et al., 1984). L'élimination du nitrate dans des cultures de *Chrysanthemum cinerariaefolium* multiplie par deux l'accumulation de pyréthrine (Rajasekaran et al., 1991). La suppression de l'ammonium dans le milieu de culture de *Panax quinquefolium* a permis d'optimiser la production de saponines en utilisant le nitrate comme seul source d'azote (Wu et Zhong, 1999).

La concentration en phosphate inorganique a également une influence sur l'activité du métabolisme secondaire. Généralement, le phosphate présent dans le milieu est rapidement internalisé par les cellules en culture qui l'accumulent et se servent ensuite de ces réserves pour la croissance (Zhang et Su, 2002). Une limitation en phosphate des racines transformées de *Hyoscyamus muticus* a permis d'augmenter la concentration en solavetivone (Dunlop et Curtis, 1991). De plus, le taxol est accumulé dans les cellules de *Taxus baccata* en phase stationnaire, une fois que tout le phosphate a été épuisé (Srinivasan et al., 1995). De façon opposée, une augmentation du phosphate dans le milieu de culture augmente la production d'acide rosmarinique et de digitoxine (De-Eknamkul et Ellis, 1985). De plus, le phosphate joue un rôle majeur dans l'association symbiotique plante-champignon endomycorhizien (Jolicoeur et al., 2003). Cette symbiose est reconnue pour augmenter les réactions de défense de la plante (Volpin et al., 1994, Ruiz-Lozano et al., 1999).

Métaux et éléments traces. L'ajout de sels de métaux lourds a été testé comme stress abiotique imposé aux cellules en culture. L'ajout d'orthovanadate de sodium provoque une augmentation de la production des alcaloïdes benzophénanthridine de

Eschscholtzia californica (Villegas et al., 2000). Cependant, contrairement à une élicitation par un extrait de mycélium, l'excrétion des alcaloïdes dans le milieu est fortement diminuée ce qui laisserait supposer que ce sel inhiberait un éventuel transport actif des alcaloïdes à travers la membrane plasmique. De plus, Zhao et al., (2000) ont testé plusieurs métaux lourds sur des suspensions de *Catharanhtus roseus*. Ils ont ainsi remarqué que des sels de cérium (CeO_2 et $CeCl_3$) ainsi que des sels de yttrium (Y_2O_3 et néodymium ($NdCl_3$) augmentaient la production d'ajmalicine et de catharanthine. Le mode d'action de ces éléments traces sur le métabolisme secondaire est encore indéterminé. Cependant, en plus d'exercer un stress abiotique, leur intégration à l'intérieur de la cellule pourrait inhiber certaines réactions enzymatiques dans les voies de transduction ou de biosynthèse des alcaloïdes.

Lumière. Les végétaux sont soumis à la lumière dans leur environnement naturel. Ils utilisent ainsi l'énergie solaire pour effectuer la photosynthèse. Pour se protéger des rayons ultraviolets qui pourraient endommager leur ADN ou créer des radicaux libres, certaines plantes ont adopté un système de défense en synthétisant des molécules capables d'absorber ces rayons hautement énergétique (Li et al., 1993). Ainsi, la lumière joue un rôle en induisant la production de ces composés. La production d'anthocyanes par *Perilla frutescens* est régulée par la lumière . Un résultat similaire a été trouvé pour *Vitis vinifera* (Zhang et al., 2002). L'expression des carotènes est également régulée par la lumière (Scheibe et al., 1996, Frank et Cogdell, 1996). Dans *Catharanthus roseus*, la synthèse d'alcaloïdes est fortement régulée par la lumière à différents niveaux. Ainsi, le promoteur de la tryptophane décarboxylase présente dans sa région un élément de régulation sensible aux UV. La biosynthèse de la vindoline, qui fait l'objet de plusieurs travaux pour débloquer cette voie en culture *in vitro*, semble dépendante de la lumière. La tabersonine-16-hydroxylase, la première enzyme responsable de la synthèse de vindoline à partir de la tabersonine, est induite par la lumière (Schröder et al., 1999). La production d'ARN messager pour cette enzyme ainsi que son activité sont fortement augmentées lorsque la suspension cellulaire est cultivée à la lumière. La présence de vindoline est

également fortement augmentée lorsque de jeunes plantes sont placées à la lumière après un séjour à l'obscurité (DeLuca et al., 1988). Ceci peut être expliqué par l'activation par la lumière d'une autre enzyme impliquée dans la synthèse de vindoline : la désacétoxyvindoline hydrogénase (Vasquez-Flota et DeLuca, 1998). L'activation de certaines enzymes, tant au niveau transcriptionnel que post-traductionnel, implique l'éventualité de réaliser des cultures sous induction lumineuse. Bien que ce soit aisément réalisable pour des cultures en flacons ou en bioréacteurs de faible volume à cuve de verre, la diffusion de la lumière devient alors un problème pour les cuves à l'échelle industrielle.

Éliciteurs. Certaines substances chimiques produites ou dérivés d'organismes pathogènes, sont reconnues par la plante comme un signal préliminaire d'une agression (Ebel et Mithöfer, 1998).

Les plus connus appartiennent à la famille des oligosaccharides. Celle-ci représente : les oligoglycanes, les oligochitines, les oligochitosanes et les oligalacturonides. Les oligolgycanes font parties intégrante de la paroi de certains champignons, tels que le *Phytophtora sojae*, un parasite du soja. La chitine, un autre constituant de la paroi des champignons et de la carapace des crustacés, est un polymère d'unités de N-acétyl-β-glucosamine reliées entre elles par des liaisons β-1,4. Un oligochitine comprenant 4 résidus semble être la taille minimale pour induire une réponse de défense. La chitine induit la synthèse de phytoalexines chez plusieurs espèces végétales. Ainsi, une élicitation à la chitine augmente la production d'alcaloïdes benzophénanthridine de *Eschscholtzia californica* (Radman et al., 2003). Des résidus de chitosane, qui sont de la chitine désacétylée, peuvent induire une réponse chez des espèces insensibles à la chitine, comme *Catharanthus roseus* (Kauss et al., 1989).

En culture *in vitro*, de nombreux éliciteurs sont produits à partir d'extraits bruts de levures ou de champignons. Ces extraits contiennent alors de nombreux constituants cellulaires glycosidiques ou peptidiques qui peuvent induire une réponse chez les cellules cibles. Un extrait de *Penicillium chrysogenum* augmente de 20 % la production de l'anti-

malarial artémisinine dans des racines transformées *d'Artemesia annua*. L'addition d'extrait de levures dans le milieu de culture augmente la production d'alcaloïdes pour les espèces *Eschscholtzia californica* et *Catharanthus roseus* (Roos et al., 1999, Zhao et al., 2001b, Zhao et al., 2001c).

La fixation d'un éliciteur sur un récepteur membranaire induit toute une série de réponse via plusieurs voies métaboliques dont l'objectif commun est la stimulation du système de défense de la cellule : synthèse de phytoalexines, lignification de la paroi cellulaire, expression des gènes de défense ou réponse hypersensible (RH) par mort cellulaire programmée (Ebel et Mithöfer, 1998). Le récepteur membranaire de la flagelline, une protéine d'origine bactérienne est le seul récepteur clairement caractérisé (Gomez-Gomez et Boller, 2002). Les voies de transduction menant à une activation des gènes de défense sont présentées à la figure 2.2. Brièvement, la liaison de l'éliciteur sur le récepteur induit l'activation d'une lipase membranaire par l'intermédiaire d'une kinase associée à la membrane. La lipase a pour rôle de libérer de l'acide α-linolénique dans le cytosol. Celui-ci va ensuite être métabolisé en acide jasmonique par plusieurs réactions enzymatiques (Farmer et Ryan, 1992). L'acide jasmonique se fixe ensuite sur un récepteur intracellulaire. La fixation de ce ligand sur son récepteur induit une cascade de phosphorylation / déphosphorylation qui va activer d'éventuels facteurs de transcription (Menke et al., 1999). Ceux-ci vont par la suite pénétrer dans le noyau pour activer l'expression des gènes de défense et du métabolisme secondaire. Deux autres voies de signalisation, consécutives à une élicitation ou à un évènement de stress extérieur (UV, blessure mécanique), sont impliquées dans la mécanisme de défense. Ainsi, la fixation de l'éliciteur sur le récepteur membranaire induit une dépolarisation/repolarisation de la membrane provoquant un influx d'ions Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule (Mathieu et al., 1991, Ebel et al., 1995). Ce changement de concentration serait perçu par des MAP kinases, dont l'activité est alors fortement augmentée après l'influx de calcium (Knight et al., 1991, Ebel et Mithöfer, 1998). L'activité de ces enzymes serait également à l'origine de l'induction des gènes de défense. Une autre voie d'activation des gènes impliqués dans les mécanismes de défense est la synthèse d'espèces oxygène réactives (ROS) comme

l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Lamb et Dixon, 1997). Des composés réactifs serviraient de seconds messagers mais pourrait également activer la synthèse d'acide jasmonique endogène ou provoquer la mort cellulaire comme réaction hypersensible.

L'accumulation intracellulaire d'acide jasmonique suite à l'attaque par un pathogène a été démontrée (Wasternack et Partier, 1997). De plus, plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des métabolites secondaires sont positivement régulés par l'acide jasmonique. Ainsi, la transcription des gènes *TDC* et *STR1* codant deux enzymes impliquées dans la synthèse des précurseurs d'alcaloïdes de *Catharanthus roseus* est rapidement augmentée après application d'acide jasmonique dans des cultures de cellules (Menke et al., 1999). Ces résultats encouragent l'utilisation *in vitro* d'éliciteurs pour activer les voies de synthèse de métabolites secondaires. Le méthyl jasmonate, un dérivé de l'acide jasmonique, est un éliciteur très efficace pour augmenter la production de paclitaxels dans des cultures de *Taxus spp.* (Yukimune et al., 1996). L'acide jasmonique est également reconnu pour augmenter la synthèse d'alcaloïdes chez *Catharanthus roseus* (Dymov et al., 1997, Rijhwani et Shanks, 1998). Toutefois, la réponse attendue n'est pas linéaire en fonction de la concentration d'éliciteur utilisée, ce qui pourrait supposer une saturation des récepteurs intracellulaires à l'acide jasmonique. De plus, une concentration trop élevée pourrait même se révéler négative pour la production de métabolites secondaires (Rijhwani et Shanks, 1998).

Une nouvelle catégorie d'éliciteurs synthétiques dérivés de l'acide jasmonique a été mise au point très récemment (Qian et al., 2004). Ces nouvelles molécules ont été testées sur des cultures de *Taxus chinensis*, et leur effet a été comparé à celui d'un contrôle élicité à l'acide jasmonique. Dans ce cas, la production de taxuyunanine c, un métabolite secondaire agissant comme un facteur de croissance neuronal, a été significativement augmentée par l'addition de trifluoroéthyl jasmonate et de 2-hydroéthyl jasmonate comparativement à une élicitation à l'acide jasmonique.

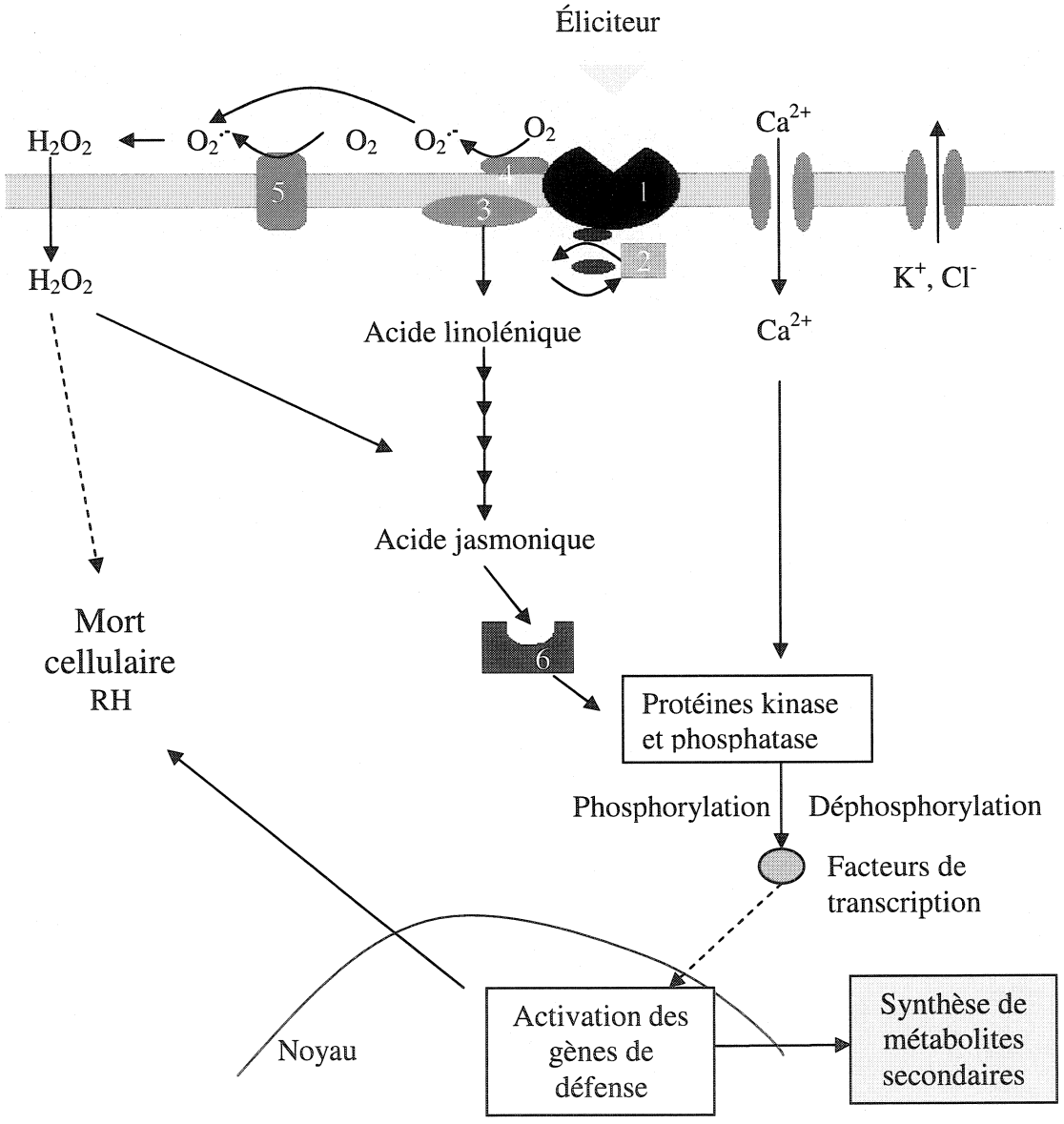


Figure 2.2. Mécanismes d'élicitation d'une cellule végétale.

1. Récepteur membranaire. 2. Kinases / Phosphatases. 3. Lipase. 4. Peroxydase. 5. Oxidase. 6. Récepteur de l'acide jasmonique. RH : Réponse Hypersensible. Adapté de Wasternack et Parthier, 1997, Ebel et Mithöfer, 1998, Menke et al., 1999, Wu et Ge, 2004.

2.4- Métabolisme secondaire de *Catharanthus roseus*

Catharanthus roseus (Pervenche de Madagascar) est une plante appartenant à la famille des Apocynaceae. Elle produit des alcaloïdes terpènes indoles. Le noyau indole dérive du tryptophane et la partie terpène provient de l'iridoïde glucoside sécologanine.

Les voies de biosynthèse des principaux alcaloïdes de *C. roseus* sont résumées à la figure 2.3.

Synthèse de la sécologanine. La sécologanine dérive de l'acide mévalonique. Celui-ci est à l'origine de la synthèse de l'isopentényl pyrophosphate (IPP), qui va ensuite être transformé en géraniol. Par action de la géraniol-10-hydroxylase (G10H), une cytochrome P450-monoxygénase liée à la membrane du tonoplaste, il est hydroxylé en 10-hydroxygéraniol (Meijer et al., 1993a). Bien que l'hydroxylation soit spécifique de la position 10, la G10H reconnaît le géraniol et le nérol, son isomère en *cis-*, comme substrat. La G10H est l'enzyme la plus étudiée de cette voie. Par plusieurs étapes successives, le 10-hydroxygéraniol est transformé en loganine (Sampaio-Santos et Kaplan, 2001). Une cytochrome P450, la sécologanine synthase, est ensuite responsable de la transformation de la loganine en sécologanine (Meijer et al., 1993b, Irmler et al., 2000).

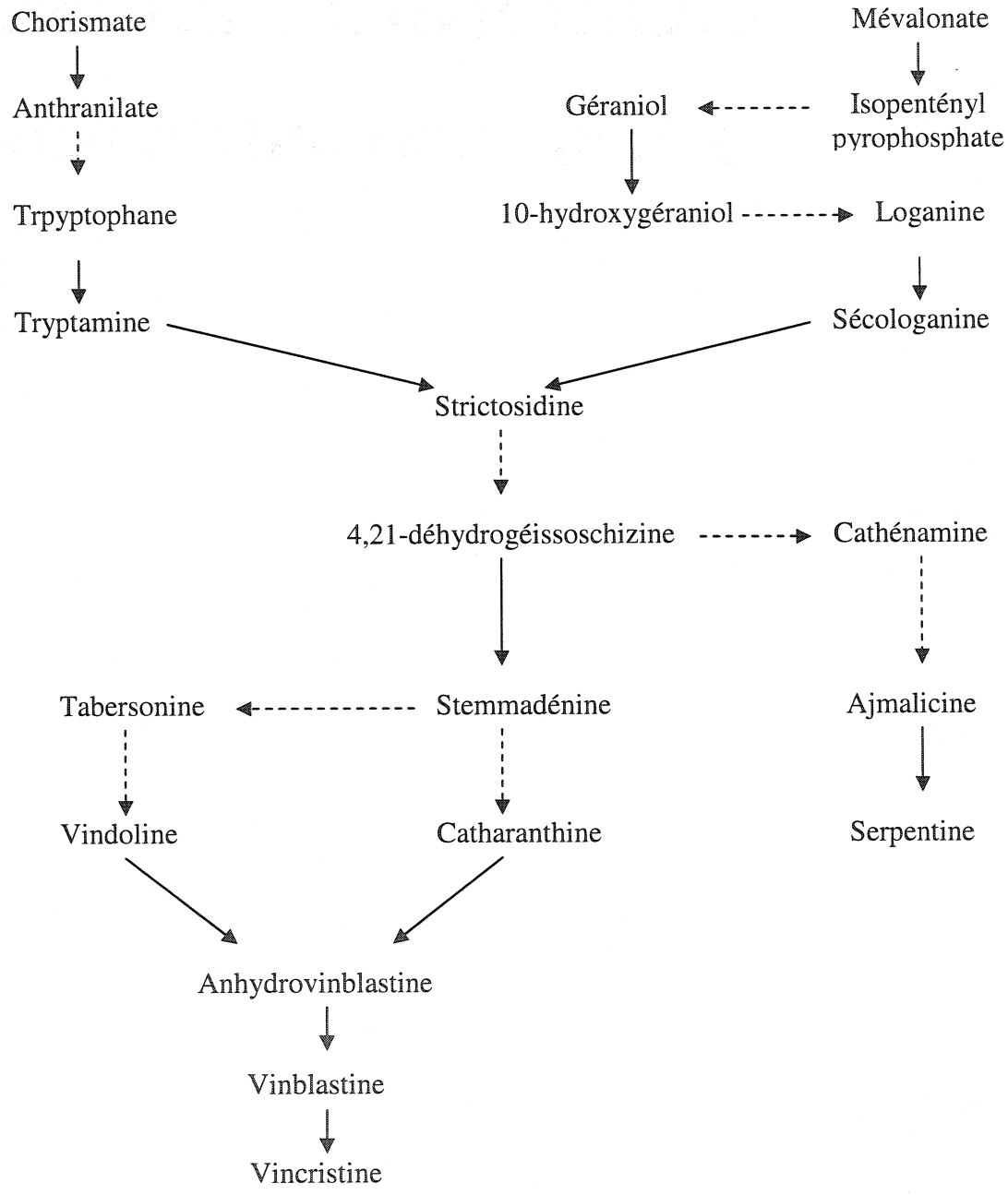


Figure 2.3 Voie de biosynthèse simplifiée des principaux alcaloïdes de *Catharanthus roseus*.

Les réactions sont indiquées par des flèches. Les flèches en traits discontinus indiquent une succession de réactions. (Adapté de Meijer et al., 1993c)

Synthèse de la tryptamine. Le noyau indole des alcaloïdes de *C. roseus* dérive de l'acide aminé tryptophane. Il provient de la voie du chorismate. Celui-ci est à l'origine des acides aminés aromatiques : tryptophane, tyrosine et phénylalanine (Michal, 1999). L'anthranilate synthase enlève le phosphoénol-pyruvate du chorismate et lui greffe un groupement amine par transamination de la glutamine. Cinq autres réactions sont nécessaires pour former le tryptophane. La dernière étape est catalysée par la sous-unité β de la tryptophane synthase qui greffe une molécule de sérine sur le noyau indole. Le tryptophane est transformé en tryptamine par la tryptophane décarboxylase (TDC). La TDC de *C. roseus* a été clonée en 1989 (DeLuca et al., 1989). Il s'agit d'une enzyme cytosolique dont l'expression est fortement induite par l'acide jasmonique (Menke et al., 1999), l'extrait de levure (Pasquali et al., 1992) et les rayons ultraviolets (Ouwerkerk et al., 1999). La présence d'auxines dans le milieu de culture aurait tendance à diminuer son activité (Pasquali et al., 1992). Une forte augmentation de la synthèse de TDC a été observée préalablement à l'accumulation d'alcaloïdes dans des cellules ou des racines transformées de *C. roseus* (Eilert et al., 1987; Islas-Flores et al., 2002). Cependant, la stratégie visant à surexprimer cette enzyme (Canel et al, 1998) s'est révélé inutile pour augmenter la production d'alcaloïdes. Dans la plante entière, l'activité de la TDC est la plus forte au niveau des cellules corticales des apex racinaires.

Synthèse de la strictosidine. Sous l'action de la strictosidine synthase (STR1), la tryptamine et la sécologanine sont condensées. L'expression de la STR1 est sous le contrôle des même régulateurs que la TDC suggérant une régulation commune (Menke et al., 1999, Verpoorte et al., 2002). La voie limitante dans la production de l'iridoïde-glucoside strictosidine provient de la voie du géraniol. En effet, l'ajout de précurseurs de la strictosidine dans le milieu a démontré que l'addition de tryptamine n'avait pas d'effet sur la synthèse d'alcaloïdes alors que l'ajout de loganine a permis d'augmenter la biosynthèse d'alcaloïdes (Whitmer et al., 1998a).

Synthèse de la 4,21-déhydrogéissoschizine. La strictosidine est déglucosylée par la strictosidine β-D-glucosidase (Luijendijk et al., 1998) pour former, via plusieurs intermédiaires instables, la 4,21-déhydrogéissoschizine qui est le premier alcaloïde terpène indole de *C. roseus* (Facchini, 2001). Elle est à l'origine des alcaloïdes de la famille Corynanthean (ajmalicine), Ibogan (catharanthine) et Aspidosperma (vindoline) (Wink, 1999).

Formation des alcaloïdes Corynanthean. La cathénamine est formée à partir de la 4,21-déhydrogéissoschizine. Par l'action de la cathénamine réductase, la cathénamine est transformée en ajmalicine. L'ajmalicine peut ensuite être métabolisée en serpentine sous l'action d'une peroxydase (Wink, 1999). Ces deux derniers métabolites ont une action anti-hypertensive (Verpoorte et al., 1999).

Formation des alcaloïdes Ibogan. La formation de la catharanthine à partir de la 4,21-déhydrogéissoschizine est peu connue et aucune des enzymes impliquées n'a été isolée (Facchini, 2001). Cependant, le passage via la stemmadénine semble obligatoire (Verpoorte et al., 2002).

Formation des alcaloïdes Aspidosperma. Comme la catharanthine, la tabersonine dérive de la stemmadénine. Elle subit ensuite 6 biotransformations avant d'être métabolisée en vindoline. Cette voie a été bien étudiée car elle représente une enjeu capital dans la synthèse *in vitro* de la vindoline, un des deux précurseurs des alcaloïdes dimériques vincristine et vinblastine. La tabersonine est tout d'abord hydroxylée en position 16 par la tabersonine-16-hydroxylase (T16H). Il s'agit d'une cytochrome P450-dépendante monooxygénase dont l'activité est fortement augmentée par la lumière (Schröder et al., 1999). Elle a été trouvée dans des cultures de cellules en suspension (Schröder et al., 1999). La 16-hydroxytabersonine doit ensuite subir une O-méthylation par la S-adénosylmethionine :16-hydroxy-tabersonine-O-méthyltransférase (16-OMT). L'étape suivante est réalisée par une enzyme encore non-déterminée mais

nécessite une hydroxylation au niveau du carbone 3. La 16-méthoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine est ensuite N-méthylée sur l'azote 1 par une N-méthyltransférase (NMT) pour former la désacétoxyvindoline (DeLuca et al., 1988). Elle est ensuite convertie en déacétylvindoline par la désacétoxyvindoline-4-dioxygénase (D4H) qui requiert du 2-oxyglutarate (DeCarolis et al., 1990, Vasquez-Flota et al., 1997). La dernière étape aboutissant à la formation de la vindoline est catalysée par la déacétylvindoline-4-O-acétyltransférase (DAT) qui requiert l'acétyl-coenzyme A comme co-substrat. La DAT est fortement inhibée par la tabersonine (Power et al., 1990). Les deux dernières enzymes ont été localisées par immunocytolocalisation dans les idioblastes et les cellules laticifères de feuilles, tiges et boutons floraux (St-Pierre et al., 1999).

Syhthèse de la vinblastine et de la vincristine. La vincristine et la vinblastine sont les deux alcaloïdes de *C. roseus* les plus recherchés pour leur propriété anti-cancéreuse et leur utilisation dans le traitement des leucémies. La catharanthine et la vindoline sont condensées sous l'action d'une peroxydase non-spécifique pour former la 3,4-anhydrovinblastine ou iminium (Sottomayor et al., 1998). Deux hydroxylations successives permettent la synhtèse de la vinblastine puis de la vincristine à partir de l'iminium.

Chapitre 3 – Développement d'une méthode analytique et adaptation d'un bioréacteur

Ce chapitre présente l'ensemble des méthodes expérimentales et analytiques développées dans le cadre de ce projet.

3.1- Adaptation d'une méthode analytique pour l'étude du métabolisme secondaire de *Catharanthus roseus* par spectrométrie de masse

3.1.1- Problématique

Les métabolites secondaires sont des molécules de structure chimique souvent complexe. Leur biosynthèse nécessite une succession de nombreuses réactions enzymatiques. Chacune de ces réactions produit un composé intermédiaire. Pour *Catharanthus roseus*, plusieurs dizaines de composés ont été recensés au sein du métabolisme secondaire. Les réactions les plus intéressantes d'un point de vue commercial sont la synthèse des antihypertenseurs ajmalicine et serpentine, et surtout des antimitotiques à action anticancéreuse que sont la vinblastine et la vincristine. Ces molécules sont toutes formées à partir des mêmes précurseurs que sont le tryptophane et le géraniol (figure 2.3). Afin de déterminer les points clés situés au sein du métabolisme secondaire et de connaître la dynamique du système de production tout entier, il est nécessaire d'identifier de façon rigoureuse les molécules intermédiaires ainsi que les produits finaux.

La chromatographie liquide haute performance semble donc toute indiquée pour effectuer cette séparation. Néanmoins, son utilisation nécessite une connaissance préalable des molécules qui vont être présentes dans l'extrait analysé. Bien que beaucoup de composés aient été identifiés au sein du métabolisme secondaire de *C. roseus*, très peu sont disponibles sur le marché pour fins de standard externe. Souvent, les seuls composés disponibles sont les produits finaux d'intérêt commercial, générés par purification du produit cible. Si ceci est suffisant pour des études sur l'activité des composés de la molécule testée, les activités de recherche nécessitent la production de tous les métabolites secondaires. En effet, même si les intermédiaires formés par la plante ne sont pas directement intéressants sur le plan commercial, leur identification est essentielle à l'élucidation et à la compréhension du métabolisme secondaire. Une meilleure compréhension de ce réseau métabolique permettrait par la suite d'effectuer des modifications ciblées au sein de celui-ci pour favoriser ou réprimer une voie plutôt qu'une autre.

Ainsi, plusieurs méthodes HPLC ont été mises au point afin d'identifier le plus de métabolites secondaires possibles de *C. roseus* (Shanks et al., 1998, Tikhomiroff et Jolicoeur, 2002). Cependant, le nombre de composés et leur similitude sur le plan chimique font qu'il est impossible de tous les séparer par chromatographie liquide. De plus, les composés séparés doivent ensuite être identifiés. Comme dit précédemment, les standards disponibles ne permettent à ce jour d'identifier que quelques molécules. Ainsi, de nombreux pics restent indéterminés au sein du chromatogramme. L'analyse et surtout l'identification de ces composés permettraient d'affiner le décryptage du métabolisme secondaire de *C. roseus*.

L'identification de molécules inconnues peut se faire selon plusieurs techniques tels que la détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse (SM) ou l'analyse de la structure chimique de la molécule par résonance magnétique nucléaire (RMN).

Ces deux techniques sont disponibles depuis peu au sein de notre chaire de recherche. Leur utilisation pourrait améliorer notre compréhension du métabolisme

secondaire. La méthode HPLC actuellement en place dans le laboratoire pour l'analyse des métabolites secondaires de *C. roseus* (Tikhomiroff et Jolicoeur 2002) doit être adaptée pour une détection en spéctrométrie de masse en modifiant la phase mobile utilisée car celle-ci doit être entièrement volatile. Une fois compatible, cette méthode permettra de déterminer la masse moléculaire des composés présents dans un extrait de racines transformées.

3.1.2- Objectifs

Afin de pouvoir analyser par LC/MS des échantillons racinaires de *C. roseus*, la modification de la méthode HPLC existante est essentielle. La phase mobile va être ainsi modifiée et le débit d'opération optimisé pour améliorer la séparation et répondre aux contraintes matérielles de pression.

3.1.3- Matériel et méthodes

Extraction à partir d'un tissu racinaire. Des racines transformées de *C. roseus* ont été cultivées pendant 28 jours dans du milieu M3P3S liquide. Ce milieu correspond au milieu minimum mis au point par Bécard et Fortin (1988) contenant le triple de la concentration en saccharose et en phosphate. Les racines sont rincées à l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de milieu sur les racines. En effet, la présence de saccharose résiduel constitue un artéfact de mesure lors de la pesée du poids sec des racines, mais est également nuisible lors du broyage des racines. Les racines rincées sont séchées rapidement entre 2 feuilles de papier Kimwipes (Fisher Scientific, Nepean, Canada) puis placées dans des flacons de verre de 20 mL. Les échantillons sont ensuite congelés à – 20°C toute la nuit. Lors du transport des échantillons vers le lyophilisateur, les échantillons sont conservés dans une boite isolante dont le fond est rempli d'azote liquide afin d'éviter une décongélation des échantillons. Les racines sont ensuite lyophilisées pendant 16h dans un lyophilisateur DuraDry (FTS System Inc., Stone Ridge. NY, USA).

Les paramètres de lyophilisation sont : Température des tablettes : 15°C ; Température du condenseur –80°C ; pression absolue : inférieure à 0,2 Bar. Les échantillons sont alors broyés manuellement en utilisant un mini-pilon en téflon (diamètre 6 mm). L'extraction est faite par addition de méthanol avec un ratio d'environ 1mL de solvant pour 100 mg de poids sec. Les métabolites secondaires sont extraits 2 fois 30 minutes dans un bain à sonication rempli de glace fondante pour éviter un surchauffement. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 4 degrés C pour éliminer les débris cellulaires. Les surnageants sont combinés dans un ballon à reflux afin d'être concentrès au Rotavapor® (Buchi Analytical Inc.,New Castle, De, USA). Le concentré est resuspendu dans 10 mL du méthanol puis filtré à travers un filtre PTFE 0,2 µm dans des vials HPLC.

Adaptation d'une méthode HPLC pour LC/MS. La méthode de départ utilisée est celle mise en place par Tikhomirroff and Jolicoeur (2002). Brièvement, 20 µL d'échantillon sont injectés dans un système HPLC (Beckmann-Coulter, Mississauga, Ontario, Canada). L'élution se fait par un gradient linéaire ACN : Tampon phosphate 50 mM pH=6 (20 % B à 80 % B en 20 minutes, puis isocratique 80 % B pendant 5 minutes). Le débit est constant à 2 $mL.min^{-1}$. La pré-colonne utilisée est une GuardColumn C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) et la colonne, une Zorbax Eclipse XDB C18 4.6mm x 150 mm, 5µm (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Cette méthode permet une bonne séparation des alcaloïdes suivant : serpentine, vincristine, vindoline, catharanthine, vinblastine, tabersonine. Malheureusement, les alcaloïdes dimériques (vincristine et vinblastine) ainsi que leur précurseur vindoline ne sont pas présents dans les extraits de cellules végétales. De plus, plusieurs pics sont détectables mais l'absence de standards externes empêche leur identification et leur quantification.

Modification de la phase mobile. Cette méthode a donc été modifiée et adaptée à une analyse d'extraits méthanoliques en LC/MS. La détection des composés par spectrométrie de masse utilisant une détecteur *Electrospray Ionisation* (ESI) impose d'utiliser des phases mobiles volatilisables. En effet, l'échantillon est vaporisé sous forme

de *spray* à l'entrée du détecteur. La présence d'importantes concentrations d'ions phosphate dans la phase mobile est donc à proscrire afin d'éviter les dépôts sur la buse de nébulisation. Or la méthode classique (Tikhomiroff et Jolicoeur, 2002) utilise un tampon phosphate afin de réguler le pH à 6. Un autre tampon est alors testé. La phase mobile est donc remplacée par un mélange ACN : Tampon acétate 25mM pH=6. Le pH de la phase aqueuse est ajusté avec une solution d'acide acétique glacial.

Modification du débit et du gradient Il a été proposé de réduire le débit de la phase mobile car celui-ci entraîne une augmentation de la pression totale (entre 3,5 et 4 kpsi) dans le système qui dépasse les spécifications du manufacturier pour la colonne ainsi que pour les cellules de détection. De plus, une diminution de débit en analytique est nécessaire pour que la mise à l'échelle semi-préparative soit possible sur le système utilisé. Plusieurs débits ont donc été testés (entre 0,5 $mL.min^{-1}$ et 2 $mL.min^{-1}$) afin de déterminer lequel pourrait s'avérer être un compromis entre la qualité de la séparation et la durée de l'analyse.

La modification du débit de la phase mobile entraîne irrémédiablement un changement du nombre de plateaux théoriques (N) de la colonne. Ainsi, selon la courbe de Van Deemter (figure 3.1) il existe une vélocité υ (donc un débit) optimum pour lequel la hauteur d'un plateau théorique (H) est minimale.

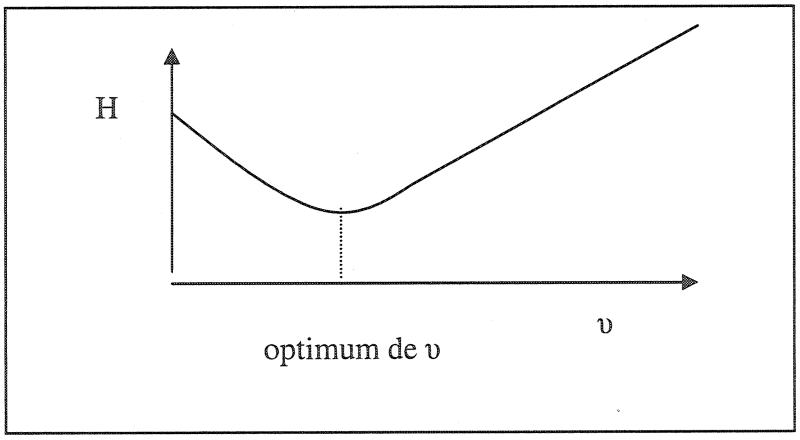


Figure 3.1 Courbe de Van Deemter (H en fonction de υ)

(Van Deemter et al., 1956).

Les équations utlisées pour l'optimisation du débit sont issues des travaux présentés par Meyer (1994).

H est calculé selon :

$$H = (L/5{,}54) \times (w_{1/2}/t_r)^2 \qquad (3.1)$$

Avec :

H : Hauteur d'un plateau théorique

L : Longueur de la colonne

$w_{1/2}$: Largeur du pic à mi-hauteur

t_r : temps de rétention

De plus, suivant l'équation (3.2) et comme la longueur de la colonne (L) reste identique, plus H est faible, plus N va être grand.

$$N = L/H \qquad (3.2)$$

N : nombre de plateaux théoriques

Donc pour optimiser la séparation (soit augmenter le nombre de plateaux théoriques) il est nécessaire de réduire H. H devient faible si $w_{1/2}$ est faible et/ou si la durée de séparation (tr) est grande.

Pour des méthodes de séparation par gradient, N ne suffit pas pour exprimer l'efficacité de séparation d'une colonne. On parle alors de capacité de pics (P_c) qui représente le nombre de pics qui peuvent théoriquement être séparés à l'intérieur d'un gradient de temps. Pc est déterminé suivant l'équation 3.1.

$$Pc = 1 + t_G/w_{1/2} \qquad (3.3)$$

Pour résumer, plus P_c est grand, plus le nombre de composés pouvant être séparés va l'être aussi. P_c varie donc en fonction du nombre de plateaux théoriques (N) et de la durée du gradient (t_G) selon les schémas suivants :

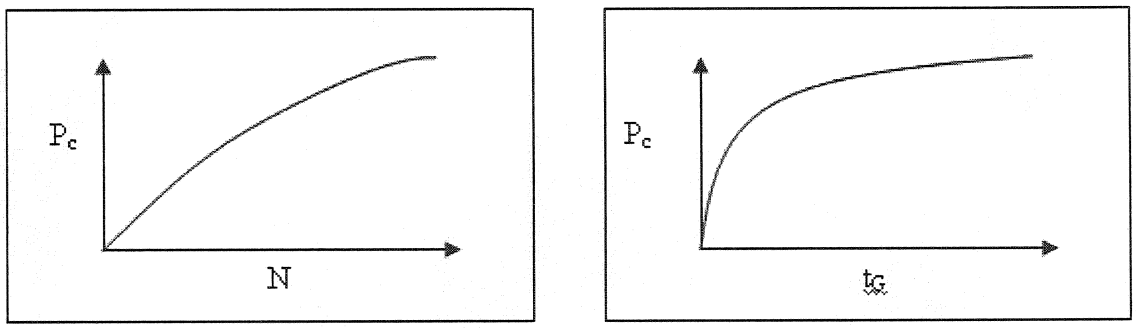


Figure 3.3 À gauche : Capacités de pics en fonction du nombre de plateaux théoriques. À droite : capacité de pics en fonction du temps de gradient.

(D'après Daly et al., 2003)

Afin d'optimiser P_c, $w_{1/2}$ est déterminé expérimentalement en injectant le même échantillon à des débit différents puis en mesurant la largeur du pic à mi-hauteur pour différents composés.

Après avoir déterminé le débit optimal, différentes durées de gradient ont été testées.

3.1.4- Résultats

Deux injections successives ont été réalisées. La première séparation (contrôle) a été effectuée selon la méthode initiale (Tikhomiroff et al., 2002) (annexe Figure A.1).

Lors de la deuxième injection, le tampon phosphate de la phase mobile a été remplacé par le tampon acétate (annexe figure A.2). Aucun changement majeur n'est observable entre les 2 chromatogrammes obtenus. Les analyses subséquentes ont donc été effectuées en utilisant de l'acétate d'ammonium 25mM pour tamponner la phase mobile à un pH de 6. On peut noter la présence de 4 composés inconnus résolus T1, T2, T3, T4. Ces composés possèdent un spectre UV similaire à la tabersonine (Tikhomiroff et Jolicoeur, 2002). Les composés T1 et T2, résolus à l'intérieur du gradient de séparation, ont été utilisés pour les mesures d'optimisation du débit.

Le nombre de plateaux théoriques est calculé à partir des chromatogrammes obtenus à différents débits. On utilise la largeur à mi-hauteur des pics correspondant aux composés T1 et T2 qui se situent respectivement au milieu et à la fin de la séparation.

La figure 3.3 représente le nombre de plateaux théoriques pour les composés T1 et T2 en fonction du débit de la phase mobile pour un gradient linéaire fixe de 20 minutes.

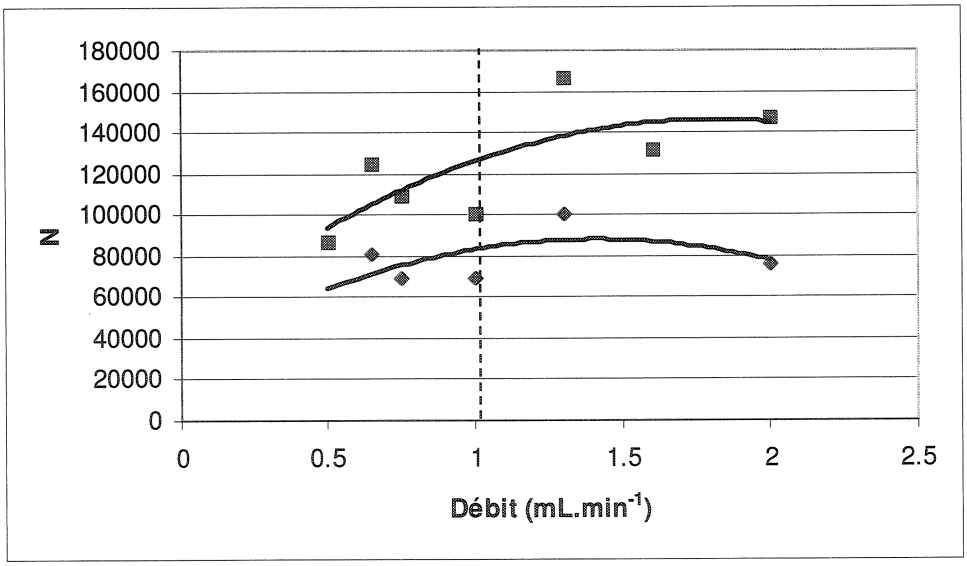


Figure 3.2 Nombre de plateaux théoriques (N) calculés en fonction du débit avec un gradient linéaire de 20 minutes.

Les calculs sont faits pour les composés T1 (■) et T2 (◆)

Le composé T1 n'a pu être résolu pour certains débits (0.5, 0,65 et 1,6 $mL.min^{-1}$) car il co-élue avec d'autres composés.

Pour les 2 composés testés, le maximum de plateaux théoriques semble atteint entre 1 et 2 $mL.min^{-1}$. En dessous de 1 $mL.min^{-1}$, N diminue rapidement et le temps d'analyse augmente de façon significative. Un débit de 1 $mL.min^{-1}$ semble un bon compromis puisqu'il permet de descendre la pression du système en dessous de la pression de 3 kpsi critique.

Des essais ont été réalisés afin d'augmenter la durée du gradient. Bien que P_c passe de 126 à 195 entre 15 et 35 minutes, aucun renseignement supplémentaire n'est apporté par cette modification et la durée de la méthode se trouve alors rallongée sans bénéfice.

La méthode analytique finale adoptée est donc la suivante :

Tableau 3.1. Méthode finale de séparation des alcaloïdes indoles de *C. roseus* pouvant être utilisée en LC/MS.

Volume injection	20 µL
Phase mobile A	Tampon Acétate 25mM pH6
Phase mobile B	Acétonitrile
0-20 minutes	linéaire (20% à 80% de phase B)
20-30 minutes	Élution isocratique 80% de phase B
30-31 minutes	80% B à 20% de phase B
31-34 minutes	Rééquilibration à 20% de phase B

3.2- Analyse d'un extrait racinaire de *C. roseus* par LC/MS

3.2.1- Objectifs :

Très peu d'alcaloïdes contenus dans l'extrait méthanolique de racines transformées sont identifiables, ceci dû à l'absence de standards. Une analyse par LC/MS permettrait d'obtenir la masse des composés, ce qui pourrait aidé à leur identification.

3.2.2- Matériel et méthodes

La méthode de séparation définie ci-dessus a été utilisée pour l'analyse LC/MS. Le système utilisé est un système Waters (Milford, MA, USA) composé d'un injecteur 2777, d'une pompe binaire 1525 et d'un détecteur de masse quadripôle Micromass ZQ muni d'une sonde ESI. Le débit total entrant dans le détecteur de masse est de 0.3 mL/min.

3.2.3- Résultats

À cause de la complexité de la composition de l'extrait, seuls les composés élués après 10 minutes ont été pris en compte pour la mesure du spectre de masse.

L'analyse a révélé que plusieurs pics étaient purs, alors que certains représentaient un mélange de plusieurs composés, ce qui est difficile à déceler en utilisant un détecteur classique en absorbance UV. Les composés préalablement déterminés dans nos extraits racinaires tels que la serpentine, la catharanthine et la tabersonine sont détectés respectivement à 10,54 min, 16,05 min et 24,81 min. La masse des composés inconnus est présentée dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 Masse des principaux composés présents dans un extrait racinaire de *C. roseus* analysés par LC/MS

Nom du composé	Masse du composé (g/mol)
Serpentine	349.3
T1	369.3
Catharanthine	367.3
Cath B	353.3
T2	353.3
R1	353.3
T3	397.3
Tabersonine	337.3
R2	339.3
T4	339.3

Plusieurs composés ont donc des masses identiques, il est donc impossible de les identifier suivant ce seul critère. Il a été proposé par une autre étude (Tikhomiroff et Jolicoeur 2002) que les composés T1, T2, T3 et T4 étaient des dérivés proches de la tabersonine puisqu'ils possèdent le même spectre UV. Or, il existe dans le métabolisme secondaire 2 molécules ayant pour masse moléculaire 369 g/mol et 353 g/mol qui dérivent directement du métabolisme de la tabersonine. L'analyse du spectre UV en plus la masse permet d'identifier T1 et T2 comme étant respectivement l'hörhammericine et la löchnericine. Ces composés ont été trouvés dans des extraits de racines transformées de *Catharanthus roseus* (Rijwhani et Shanks, 1998).

Afin d'identifier les autres composés, il serait nécessaire de les séparer, de les purifier puis de les analyser par résonance magnétique nucléaire (RMN).

3.3- Mise au point d'une méthode semi-préparative pour la purification d'alcaloïdes indoles de *Catharanthus roseus*

3.3.1- Objectifs

L'analyse par RMN ainsi que la fabrication de standards chimiques nécessitent une importante quantité de molécules (plusieurs centaines de milligrammes) à des fins d'identification ou de quantification absolue par gravimétrie. Pour ce faire, il est nécessaire de produire des composés d'une pureté maximale et en quantité suffisante (mM) à partir d'une matière première végétale dont la production est généralement faible (µmol/g de biomasse). Afin d'atteindre cet objectif, une méthode de chromatographie semi-préparative a été mise en place.

3.3.2- Matériel et méthodes

La préparation de l'extrait racinaire a été décrite précédemment. Afin de ne pas surcharger la colonne avec du matériel qui ne sera pas récupéré, une étape de pré-séparation a été mise en place sur cartouche extractive SPE (Solid Phase Extraction) C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Les conditions d'élution des composés ont été déterminées expérimentalement en faisant évoluer de façon progressive la force du gradient d'élution. Ces résultats sont présentés en annexe (figure A.3). Il a été déterminé que 3 élutions successives doivent être effectuées afin de séparer tous les composés présents dans l'extrait en 3 groupes. Le protocole de pré-séparation est présenté en annexe A.

Seule la 3ème élution comprenant tous les composés élués après la serpentine sera utilisée.

La méthode de séparation repose essentiellement sur une mise à l'échelle de la méthode HPLC analytique développée. La séparation s'effectue sur une colonne Zorbax Semi-Prep C18 250mm x 9.4mm, 5 µm munie d'une pré-colonne Zorbax C18 15mm*9.4mm, 7 µm (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada).

Afin de préserver la séparation, il est nécessaire de conserver la même vélocité que pour la méthode analytique à l'intérieur de la colonne puisque le garnissage est de même qualité et de même diamètre. Le débit a donc été adapté tel que :

$u_{Analytique} = Q_{Analytique} / S_{Analytique}$

$u_{Analytque}$ = vitesse de la phase mobile à l'intérieur de la colonne analytique

$Q_{Analytique}$ = débit de la phase mobile à l'intérieur de la colonne analytique

$S_{Analytique}$ = Section de la colonne analytique

et :

$u_{SemiPrep} = Q_{SemiPrep} / S_{SemiPrep}$

$u_{SemiPrep}$ = vitesse de la phase mobile à l'intérieur de la colonne semi-préparative

$Q_{SemiPrep}$ = débit de la phase mobile à l'intérieur de la colonne semi-préparative

$S_{SemiPrep}$ = Section de la colonne semi-préparative

Si on veut respecter : $u_{SemiPrep} = u_{Analytique}$

alors $Q_{SemiPrep} = Q_{Analytique} \times (S_{SemiPrep} / S_{Analytique})$

Soit pour les conditions énoncées : $Q_{SemiPrep} = 4$ mL.min^{-1}

La séparation s'effectue donc à un débit de 4 mL.min^{-1} selon les mêmes conditions illustrées au tableau 3.1 avec un volume injecté de 250 µL.

La récupération des fractions purifiées s'effectue à l'aide d'un collecteur branché en série à la suite du détecteur PDA (PhotoDiode Array). Une seule longueur d'onde de détection peut être utilisée. Au regard des spectres UV des composés identifiés par HPLC analytique, la longueur d'onde de 297 nm a été choisie et permet de détecter à la fois les composés présentant un spectre de type tabersonine (T1, T2, T3, T4 et tabersonine) et ceux présentant un spectre de type catharanthine (catharanthine, cathB, R1 et R2). Les spectres de ces composés sont présentés en annexe A.

3.3.3- Résultats

Le chromatogramme présentant l'analyse semi-préparative de la 3ème élution est présenté à la figure 3.4.

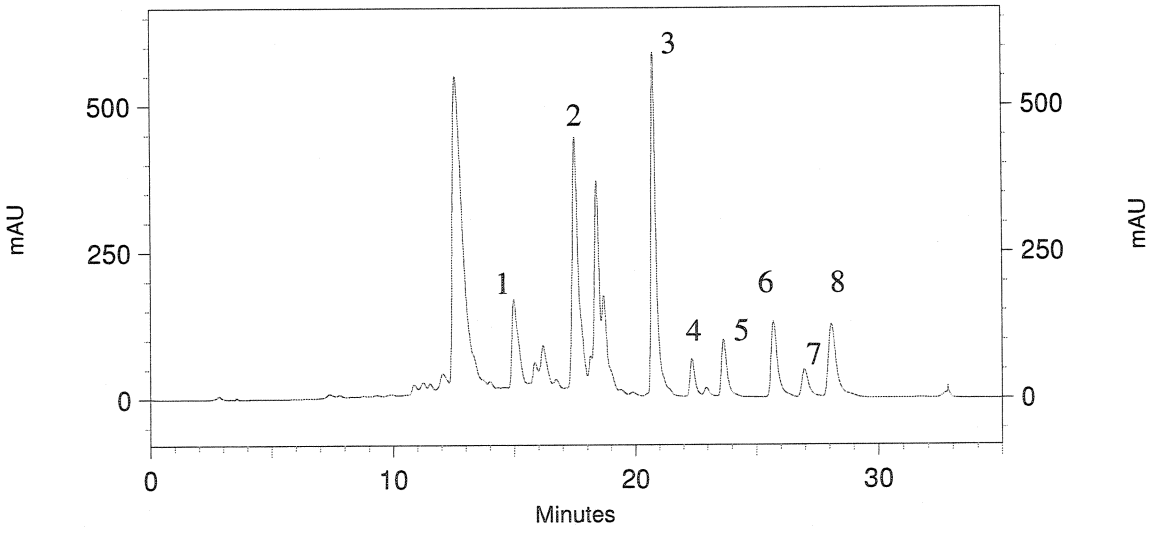


Figure 3.4 Chromatogramme HPLC d'un extrait racinaire de *C. roseus* séparé par la méthode semi-préparative.
La détection des composés a été effectuée à 297 nm. 1 : T1, 2 : catharanthine, 3 : T2, 4 : R1, 5 : T3, 6 : tabersonine, 7 : R2, 8 : T4

Aucun composé n'apparaît dans les 11 premières minutes indiquant que la pré-séparation sur cartouche extractive C18 est efficace. Seuls les composés d'intérêt sont présents dans l'élution #3.

La séparation est satisfaisante pour permettre une collection des pics de façon individuelle. Cependant, le composé Cath B n'a pu être dissocié de la catharanthine et a été collectée simultanément. 8 fractions ont été générées : T1, Catharnathine + Cath B, T2, R1, T3, Tabersonine, R2, T4. Dix injections successives (250 µL) ont été réalisées et les fractions récoltées pour chaque injection ont été additionnées pour chaque composé. Ces fractions ont été ensuite concentrées sous vide puis leur pureté a été testée par analyse HPLC. Les chromatogrammes des tests de pureté sont présentés en annexe (figures A.4 à A.9) . Toutes les fractions collectées présentent une importante pureté (≥98%) en mesurant l'aire du composé par rapport à la somme de l'aire de tous les pics présents. Seules quelques impuretés sont présentes dans la fraction de la tabersonine.

Ces fractions présentent donc une qualité satisfaisante pour une analyse de la structure chimique des composés en RMN.

Analyse RMN des fractions purifées

Les analyses de structure à des fins d'identification ont été effectuées sur les fractions purifiées par HPLC semi-préparative. Cependant, les concentrations de ces fractions se sont situées en-dessous du seuil de détection de l'appareil utilisé (RMN Inova 400MHz de Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) et aucune détermination n'a été possible. En dépit des nombreuses étapes de purification et de concentration, il n'a pas été possible de produire les composés inconnus en quantité suffisante. La faible production de ces composés par notre modèle *in vitro* rapporte un problème inhérent à l'extraction de principes actifs à partir de biomasse végétale. Ainsi, une importante quantité de tissus est nécessaire pour produire des quantités satisfaisantes. Cette faible productivité impose des coûts de production et de purification importants qui se traduisent par un prix très élevé de ces molécules sur le marché.

3.4- Adaptation d'un bioréacteur pour la culture de cellules végétales et animales

Les mesures de fluorescence en continu réalisés au cours de cette maîtrise ont été faites à l'aide d'une sonde multi-longueurs d'ondes (Delta Optics, Lingby, Danemark), composée d'un manchon insérable dans un port de 25 mm stérilisable *in situ*. Notre laboratoire dispose de plusieurs bioréacteurs à cuve de verre utilisés pour la culture de cellules végétales ainsi que de plusieurs fermenteurs en acier inoxydable adaptés à la culture de microorgansimes. Seuls ces derniers possèdent un port de 25mm dans lequel peut s'insérer la sonde employée pour les mesures de fluorescence. Nous avons choisi de réaliser les différentes cultures au cours de cette étude sur un bioréacteur Chemap de volume utile 3,5 L (Chemap Alfa-Laval, Zurich, Suisse). Les configurations obtenues seront présentées dans la section Résultats (3.4.3).

3.4.1- Objectif

Il a été nécessaire de modifier le design du bioréacteur pour répondre aux différentes exigences de la culture de cellules mammifères et végétales. Ces types cellulaires sont très sensibles au cisaillement engendré lors de l'agitation (Jolicoeur et al., 1992, Kieran et al., 1997). Il est donc indispensable d'installer un agitateur générant un faible taux de cisaillement avec un taux de transfert satisfaisant.

3.4.2- Matériels et méthodes

Toutes les parties ajoutées et les soudures réalisées sur les éléments du bioréacteur ont été effectuées en acier inoxydable 316L.

Agitateur

L'agitateur choisi est un ruban hélicoïdal double (RHD) composé de 3 parties. Chaque partie correspond à 0,5 révolution, dont l'assemblage sur l'arbre d'agitation permet d'obtenir un double ruban de 1,5 tour. La hauteur finale de l'agitateur est de 7 cm. Les bandes sont d'une largeur de 21 mm permettant d'obtenir un diamètre externe de 11,7 cm, soit un écart à la paroi de 12 mm. 4 chicanes de surfaces (40 x 80 mm) sont ajoutées afin d'améliorer le mélange.

Aération

Deux modes d'aération ont été utilisés. Une aération de surface par injection d'un mélange d'oxygène, d'azote et de CO_2 dans la phase gazeuse du réacteur a été choisie pour la culture des cellules animales NSO. En effet, le bullage entraîne un cisaillement important pouvant être néfaste pour ce type de cellules. Les cellules végétales présentent une demande en oxygène importante car elles sont cultivées à relativement haute densité (60% du volume de cellules compactées) et il est nécessaire de buller à l'intérieur du réacteur pour que le transfert de masse soit suffisant pour survenir à cette demande. La présence de l'agitateur (RHD) qui occupe 83 % de la section de la cuve nécessite la mise en place d'un port d'aération supplémentaire à celui existant. Le nouveau port mis en place a été connecté à l'entrée normale des gaz située sur le couvercle du réacteur. Un aérateur en acier inoxydable poreux (20mm) a été installé au fond de la cuve du réacteur. L'étanchéité entre l'aiguille piquée dans le port d'aération et le tube d'aération est assurée par un raccord Swagelock® emprisonnant un joint torique en buna®.

Échantillonnage

Pour la culture de cellules de mammifères, le port d'aération construit pour la culture de cellules végétales est inutile puisque l'aération se fait en surface. Ce port d'aération a donc été utilisé comme port d'échantillonnage. Le diffuseur est alors enlevé et une aiguille plus longue (80mm) a été installée sur le port d'échantillonnage afin de garantir l'étanchéité.

La viscosité des cultures de cellules végétales empêche l'utilisation d'un port d'échantillonnage de faible diamètre standard. Il a donc été nécessaire de mettre en place un nouveau port adapté. Celui-ci est composé de 2 parties. La partie interne au bioréacteur est constituée d'un tube d'échantillonnage en acier inoxydable (diamètre interne : 8mm) qui est plongé dans la suspension au dessus du RHD. La partie externe est munie d'une vanne à bille reliée à un flacon d'échantillonnage classique par un tube flexible de même diamètre. La partie interne a été stérilisée *in situ* avec le reste du bioréacteur tandis que le tube flexible est stérilisé à part à l'autoclave (20 min, 121°C) puis ensuite inséré de façon aseptique sur la vanne du port.

Adaptation des ports de sonde

Suite à l'encombrement de l'intérieur du réacteur dû au RHD, les ports de sonde latéraux ont été artificiellement prolongés de 40 mm pour la sonde à oxygène, de 30 mm pour la sonde à pH et de 27 mm pour la sonde à fluorescence.

Mesure du taux de transfert en oxygène

Le taux de transfert en oxygène a été mesuré pour chacune des configurations dans les conditions de culture respectives (suivant le type d'aération requis par la configuration, la température du liquide lors de la culture, le débit des gaz utilisé en

culture). Ainsi, l'évolution de la concentration en oxygène dissous a été suivie par une sonde polarigraphique (Mettler-Toledo, Mississauga, Ontario, Canada) après injection d'azote ou d'air dans le réacteur.

3.4.3- Résultats

Le bioréacteur modifié a donc permis 3 configurations différentes. Chacune est adaptée à la culture en mode cuvée de microogranismes (figure 3.5), de cellules animales (figure 3.6) et de cellules végétales (figure 3.7). Chacune de ces configurations a été utilisée au cours de ces travaux de recherche.

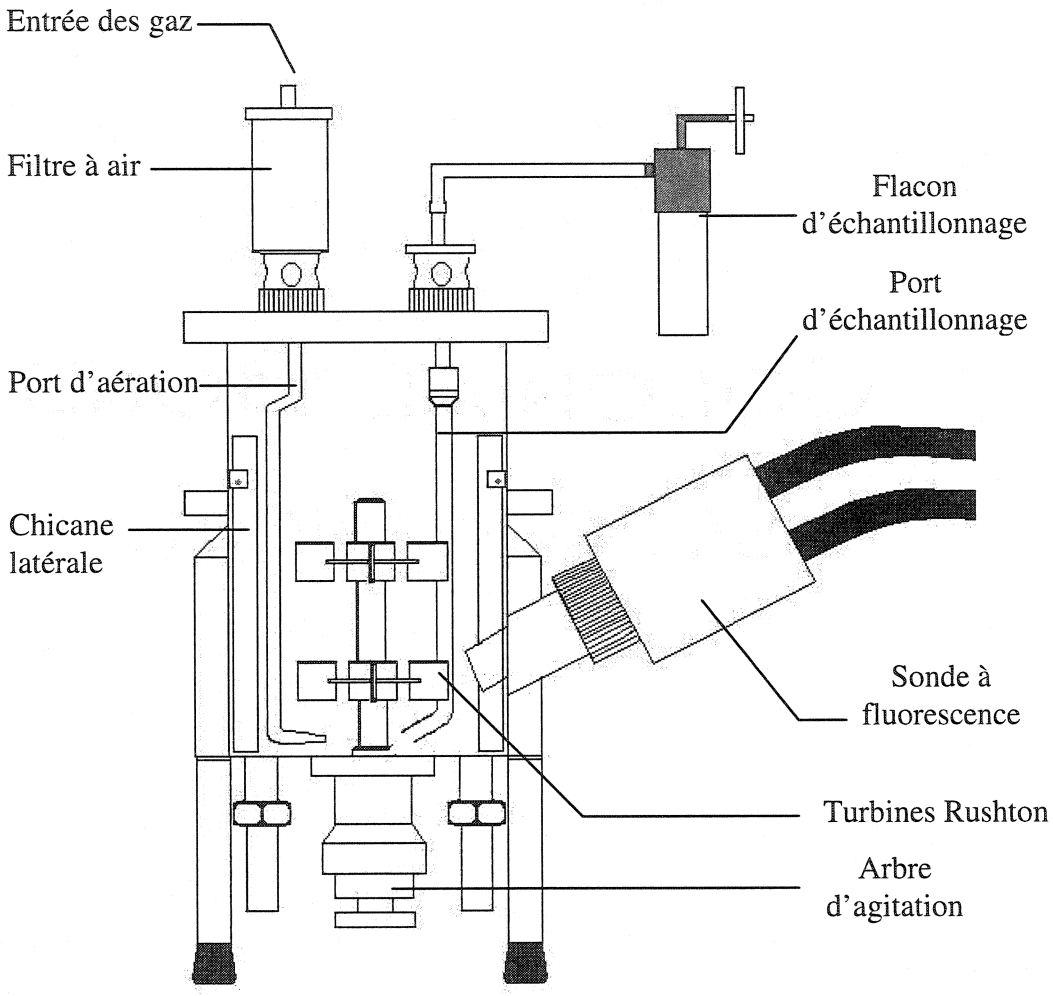


Figure 3.5 : Schéma du bioréacteur dans la configuration pour la culture de levures

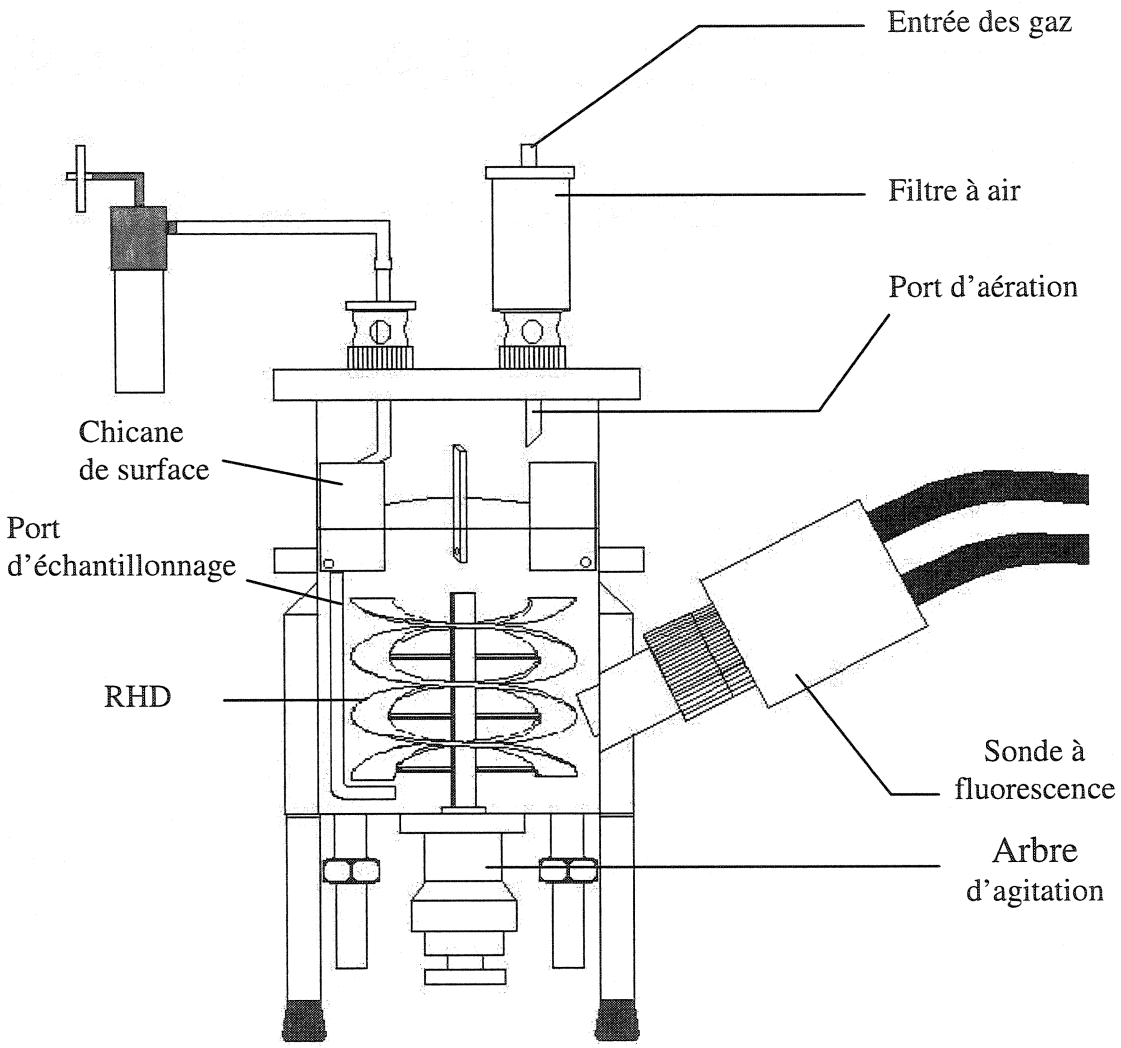


Figure 3.6 : Schéma du bioréacteur dans la configuration pour la culture de cellules animales.

RHD : Ruban Hélicoïdal Double.

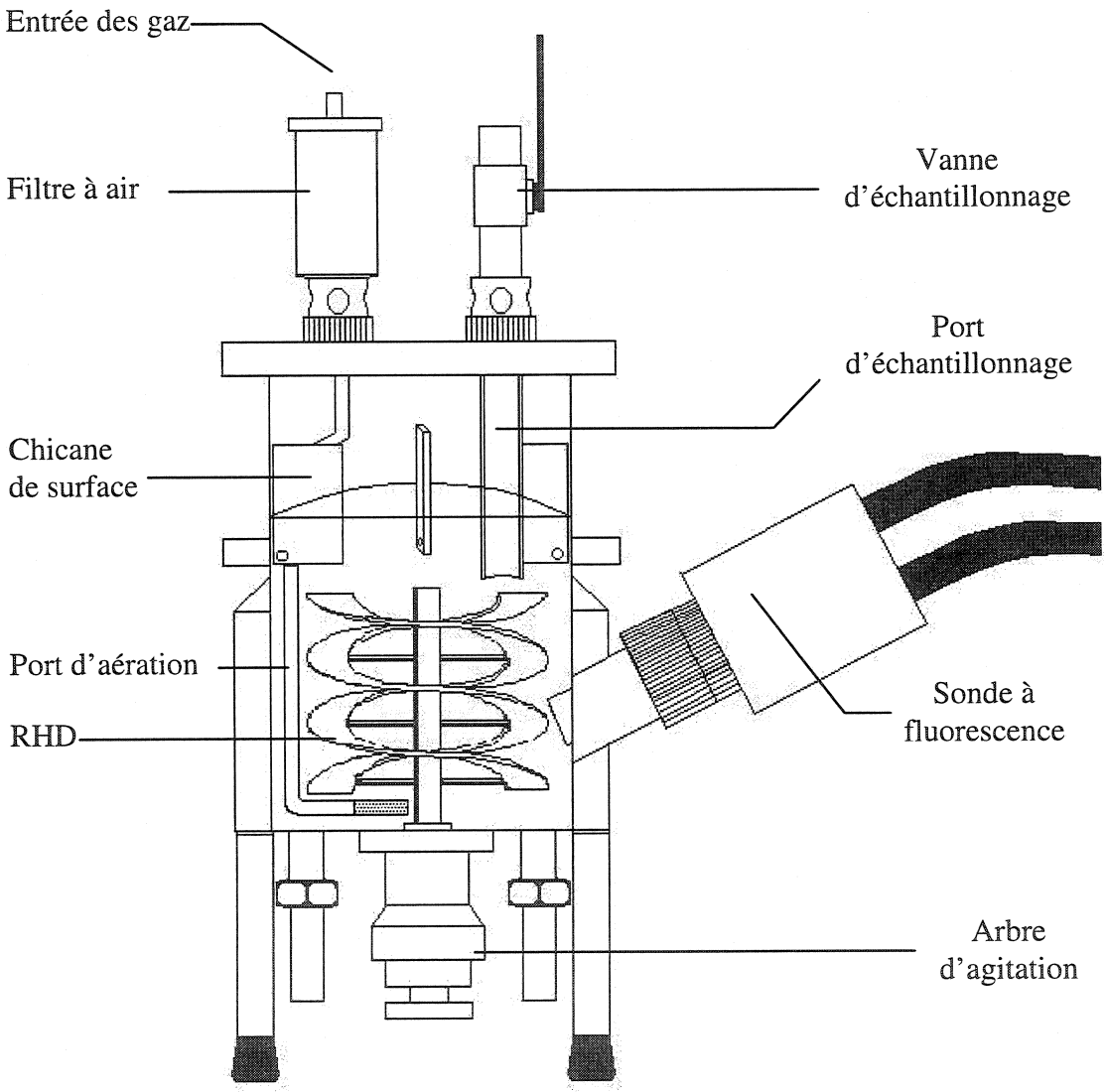


Figure 3.7 : Schéma du bioréacteur dans la configuration pour la culture de cellules végétales.

RHD : Ruban Hélicoïdal Double.

Les configurations ont été testées quant à leur capacité à permettre une aération suffisante pour les cultures. Ainsi, la capacité de transfert en oxygène à l'intérieur du réacteur a été mesurée pour les 3 configurations.

Les coefficients de transfert d'oxygène (K_La) obtenus pour les différentes configurations sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3.3. Coefficients de transfert en oxygène (K_La) obtenus pour les différentes configurations de bioréacteur.

Configuration	Agitation	Aération	Température	K_La
cellules végétales	RHD 60 rpm Pompage vers le bas	bullage 200 mL.min^{-1}	25°C	2,5 h^{-1} ± 0,3
cellules animales	RHD 45 rpm Pompage vers le bas	surface 250 mL.min^{-1}	37°C	0,6 h^{-1} ± 0,2
levures	2 turbines Rushton 200 rpm	bullage 1 L.min^{-1}	30°C	42,2 h^{-1} ± 2,1

Afin de vérifier si les coefficients de transfert en oxygène sont satisfaisants pour l'aération des cellules suivant les 3 différentes configurations, il faut vérifier que l'apport en oxygène (OTR) sera suffisant par rapport à la respiration cellulaire (OUR).

Les valeurs de taux de consommation spécifique d'oxygène (qO_2) utilisées ont été déterminées expérimentalement pour la levure *Pichia pastoris* sur le substrat glycérol, par Jorjani et Ozturk (1999) pour les cellules animales, et par Jolicoeur et al., (1992) pour les cellules végétales de *C. roseus*.

L'OUR est calculé selon l'équation 3.4

$$OUR = qO_2.X \qquad (3.4)$$

où X représente la concentration cellulaire

L'OTR est calculé selon l'équation 3.5.

$$OTR = k_{La}(C^*-C_L) \quad (3.5)$$

où C* est la concentration saturée en oxygène

et C_L : est la concentration en oxygène dans le liquide

Les calculs ont été effectués en utilisant une biomasse attendue maximale, une C_L se situant au point de consigne d'opération et l'aération par de l'oxygène pur (pour cellules animales et végétales) ou de l'air pour la culture de levures. La solubilité de l'oxygène en fonction de la température a été prise en compte selon la loi de Henry pour le calcul de C*.

Les résultas de ces calculs sont présentés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 OUR et OTR calculés pour les différentes configurations de bioréacteur.

	qO_2	C* (mmol.L^{-1})	C_L (mmol.L^{-1})	OUR (mmol.h^{-1}.L^{-1})	OTR (mmol.h^{-1}.L^{-1})
levures	2,2 mmol.g DW^{-1}.h^{-1}	0,5	0,047	22	14,77
plantes	0,25 mmol.g DW^{-1}.h^{-1}	1,125	0,151	1,25	3,46
animales	0,22 mmol.10^6 cell.mL^{-1}.h^{-1}	1,05	0,126	0,23	0,68

Le coefficient de transfert le plus élevé (42,2 h^{-1}) est obtenu avec la configuration pour les levures. Toutefois, cette valeur ne permet pas de répondre à la demande en oxygène de la biomasse (OUR > OTR) pour la vitesse d'agitation spécifiée. Lors de l'opération du bioréacteur, la vitesse d'agitation va donc devoir être augmentée pour améliorer le transfert en oxygène. En effet, les levures étant peu sensibles au cisaillement mais consommant de façon importante, il est permis d'imposer une vitesse d'agitation plus élevée sans nuire à la culture.

Pour les cellules végétales, le k_La obtenu est de 2,5 h^{-1}, ce qui est faible pour une aération par bullage. Toutefois, la sensibilité des cellules au cisaillement empêche une agitation plus rapide. De plus, comme les cultures effectuées ne sont pas à très haute densité cellulaire (≤ 5 g DW/L) , ce coefficient est suffisant pour répondre à la demande en oxygène (Tableau 3.4).

L'aération de surface présente le taux de transfert le plus faible avec 0,6 h^{-1}. La surface d'échange entre le gaz est le liquide est minimale et l'agitation (45 rpm) ne permet pas de créer de vortex ni d'entrainer des bulles d'air vers l'intérieur du liquide et ainsi d'exploiter pleinement les chicanes de surface. La valeur obtenue est néanmoins comparable à celle mesurée dans des conditions similaires au cours d'une autre étude (Jolicoeur et al., 1992). L'enrichissement de la phase gazeuse en oxygène sera suffisant pour maintenir une culture de cellules animales à une densité de $2.5.10^6$ cellules/mL.

Chapitre 4 – Établissement d'une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus* à partir de racines transformées

4.1- Introduction

Depuis plusieurs années, les travaux réalisés au sein de l'unité de recherche reposent sur divers modèles cellulaires végétaux. Ainsi, plusieurs lignées ont été développées, dont une lignée cellulaire de *Eschscholtzia californica* dont le potentiel de production d'antimicrobiens (sanguinarine et dérivés) a été étudié. Les autres cultures ont été effectuées sous forme de racines transformées, après transformation par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* afin de développer des modèles nutritionnels ou métaboliques (Bouchard-Marchand 2000, Tikhomiroff 2001, Leduc 2004). L'intérêt de la culture de tissus végétaux sous forme de racines transformées pour la production de métabolites secondaires a été démontré dans la section 2.2 de ce document. Bien que la culture *in vitro* de racines transformées soit un procédé maîtrisé au laboratoire, le manque d'homogénéité en culture représente un inconvénient majeur pour les études spectroscopiques réalisées au cours de ce travail de Maîtrise. Ainsi, une lignée cellulaire en suspension de *Catharanthus roseus* a été développée à partir de racines transformées. L'objectif principal étant de bénéficier d'un modèle d'étude homogène de production de métabolites secondaires sous la forme d'une lignée en suspension.

4.2- Problématique

Le développement d'une lignée cellulaire en suspension se fait généralement à partir de plantules. Les différents organes de la plante peuvent être utilisés tels que le bouton floral, les graines, la tige ou les feuilles (Bourgaud et al., 2001). Dans tous les cas, le principe consiste à utiliser des tissus différenciés puis d'initier une dédifférenciation de ces cellules afin que celles-ci se développent sous une forme unicellulaire adaptable à la culture en suspension. Un contrôle des conditions environnementales, nutritionnelles et du jeu hormonal imposés à ces cultures est la clef de la dédifférenciation.

Quelque soit le tissu d'origine utilisé pour le développement d'une lignée en suspension, le schéma mis en place est le suivant :

- sélection du tissu d'origine
- formation de cals
- mise en suspension des cals
- stabilisation de la lignée en culture

Un cal consiste en un amas de cellules végétales dédifférenciées qui se divisent activement.

L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation de racines transformées comme tissu initial.

4.3- Matériel et méthodes

Choix du tissu d'origine. La lignée racinaire GAO de *C. roseus* (Tikhomiroff, 2001) a été sélectionnée parmi les six lignées de racines transformées disponibles au laboratoire. En effet, des essais antérieurs ont démontré que cette lignée possédait une croissance élevée ainsi qu'une réponse élevée à l'élicitation pour la synthèse des métabolites secondaires catharanthine, serpentine, tabersonine et löchnericine.

Culture des racines transformées. Les racines sont cultivées dans 25 mL de milieu liquide Minimum (Bécard et Fortin 1988) dont les concentrations en phosphate et saccharose ont été triplées par rapport aux conditions initiales (M3P3S). La durée des sous-cultures est de 30 jours.

Inititaion des cals. Les extrémités racinaires de 10 mm sont découpées aseptiquement à l'aide d'une lame de scalpel, puis placées sur milieu solide. Le milieu solide correspond au milieu M3P3S ou au milieu MS (Murashige and Skoog, 1962) dont la gélification a été induite par ajout de 0,4 % (w/v) de Phytagel® (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Des ajouts d'hormones végétales comme la kinétine et l'acide α-naphtalénique (NAA) ont été testées afin d'induire la formation de cals (tableau 4.1). Cette combinaison a été utilisée de façon efficace par plusieurs équipes de recherche (Geerlings et al., 1999 ; Zhao et al., 2001d, El-Sayed et Verpoorte, 2002). Les cultures ont été placées 21 jours à l'obscurité à 25°C.

Tableau 4.1. Les différents milieux et combinaisons hormonales testés pour l'induction de cals à partir de racines transformées de *Catharanthus roseus*.

Milieu	NAA (mg/L)	Kinétine (mg/L)
Milieu M3P3S	0	0
	1	0,1
Milieu MS	0	0
	1	0,1

Mise en suspension. Sept cals d'un diamètre d'environ 1 cm sont inoculés dans un flacon Erlenmeyer de 50 mL contenant 20 mL de milieu liquide. Le milieu liquide est de la même composition que le milieu d'initiation de cals mais ne contient pas d'agent gélifiant (Phytagel®). Les flacons sont placés à l'obscurité, sous agitation 130 rpm, 25°C, jusqu'à dissociation des cals, ce qui s'est effectué en 10 jours.

Stabilisation de la lignée. La lignée est sous-cultivée tous les 10 jours par dilution 1:2 dans du milieu frais pour les 3 premiers cycles de sous-culture puis 1:3 par la suite. Les flacons sont placés à l'obscurité, sous agitation 130 rpm, 25°C.

4.4- Résultats

Les racines placées sur milieu solide ont démontré des caractéristiques physiologiques très différentes. La capacité à former des cals ainsi que le développement de ceux-ci ont été les critères retenus en vue de la poursuite du protocole.

Le pourcentage de formation de cals en fonction du milieu d'induction utilisé est présenté à la figure 4.1.

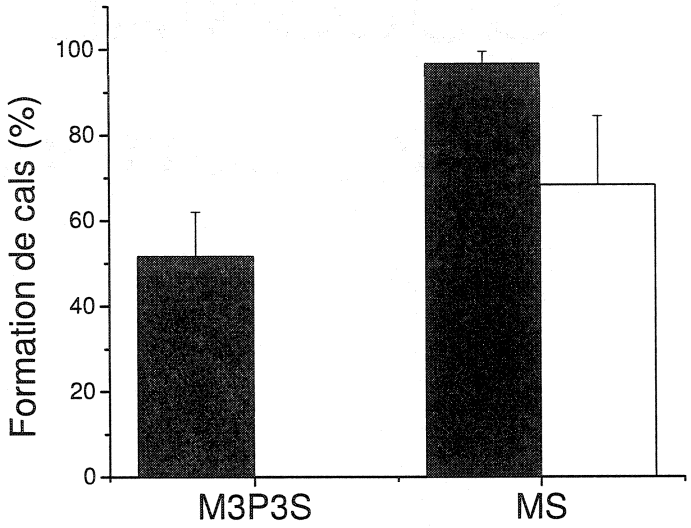


Figure 4.1 Pourcentage de formation de cals en fonction du milieu utilisé.
Les barres pleines représentent le milieu additionné d'hormones et les barres vides représentent le milieu dépourvu d'hormones. L'erreur standard est calculée sur 3 boites contenant 20 fragments racinaires chacune. Aucun cal n'est observé sur milieu M3P3S sans hormones.

Les racines placées sur milieu M3P3S solide dépourvu d'hormones n'ont formé aucun cal et ont continué à se développer sous forme de racines. L'ajout d'hormones dans le milieu a permis la formation de cals sur la moitié des racines mises en culture. Cependant, les cals étaient de petite taille (moins de 2 mm de diamètre).

Le milieu MS a quant à lui favorisé la formation de cals avec ou sans hormones. Sur le milieu dépourvu d'hormones, 70% des racines ont montré le développement de cals à leur surface. Ceux-ci étaient présents de façon ponctuelle sur les fragments racinaires et se sont développés sous forme d'amas sphériques localisés de 2 à 3 mm de diamètre.

Le développement le plus intense s'est effectué avec le milieu MS contenant 0,1 mg/L de kinétine et 1 mg/L de NAA. La formation de cals s'est effectuée de façon uniforme sur les racines. Au bout de 5 jours, on a pu remarquer une déchirure

longitudinale du cortex racinaire et l'émergence de nouvelles cellules après une semaine de culture. Après 21 jours de culture, les racines ne montraient plus aucune organisation et les cals apparaissaient sous la forme de cylindre de 5 mm de diamètre dont la longueur est déterminée par la taille du fragment racinaire.

Le milieu qui a été utilisé pour la maintenance et le développement des cals a été le MS, additionné de NAA 1 mg/l et de kinétine à 0,1 mg/L. Plusieurs auteurs font référence de l'utilisation de ce milieu pour l'induction de cals de *C. roseus* à partir de tiges (Zhao et al, 2000, Zhao et al. 2001d) ou pour la culture de cellules de *C. roseus* en suspension dérivées de cals (Canel et al., 1998).

Une suspension cellulaire a donc été établie tel que mentionné dans la section 4.3. Cependant, après trois sous-cultures, le développement de racines sous forme d'apex racinaires a été décelé dans les flacons. Les concentrations exogènes d'hormones ne semblaient pas alors suffisantes pour contrer l'effet de l'expression des oncogènes présents dans le Ri-TDNA et induisant le phénotype racines chevelues. Spena et al., (1987) ont démontré que les gènes *rolA*, *rolB* et *rol C* situés dans la région T_L du plasmide Ri d'*Agrobacterium rhizogenes* étaient suffisants pour induire la formation de racines adventives. Les gènes bactériens *aux* codant pour la biosynthèse d'auxines et situés sur la partie T_R du T-DNA sont responsables du phénotype « racines chevelues » ou *hairy roots* (Amselem et Tempfer, 1992). Ainsi, l'ajout de fortes concentrations d'auxines et de cytokines a eu pour effet de détourner le développement de racines au profit de la formation de cals. NAA à concentration élevée (2,5 µM) a démontré une inhibition de l'élongation racinaire des racines transformées de *Hyoscyamus muticus*. Le doublement des concentrations d'auxines et de cytokinines exogènes (soit une concentration finale en NAA de 2 mg/L et en kinétine de 0,2 mg/L) a été suffisant pour assurer une dédifférenciation de la culture et le développement sous forme de cals sans induction racinaire.

La figure 4.2. montre le développement de racines transformées sur milieu solide pour différentes concentrations hormonales.

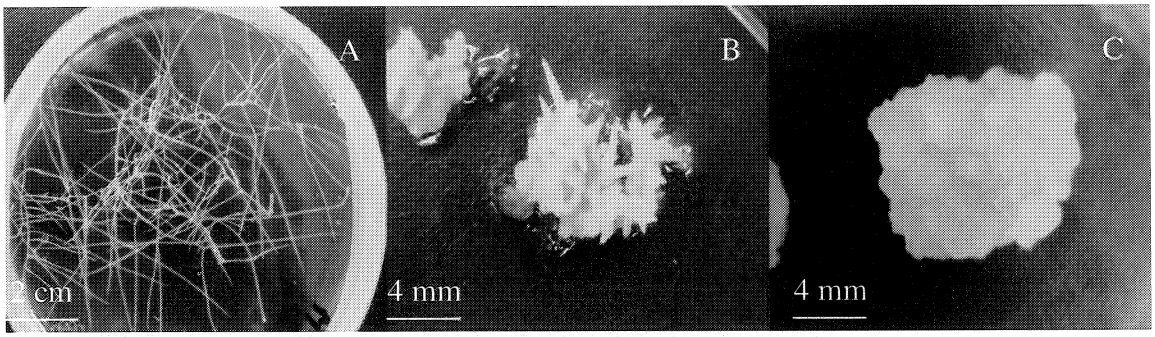


Figure 4.2 Développement de racines transformées de *C. roseus* sur milieu solide après 30 jours de culture.

A. Milieu M3P3S sans hormones (contrôle). B. Milieu MS + 1mg/L NAA + 0,1 mg/L kinétine. C. Milieu MS + 2 mg/L NAA + 0,2 mg/L kinétine.

L'expansion du tissu racinaire a été réalisée sur milieu M3P3S sans ajout d'hormones (figure 4.2A). L'utilisation d'un milieu plus riche en nutriments (MS) est suffisante pour l'induction de cals à partir de fragments racinaires (figure 4.2 C). Cependant, l'apparition de nouvelles racines apparaît rapidement si la concentration en NAA et kinétine n'est pas suffisante (figure 4.2 B).

Un des problèmes rencontrés dans l'établissement de la lignée en suspension a été une croissance quasi-nulle dans les conditions décrites. La suspension cellulaire a dû être concentrée d'un facteur cinq par décantation des cellules puis aspiration du milieu afin de permettre une croissance satisfaisante des cellules. Une trop faible concentration cellulaire ne permettait pas une croissance significative même après 10 jours de culture. Des observations similaires ont été faites par Sakano et al. (1995) pour une suspension de *C. roseus*. Néanmoins, les cellules restaient viables tel qu'observé par le dosage de l'activité estérase. Les cellules se divisant activement en culture rejettent dans le milieu certains peptides permettant d'établir un environnement de culture idéale pour la croissance. La présence de pentapeptides sulfatés, la phytosulfokine α et β, a été démontrée comme ayant un pouvoir dose-dépendant sur l'activité mitotique de cellules en suspension (Matsubayashi et Sakagami, 1996). Une trop faible densité cellulaire

pourrait empêcher la présence d'une concentration suffisante de ces molécules dans le milieu de culture. Après concentration de la suspension cellulaire, la croissance s'est développée au cours des sous-cultures et le taux de croissance s'est stabilisé. Une estimation de la croissance pour une sous-culture classique est présentée en figure 4.3. La lignée stabilisée porte le nom de CR1.

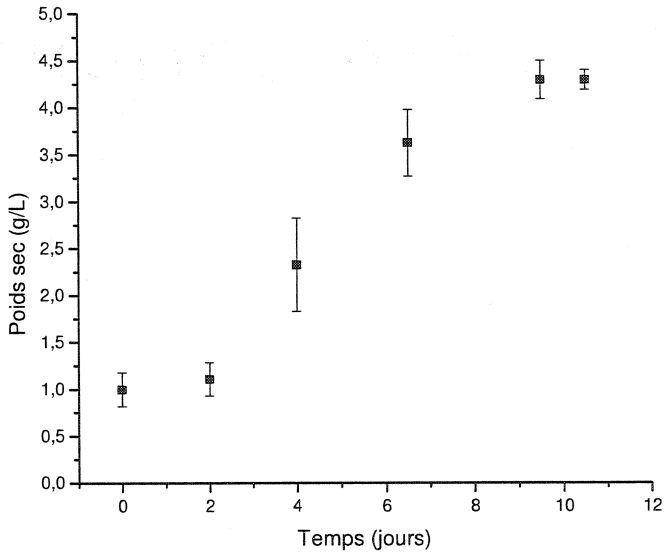


Figure 4.3: Courbe de croissance de la lignée CR1.

La lignée a été cultivée dans du milieu MS+ NAA 2mg/L + 0,2 mg/L de kinétine en flacons agités après 5 mois de sous-culture. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard pour n=3 flacons à chaque mesure.

Chapitre 5 – Suivi de cultures de cellules végétales en suspension par fluorescence *in situ*

5.1- Présentation de l'article

L'application de la culture de cellules végétales à un procédé industriel est très difficile, notamment par le manque de productivité des lignées pour les composés d'intérêt mais aussi par le manque de reproductibilité des cultures. Il est alors tentant de vouloir suivre l'évolution de la culture en tant réel afin d'obtenir le maximum de données à son sujet.

Ce chapitre présente l'étude du suivi de deux cultures d'*Eschscholtzia californica* et de *Catharanthus roseus* par une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde. La culture d'*E. californica* s'est déroulée en flacons alors que la culture de *C. roseus* a été effectuée en bioréacteur avec la lignée développée au chapitre 4 de ce mémoire. Les paramètres testés pour le suivi de la biomasse sont le NAD(P)H, le tryptophane et les riboflavines (riboflavine, FAD, FMN) qui sont tous des fluorophores endogènes. L'évolution du signal de NAD(P)H dans la culture d' *E. californica* a démontré que celui-ci n'était pas relié à biomasse directement, mais plutôt à l'activité cellulaire. Comme l'activité métabolique semble constante dans la culture de *C. roseus*, ce signal peut être utilisé comme rapporteur de la concentration cellulaire dans ce cas. Le tryptophane mesuré par la sonde correspond au signal global du tryptophane libre et à celui contenu dans les protéines. La variation de ces deux ensembles dans la culture influe donc sur l'intensité du signal. Les alcaloïdes totaux d'*E. californica* et les alcaloïdes ajmalicine et serpentine de *C. roseus* ainsi que leur précurseur indole, la tryptamine, peuvent être suivi en temps réel par la sonde à fluorescence.

La mesure de fluorescence se révèle donc comme un outil non-invasif permettant de suivre en temps réel l'évolution d'une culture végétales, que ce soit au niveau du comportement métabolique des cellules ou de la production d'alcaloïdes fluorescents.

L'article suivant a été soumis à la revue *Biotechnology Progress*.

5.2- Manuscript # 1

Plant cell culture monitoring using an *in situ* multi-wavelength fluorescence probe

Steve Hisiger and Mario Jolicoeur*

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools

Bio-P^2, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal,

P.O. Box 6079 Centre-ville Station, Montréal, Québec

*Corresponding author

5.2.1- Abstract

A multi-wavelength fluorescence probe is proposed for *in situ* monitoring of *Eschscholtzia californica* and *Catharanthus roseus* plant cell cultures. The potential of the probe as a tool for real-time estimation of biomass and production of secondary metabolites has been studied. The probe excitation range is 270-550 nm and the emission range is 310-590 nm, with a step of 20 nm for both excitation and emission filters. Many endogenous fluorophores such as NAD(P)H, riboflavins (riboflavin and derivatives such as FMN, FAD), tryptamine and tryptophan, and fluorescent secondary metabolites were analysed simultaneously. The NAD(P)H fluorescence signal (350/450 nm) showed to be an adequate signal for estimating cellular activity. Riboflavins fluorescence signal (450/530 nm) followed *C. roseus* cell concentration both for the growth phase and after elicitation with jasmonic acid. Fluorescence from the alkaloids interfered with the NAD(P)H signal during the production phase. For *C. roseus*, tryptophan, tryptamine, ajmalicine and serpentine were monitored by the probe. For *E. californica*, fluorescence from alkaloids overlapped with that of riboflavins preventing use of the probe to follow cell growth. Global alkaloids production could be followed using the probe.

5.2.2- Introduction

Fluorescence measurement is a very sensitive method enabling non-invasive detection at micromolar level. In the last decades, several fluorescence probes that can be used *in situ* in bioreactors (Hitachi, Ocean Optics, Delta Optics, Ingold) were developed to monitor culture behaviour. Most of these probes were limited at monitoring a unique parameter using pre-determined excitation/emission (ex/em) wavelengths. Indirect biomass estimation was performed through different autofluorescent intracellular molecules such as tryptophan and NAD(P)H. Furthermore, monitoring of the degradation or of the production of a fluorescent compound has also been reported (*1, 2*). However, the development of multi-wavelength probes allowing scanning cell suspensions at different excitation and emission wavelengths has significantly increased the amount and quality of the information to be monitored. One can then target several specific fluorescent molecules through the use of specific optic filters mounted on filterweels. The time delay between each fluorescence signal measurement then depends on mechanical and electronic delays required to change excitation and emission filters. Biomass and redox potential have been estimated on-line via fluorescence signals from tryptophan and NAD(P)H respectively using a single probe (*3*). Tartakovsky et al. (*4*) were able to estimate growth, glucose and metabolic by-products production while monitoring *E. coli* and *S. cerevisae* cultures. These authors scanned a 2D fluorescence spectrum and analysed by a stepwise multiple regression procedure selecting specific pairs (excitation/emission) of wavelengths. They found that tryptophan, pyridoxine and riboflavins signals could be correlated with biomass concentration, and signal from an undetermined compound (270/500 nm) allowed for the estimation of glucose concentration. Similar study performed with *Pseudomonas fluorescens* (*5*) revealed that O_2 in the exhaust gas could be followed with the integration of multiple signals above 290/390 nm. For quantitative studies using molecular probes such as for intracellular pH and Ca^{2+}, ratiometric measurements using dual excitation and emission wavelengths have

shown to be more reliable than using a unique florescence signal (*6 and references therein*).

Most of plant phytomolecules of therapeutic interest are composed of several aromatic rings with delocalised pi electrons. These molecules can thus be detected under fluorescence and/or UV absorbance. Phytomolecules identification and quantification can be performed using HPLC and TLC techniques. Several extraction and concentration steps are usually needed before being able to perform HPLC and TLC analysis. In addition, reproducible and representative sampling of plant cell suspension in a bioreactor is tedious due plant cell characteristics. Plant cell suspensions are highly viscous, show rheofluidifiant behaviour at high density (*7*) and exhibit a large cell and aggregate size distribution. Therefore, the use of a probe capable of on-line estimation of culture state parameters such as cell concentration, cellular activity level and secondary metabolites production could then be highly useful.

In this work the use of a multi-wavelength fluorescence probe was studied to monitor plant cell culture. The probe capacity to follow on-line plant cell concentration, cellular activity, precursors of secondary metabolism and secondary metabolites was evaluated. Suspension cell cultures were performed with *Escholtzia californica* and *Catharanthus roseus* in shake flasks and in bioreactor, respectively.

5.2.3- Materials and Methods

5.2.3.1- *Eschscholzia californica* suspension cell culture

To obtain plant cell calluses, sterile hypocotyls sections of *Eschscholzia californica* were placed on solid B5 medium (*8*) containing 30 $g.l^{-1}$ of glucose (Sigma, Oakville, Ontario, cat # G-5767) as well as 0.2 of $mg.l^{-1}$ 2,4, dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Sigma, Oakville, Canada, cat # D7299) and 0.1 $mg.l^{-1}$ of kinetin (Sigma, Oakville, Canada, cat # K0753), adjusted to pH 5.6 using KOH. Cell suspension cultures

were initiated by adding calli to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 170 g of B5 medium (same composition as described above) maintained at 130 rpm, 24°C ± 2°C. Cells were subcultured every 10 days by adding 80 g of cell suspension in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 170 g of B5 medium. For the experiments, 10-d-old cells were inoculated at 33% of the final volume in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 60 mL of B5 medium. Cultures were maintained in the dark on an orbital shaker at 130 rpm, 25°C ± 2°C.

5.2.3.2- *Catharanthus roseus* suspension cell culture

Hairy roots were obtained by leaf transformation with *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 (*9*). The Gao cell line was used to initiate a cell suspension from hairy roots. Root tips (2 cm) were placed on solid Murashige-Skoog (MS) medium (*10*) supplemented with 0.4 % (w/v) Phytagel (Sigma, Oakville, Canada, cat # P-8169) and the following hormones : Naphtalene Acetic Acid (NAA) (Sigma, Oakville, Canada, cat # N0640) 1 $mg.L^{-1}$ and kinetin (Sigma, Oakville, Canada) 0.1 $mg.L^{-1}$. Roots were placed in a incubator at 25°C ± 1°C for callus induction. After 3 weeks, calli from roots were excised with a sterile sharped blade then placed in other Petri dishes containing the same medium. After 2 three weeks subculture cycles, seven white-yellow calli of approximately 1 cm of diameter were put in 50 mL Erlenmeyer flasks with 20 mL liquid MS medium containing 1 $mg.L^{-1}$ of NAA and 0.1 $mg.L^{-1}$ of kinetin. Flasks were maintained in the dark on an orbital shaker at 130 rpm 25°C ± 1°C. After calli broke up by shaking (10 days) the cell suspension was progressively subcultured every 10 days with a 1:2 ratio for 1 month to obtain cell suspension at 200 g FW (fresh weight). At this moment, hormones concentration was doubled, because calli with small root tips were present in the flasks. Doubling the NAA and kinetin concentrations allowed to obtain an homogenous cell suspension without callus development. Cells were then subcultured every 10 days at an inoculation ratio of 1:4 in MS with 2 $mg.L^{-1}$ of NAA and 0.2 $mg.L^{-1}$

of kinetin. Subcultures were performed for a minimum of 8 months and a stable cell line CR1 was kept for this work.

5.2.3.3- Bioreactor design and operation

A 3.5 L working volume reactor vessel (Chemap, Alfa-Laval, Switzerland) was used to culture *C. roseus* cell suspension. The agitator was modified according to Jolicoeur et al. (*7*) to minimize shear stress and to allow for adequate mixing of the cell suspension. A double helical ribbon was designed (Height: 7 cm ; External diameter 11.7 cm, Pitch=1.5 revolution, Blade width=2.1cm). Four surface baffles (4 x 8 cm) were placed at the top of the vessel to maximize oxygen transfer rate. The bioreactor was sterilized for 1 hour at 121°C and at 1 atm, cooled under a sterile flow hood, then filled with 2 L of sterile MS medium. The bioreactor was inoculated at 40 $g.L^{-1}$ FW with 10 d-old *C. roseus* CR1 cells. Temperature was maintained at 25°C ± 1°C and the culture was performed in the dark. Agitation was set at 60 rpm and was kept constant. Aeration was performed bubbling a mixture of air and oxygen at a constant total flow rate of 0.1 vvm trough a porous (2 µm) stainless steel gas sparger. The air:O_2 gas ratio was determined by a PI controller with a set point for the dissolved oxygen at 60% of air saturation. A sampling tube mounted on the bioreactor head plate was especially designed (diameter of 1.2 cm) to permit sampling viscous plant cell broth. A volume of 75 mL was sampled on a daily basis.

5.2.3.4- Elicitation

To stimulate secondary metabolism, both *E. Californica* and *C. roseus* cultures were elicited by adding a chitin (Sigma, Oakville, Canada, cat # C3641) crude extract and jasmonic acid (Sigma), respectively. The chitin and jasmonic acid solutions were sterilized in an autoclave at 121°C and 1 atm for 30 min. 9 mL of the chitin solution (20 $g.L^{-1}$ in B5 medium) was added in each flask at day 4, and 500 mL of MS medium

containing jasmonic acid (Sigma, , Oakville, Canada, J2500) was injected into the bioreactor at day 7 to obtain a final concentration of 25 $mg.L^{-1}$.

5.2.3.5- Fluorescence Measurement

In situ fluorescence measurements were performed using a multi-wavelength fluorescence probe (Delta Light and Optics, Lyngby, Denmark). Briefly, the probe consists of a central unit which contain a Xe lamp as light source and a probe which can be inserted into a classical 70 mm long and 25 mm in diameter side port. The probe is linked to the central units by two optical channels, one to conduct the excitation light and the other to return the emission signal. Two independent filterwheels containing 15 filters each with a bandwidth of 20 nm are mounted to select the wavelength of excitation and the wavelength of emission. The emission signal is collected and amplified by photomultiplicator. A 2-Dimensional spectrum can be collected from 270nm to 550nm for excitation and from 310 nm to 590 nm for emission within one minute total. Fluorescence spectra were acquired from standard solutions diluted in fresh medium. Standard solutions of tryptophan, tryptamine, ajmalicine and serpentine were diluted in MS at pH 5.7. Standard solutions of sanguinarine chelerythrine and chelirubine were diluted in B5 at pH 5.7. 7 mL of each standard solution were poured into a in-house black polypropylene cylinder chamber and the probe was immerged into the liquid in taking care to avoid bubble formation on the surface of the probe window. Acquisition was performed using a gain of 1300 (on a maximum of 4095) for every measurement.

5.2.3.6- Alkaloids extraction and analysis

Sample analysis

10 mL out of the 75 mL cell suspension sample were filtered through a Whatman GF/D 47 mm filter (Fisher Scientific, Nepean, Canada, cat # 09-874-48) to determine fresh weight then dry weight after 24 h at 60°C. 50 mL of the remaining cell suspension sample were used for subsequent analysis and processed as follows. After filtration

through a Whatman GF/D 47 mm filter (Fisher Scientific) under light vacuum, medium was kept at -20°C and cells were washed twice with 30 mL distilled water. Then the cells were immediately frozen in liquid nitrogen, crushed in a pre-cooled mortar, aliquoted in 2 mL cryovials (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada, cat # 03-374-21), then stored in liquid nitrogen until analysis.

Alkaloids extraction and analysis

Approximately 200 mg FW of cells were freeze-dried overnight then extracted twice with 4 mL of acidified methanol (0.5 % HCl; v/v) in a sonicating bath for 30 min. The extract was then centrifuged for 5 min at 10,000 g and 3 mL was reduced to dryness under vacuum and re-suspended in 800 µL of acidified methanol. Alkaloids extraction of extracellular medium for *E. californica* was performed by a solid phase extraction on a Phenomenex Strata C_{18}-E column (3 mL capacity, 500 mg packing, cat # 8B-S001-HBJ) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column was conditioned with 5 mL of acidified MeOH (0.5 % HCl; v/v) followed by 3 mL of distilled water. 30 mL of the sampled medium were then loaded and a 3 mL wash (10 % acidified MeOH in water; v/v) was applied before the final elution with 1 mL of acidified MeOH (0.5% HCl; v/v).

Alkaloids extraction from *Catharanthus roseus* culture medium was performed by solid phase extraction with a Phenomenex Strata C_{18}-T column (3 mL capacity, 200 mg packing, cat # 8B-S004-FBJ). The column was conditioned with 3 mL of acetonitrile followed by 3 mL of distilled water. 30 mL of the sampled medium was then loaded and a 3 mL wash with water was applied before final elution with 1 mL of acidified MeOH (0.5% HCl; v/v). Tryptophan, tryptamine, TIAs (Terpenes Indole Alkaloids) and benzophenanthridine alkaloids were quantified off-line from HPLC analyses. The HPLC apparatus consists in a Beckman Coulter pump module 126 and a model 508 Beckman Coulter auto-sampler, coupled with a Jasco model 821-FP fluorescence detector and a Beckman Coulter model 168 photo diode array absorbance detector (Beckman, Mississauga, Canada). Chromatographic separation was obtained using a Zorbax Eclipse XDB-C_{18} column (250 mm x 4.6 mm I.D.; 5 µm) coupled with a Phenomenex

Securiguard C18 guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA, cat # AJO-4287) maintained at 35°C.

Benzophenanthridine alkaloids

The method used for the analysis of sanguinarine, chelerythrine and chelirubine was developed by Klvana et al. (*11*). Injection volume was 20 µL and the flow rate was set at 1.5 $mL.min^{-1}$. The mobile phase consisted in solvent A: 50mM H_3PO_4, pH adjusted to 3 with KOH and solvent B: acetonitrile. The elution profile was: 0-2 min: 25% B; 2-12 min: linear gradient to 35% B; 12-14min: 35%B; 14-22 min: linear gradient to 80% B; 22-29 min: 80% B; 29-31min: linear gradient to 25% B, 31-33 min: 25%. Sanguinarine, chelerythrine and chelirubine were quantified by fluorescence (450/570 nm) using standard solutions.

Terpene indole alkaloids and precursors

Terpene indoles alkaloids (TIAs) were quantified according to the method developed by Tikhomiroff and Jolicoeur (*12*). Mobile phase was $NH_4C_2H_3O_2$ (Sigma, cat # A7330) 50 mM pH 6 (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The eluent profile (volume solvent A : volume solvent B) was: 0-20 min, linear gradient from 80:20 to 20:80; 20-30 min, isocratic elution with a 20:80 mixture; 30-35 min: isocratic elution 20:80 for column re-equilibration. The injection volume was 20 µL and and flow rate was 1 $mL.min^{-1}$. Tryptophan, tryptamine and ajmalicine were analysed with the Dagnino's method adapted by Tikhomiroff and Jolicoeur (*12*). Injection volume was 20 µL and separation occurred with an isocratic elution at 1.8 $mL.min^{-1}$ of a mixture of 15% H3PO4 100 mM : 85% acetonitrile. Fluorescence detection was performed at an excitation 270 nm and emission 370 nm.

5.2.3.7- Analysis of *C. roseus* NAD(P)H content

NAD(P)H from cells and culture medium was analysed as follows. The method developped by Bernofsky and Swan (*13*) and Gibon and Larher (*14*) has been adapted for plant cells. Aproximately 200 mg of frozen cells in liquid nitrogen were extracted in a chilled Potter-type homogenizer (100 µm of clearance, frosted glass pestle, Bellco glass inc., Cat. # 1983-10019) using 300 µL of NaOH 0.2 N. The extract was placed in a 1.5 mL microcentrifuge tube and homogenizer was rinsed with 300 µL of NaOH. The rinse was combined with the first extraction step and then placed 10 min at 60°C in a water bath (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada, cat # 15-462-2S). The extract was neutralized by adding 600 µL of HCL 0.2 N and then centrifuged for 8 min at 15,000 g, 4°C for cell debris removing. Supernatant was stored at –80°C until analysis. Analysis of the supernatant was performed by the tetrazolium salts reaction. Absorbance of the extract was also read at 340 nm using a UV-Vis spectrophotometer (ThermoOnix, Cambridge, UK). For specific NAD(P)H determination, 100 µL of neutralized extract was mixed with the same volume of reaction solution. The reaction solution consisted in 50 mM phosphate buffer at pH 7.4 containing 0.1 mM of WST-5 (Dojindo, Gaithersburg, MD, USA, cat # PW765) and 5 µM of 1-methoxy-PMS (Dojindo, Gaithersburg, MD, USA cat # PT805) as intermediate electrons acceptor. The mixture was left for 10 min at room temperature then read with a microplate reader (Dynatech, Chantilly, VA, USA) at 530 nm. A calibration curve was realised in phosphate buffer containing 0-200 µM NADH (Sigma, Oakville, Canada, cat # 43420). For analysis of the medium, pH was adjusted to 7.4 with 0.1 N NaOH, and the medium was mixed with an equal part of reaction solution, then analyzed as described above.

5.2.4- Results and Discussion

5.2.4.1- Calibration of the multi-wavelength probe

Excitation and emission spectra (ex/em nm) for tryptophan and NADH were first determined using a spectrophotometer by dilution of standard solutions prepared in both MS and B5 culture media. Fluorescence emission spectra and intensities were similar for both media (data not shown).

E. californica

Fluorescence spectra from *E. californica* cell suspensions were obtained for three secondary metabolites such as sanguinarine, chelerythrine and chelirubine (Figure 5.1) at excitation wavelengths of 270 nm to 550 nm and emission wavelengths of 310 nm to 590 nm. These three compounds showed very similar spectra with maximum fluorescence intensity at an excitation of 450 nm in B5 medium. Sanguinarine and chelirubine have a maximum emission at 570 nm whereas this is slightly decayed at 550 nm for chelerythrine. Since chelerythrine fluoresces also principally at 570 nm, the ex/em wavelengths were fixed at 450/570 nm to perform *in situ* analysis of benzophenathridine alkaloids production. Roos et al. (*15*) and Hoellinger and al. (*16*) used similar ex/em wavelengths to determine the benzophenanthridine content of an ethanolic extract and in chromatographic analysis, respectively. In order to determine if other alkaloids interfere at these ex/em wavelengths, a methanolic extract obtained from *E. californica* elicited cells was analysed by HPLC. Eight unknown fluorescent compounds were then detected in addition to sanguinarine, chelerythrine and chelirubine, and showed similar fluorescence spectra to these three. This result shows that fluorescence could only allow for the measurement of total alkaloids content of *E. californica* cultures. Moreover, the fluorescence signal of the benzophenanthridine alkaloids overlapped with that from riboflavins (riboflavin and derivatives such as FMN, FAD) at 450/530 nm (data not shown) and can not be monitored by the fluorescence probe.

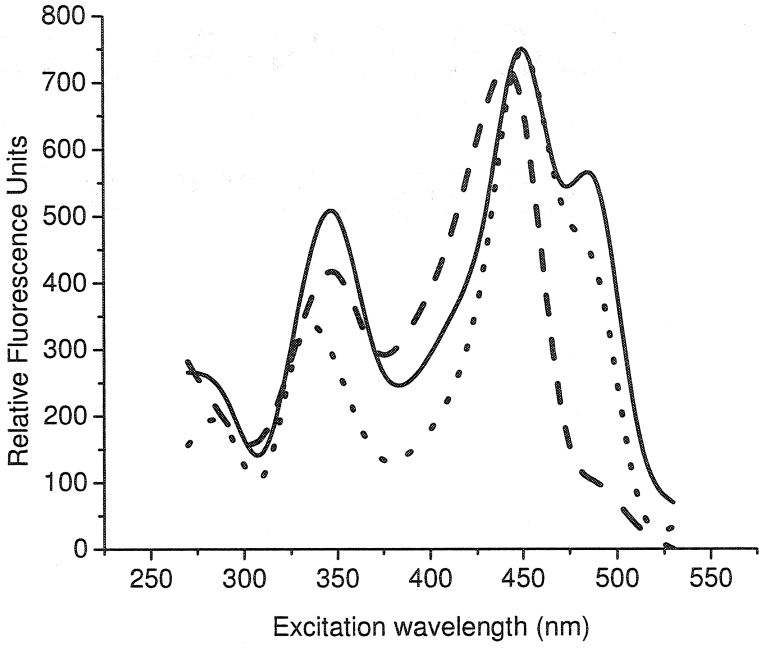


Figure 5.1. Fluorescence spectra of benzophenanthridine alkaloids. Fluorescence spectra of sanguinarine (solid line), chelerythrine (dashed line) and chelirubine (dotted line) collected using a fluorescence probe for various excitation wavelengths at a fixed emission of 570 nm.

C. roseus

Most of the indole alkaloids produced by *C. roseus* are of high pharmaceutical interest and can be synthesized using cell suspension (*17-19*) and hairy roots (*20-22*), except for vincristine and vinblastine (*23*). *C. roseus* has four known secondary metabolites (Terpene Indole Alkaloids or TIAs) and TIAs precursors that are fluorescent. The former are serpentine and ajmalicine, and the latter are tryptophan and tryptamine. Other known alkaloids produced *in vitro* (catharanthine and tabersonine) are usually analyzed by absorbance under UV excitation. In addition to its importance in protein synthesis tryptophane is at the origin of the indole ring of the secondary metabolites of *C.*

roseus. Indeed, it is produced from the chorismate pathway where it is formed from a reaction catalysed by anthranilate synthase. It is subject to a decarboxylation step controlled by tryptophan decarboxylase (TDC) to produce tryptamine. Assembly of tryptamine and of the iridoid secologanine by the strictosidine synthase (STR) then lead to strictosidine, which is the glucoalkaloid at the origin of all the TIAs in *C. roseus*. Unfortunately, secologanine and strictosidine do not fluoresce and can not then, be monitored by a fluorescence probe. Fluorescence spectra of TIAs and precursors in MS medium are presented in Figure 5.2. Tryptophan and tryptamine can not be differentiated because both molecules possess similar spectrum with maximum fluorescence intensity at 270/350 nm. However, tryptamine was about 3 times more fluorescent than tryptophane. The indole alkaloid ajmalicine exhibits almost the same spectrum than that for tryptophane and tryptamine but its fluorescence intensity is maximal at 290 nm (ex) rather than at 270 nm for the TIAs precursors. This difference could be used to specifically determine ajmalicine from a cell extract also containing tryptophan and tryptamine. Serpentine is the known secondary metabolite showing the highest fluorescence intensity for the concentration range assayed in this study. Its spectrum has two excitation peaks (the major one at 270 nm and the minor one at 370 nm) and one emission peak at around 450 nm. Fluorescence intensity measured using the multi-wavelength probe showed linear correlation (R^2=0.99 for every compounds) (Figure 5.2) with a metabolites concentration range of 1.56 to 25 $mg.L^{-1}$. This result suggests that quenching of fluorescence was not significant.

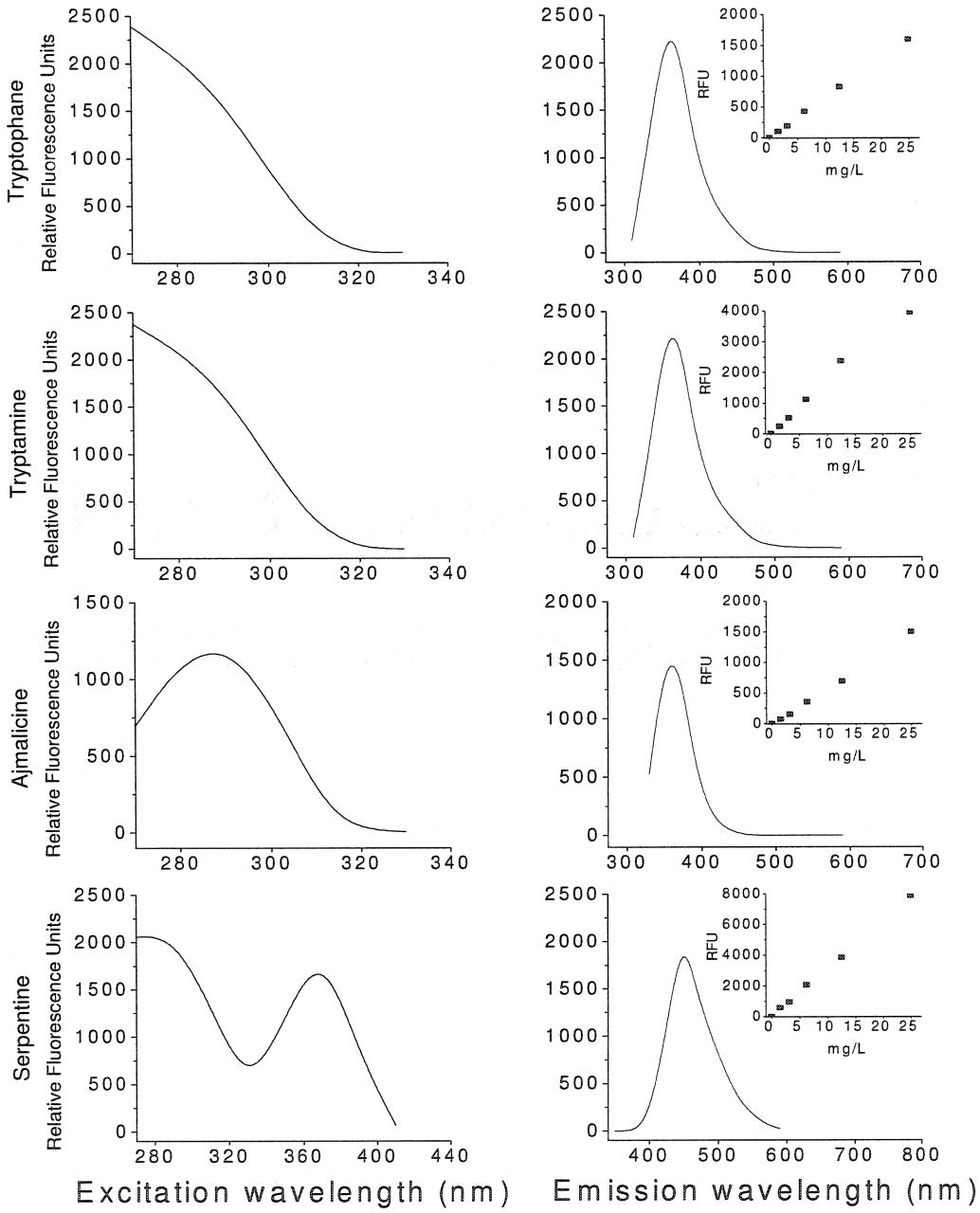


Figure 5.2. : Fluorescence spectra of *C. roseus* metabolites using the multi-wavelength fluorescence probe.

Emission was fixed at 370 nm for tryptophane, tryptamine, ajmalicine and was fixed at 450 nm for serpentine. Excitation was fixed at 270 nm for emission spectrum of the four compounds. Calibration curve for each compound was determined at respective maximum excitation/emission wavelengths.

5.2.4.2- Monitoring of *E. californica* suspension cell culture

Cell growth

The *Eschscholtzia californica* suspension cell culture was performed in shake flasks. Growth (Figure 5.3A) was exponential for the first four days and a maximum biomass of 9.7 g DW^{-1} was measured at day 6. Dry weight then decreased on day 10. Elicited (at day 4) and non-elicited cultures reached a similar biomass 48 h after elicitation. However, biomass in elicited cultures decreased from day 6. Measure of the fluorescence intensity corresponding to NAD(P)H (350/450 nm) is showed in Figure 5.3B. The 350/450 nm signal follows the cells dry weight for both control and elicited cultures, excepted for the second day where the NAD(P)H level was higher than that expected. NAD(P)H level may not be constant with cell metabolic activity. Indeed, fresh medium addition to starved cells at the time of inoculation might cause an increase of the NAD(P)H content as observed by Peck et al. (*24*) and Siano et Muthrasan (*25*) for yeasts. Moreover, the production in secondary metabolites which is amplified by the use of chitin (elicitor) induces an important consumption in NAD(P)H since numerous enzymes implicated in alkaloids synthesis are NAD(P)H dependent (*26*). This may thus explain a more important decrease in NAD(P)H for the elicited culture than for the control culture. NAD(P)H fluorescence at 350/450 nm has often been used to estimate biomass concentration for yeasts and bacteria during exponential phase (*27, 28*). Li et al. (*29*) showed that intracellular NAD(P)H is influenced by the carbon source and by dissolved oxygen, suggesting that NAD(P)H signal reflects more biomass activity rather than biomass concentration. Moreover, NAD(P)H fluorescence signal has been used as a marker to localize tumor cells, because higher metabolic activity of tumor cells induces a higher NADH level (*30-32*). The cell's NAD(P)H content may thus be affected by diverse stresses such as inoculation shock, nutrient depletion and elicitation. Therefore, cell's NAD(P)H content may be more appropriate in following the cell's physiological state than cell concentration in *E. californica* cultures.

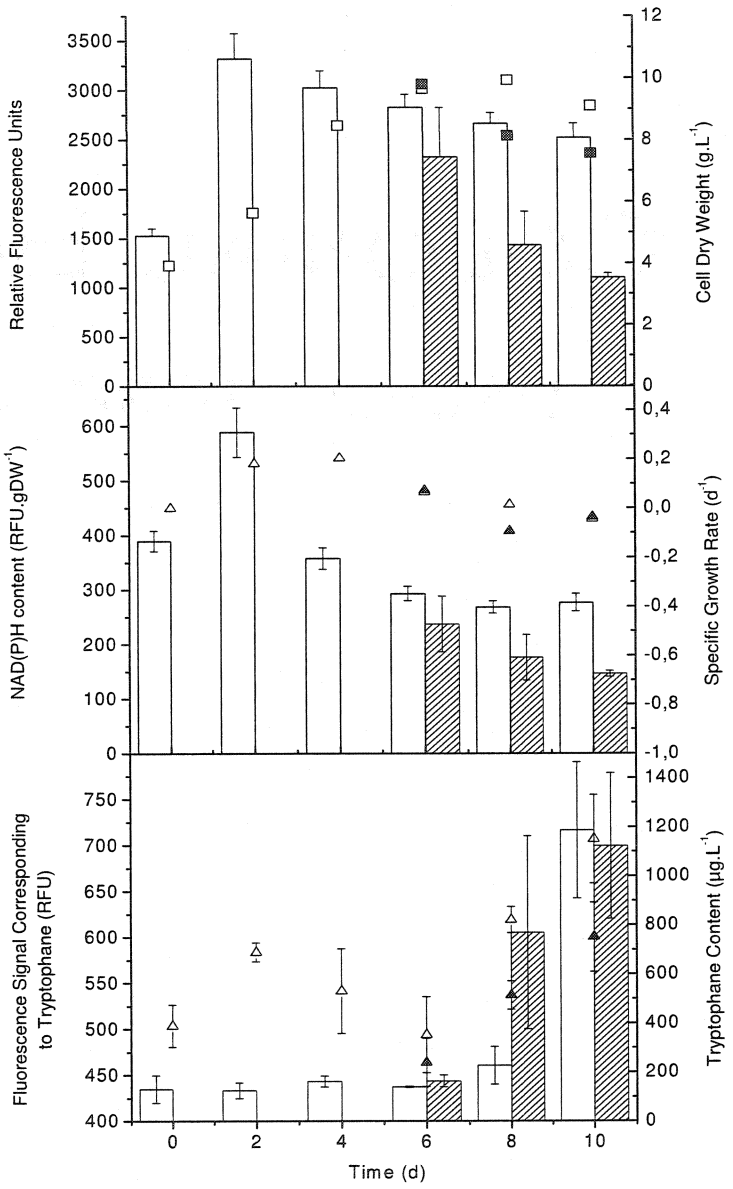


Figure 5.3. Fluorescence signals from *E. californica* culture.

A: Fluorescence signal corresponding to NAD(P)H from control (empty bars) and elicited (hatched bars) *E. californica* culture. Excitation was 350 nm and emission was collected at 450 nm. Elicitation occurred at day 4. Growth from control (□) or elicited (■) culture follows the NAD(P)H signal except for day 2 and 4. **B**: Fluorescence signal corresponding to NAD(P)H.gDW^{-1} (bars) for *E. californica* culture. Specific growth rate is shown for control cells (△) or elicited cells (▲). **C:** Fluorescence signal corresponding to tryptophan from the control (△) or elicited (▲) culture of *Eschscholtzia californica*. Excitation was set at 270 nm and emission was collected at 370 nm. Elicitation occurred at day 4. Off-line HPLC analyses for tryptophan is shown for control (empty bars) and for the elicited (hatched bars) cultures.

Tryptophan

Tryptophan has been used to estimate biomass in microbial cultures (3, *29, 33*). However, tryptophan fluorescence signal did not follow *E. californica* cell growth (Figure 5.3C). Surprisingly, tryptophan concentration determined off-line from HPLC was stable before elicitation and then increased after chitin addition. Differences in fluorescence intensity between the control and the elicited culture may be explained by a decrease in biomass content observed at the end of the elicited culture. Benzophenanthridines derive from L-tyrosine, which comes from the chorismate pathway. This pathway competes with tryptophan synthesis. Thus, it is thought that cells elicitation will increase fluxes of the chorismate pathway as well as that leading to tryptophan. Measurements obtained from the fluorescence probe, compared with off-line analysis, showed higher estimated tryptophan at day 2 and 4 than at day 0 and day 6. As previously proposed for NAD(P)H, establishment of exponential growth which results in an increase of cells metabolic activity may result in an increase of the cellular protein content. The proteins containing tryptophan could then have participated to the global tryptophan fluorescence signal and not to HPLC measurements, which is only accounting for free tryptophan. A different behaviour between the fluorescence probe and HPLC measurements after elicitation could be analyzed similarly. The cellular protein content is thought to be lower in elicited cultures than non-elicited since it is well established that elicited cells focus on secondary metabolites production to the detriment of primary metabolism, and of protein synthesis. However, these results required to be further investigated.

Secondary Metabolites

Since sanguinarine, chelerythrine and chelirubine were the only available standards, results obtained by HPLC are shown as the sum of the peak area for each fluorescent compound detected (identified and unknown). Equivalent mg of alkaloids was based on sanguinarine concentration as suggested by Roos and al. (*15*). Chitin addition at day 4 has clearly elicitated secondary metabolism (Figure 5.4). The probe

fluorescence signal (450/570 nm) used to estimate total benzophenanthridine alkaloids followed off-line HPLC analyses. However, the probe can not distinguish between sanguinarine, chelerythrine, chelirubine and the other unidentified fluorescent secondary metabolites as discussed previously.

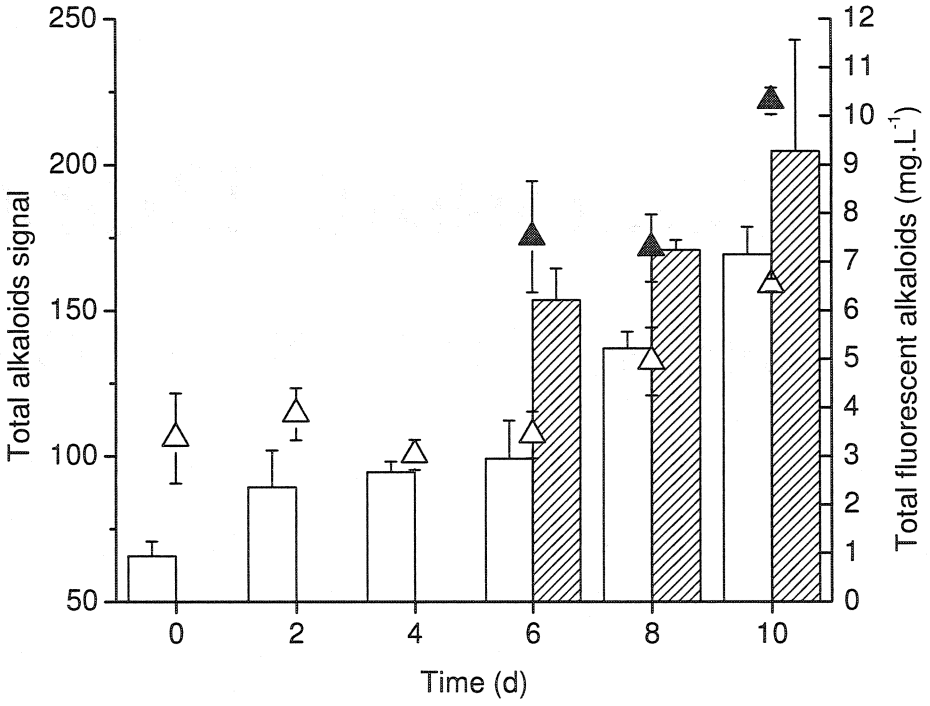


Figure 5.4. Fluorescence signal corresponding to alkaloids from *E. californica* culture.

Fluorescence signal at 450/570 nm corresponding to alkaloids maximum fluorescence from the control (△) or elicited (▲) culture of *Eschscholtzia californica*. Bars represent the sum of the area of every alkaloid's peak detected by HPLC using a fluorescence detector at the same wavelength for off-line analysis of the control (empty bars) and elicited (hatched bars) culture. Alkaloids from samples were quantified as mg/g DW then results was multiplied by biomass to obtain a volumetric concentration. Off-line analysis shows the sum of intra and extracellular production.

5.2.4.3- Monitoring of *C. roseus* suspension cell culture

Cell Growth

Catharanthus roseus cell suspension was cultured at controlled dissolved oxygen level (60 % air saturation) and pH (5.7) in a 3.5-L bioreactor equipped with a double helical ribbon impeller. The multi-wavelength fluorescence probe was inserted into the bioreactor. A fresh weight value of 110 $gWW.L^{-1}$ was reached from 40 $gWW.L^{-1}$ at inoculation (Figure 5.5A). Surprisingly, the wet-to-dry ratio (Figure 5.5C) evolved with cell age. Fluorescence signals from NAD(P)H at 350/450 nm (Figure 5.5B) and from riboflavins at 450/530 nm (Figure 5.A) were compared to cell concentration with time. Fortunately and conversely to the results with California poppy, NAD(P)H signal did not seem to be biased by another fluorescent compound and was correlated with cell dry weight during the pre-elicitation phase (Figure 5.5B). This result suggests that NAD(P)H intracellular concentration remained nearly constant with cell growth. Off-line measurement of the cells NAD(P)H content was performed using two different analytical methods as the absorbance at 340 nm of cellular extract and medium, and a specific NAD(P)H assay using a tetrazolium salts derivative, WST-5. Both off-line methods confirmed the 350/450 nm fluorescence signal recorded by the probe in the pre-elicitation (growth) phase (Figure 5.6). However, the fluorescence signal differed from off-line NAD(P)H concentration 48 h after elicitation (day 9). HPLC analysis revealed that an unknown secondary metabolite (at a retention time of 8.00 min, data not shown) was detected from day 9 (Figure 5.6B). Its fluorescence intensity then increased until day 13 in parallel with the *in situ* fluorescence monitored by the probe. This unidentified molecule represented more than 95% of total peak area during the secondary metabolites production phase. The compound showed a similar UV spectrum to that of serpentine determined using PDA and fluorescence detectors. Marose and al. (*1*) also showed that alkaloids production by the fungus *Claviceps purpurea* interferes with NAD(P)H

fluorescence measurement. However, fluorescence at 450/530 nm corresponding to riboflavins showed to be correlated to the cells dry weight before as well as after elicitation (Figure 5.6A). Similar results were observed for *Candida utilis and S. cervisae* cultures (*29, 34*). As no alkaloids show autofluorescence at 450/530 nm, *in situ* riboflavins measurement using a multi-wavelength fluorescence probe could then be used for *C. roseus*.

Tryptophan and Tryptamine

Fluorescence signal corresponding to tryptophan and tryptamine (270/370 nm) and the concentration values determined by HPLC analysis from samples (sum of intra- and extracellular) are presented in Figure 5.7. Although the two molecules fluoresce at the same wavelengths, the fluorescence intensity was mainly due to tryptamine since it represented more than 90% of the total in all samples, and that it is three times more fluorescent than tryptophane (Figure 5.2). The *in situ* signal at 270/ 370 nm follows data collected from off-line measurement, indicating that this method is appropriate for on-line tryptamine monitoring in *C. roseus* cell suspension. The concentration in tryptamine and tryptophane per cell dry weight showed to be constant during the pre-elicitation phase (Figure 5.7). Results, thus suggest that elicitation resulted in the accumulation of tryptamine when no extractive resins was added to the culture in order to reduce feedback inhibition of secondary metabolites production (*9*). Fluorescence signal intensity decreased at day 7 from dilution after elicitation due to the addition of jasmonic acid and fresh MS medium. Fluorescence signal then followed tryptamine and tryptophane concentration. Geerlings et al. (*35*) and Menke et al. (*36*) showed that elicitation of *C. roseus* cells by jasmonic acid resulted in a increase of *tdc* gene transcription as soon as 6 hours after elicitor addition. Whereas mRNA synthesis increases quickly after elicitation, tryptamine accumulation inside the cells and in medium seemed to occur 24 h after elicitation in this work. Maximum concentration in tryptamine was reached at day 11 (3.3 $mg.g^{-1}$ DW and 0.15 $mg.L^{-1}$ in medium) then decreased slightly. This decrease has been already reported and could be attributed to degradation or recycling (*9*).

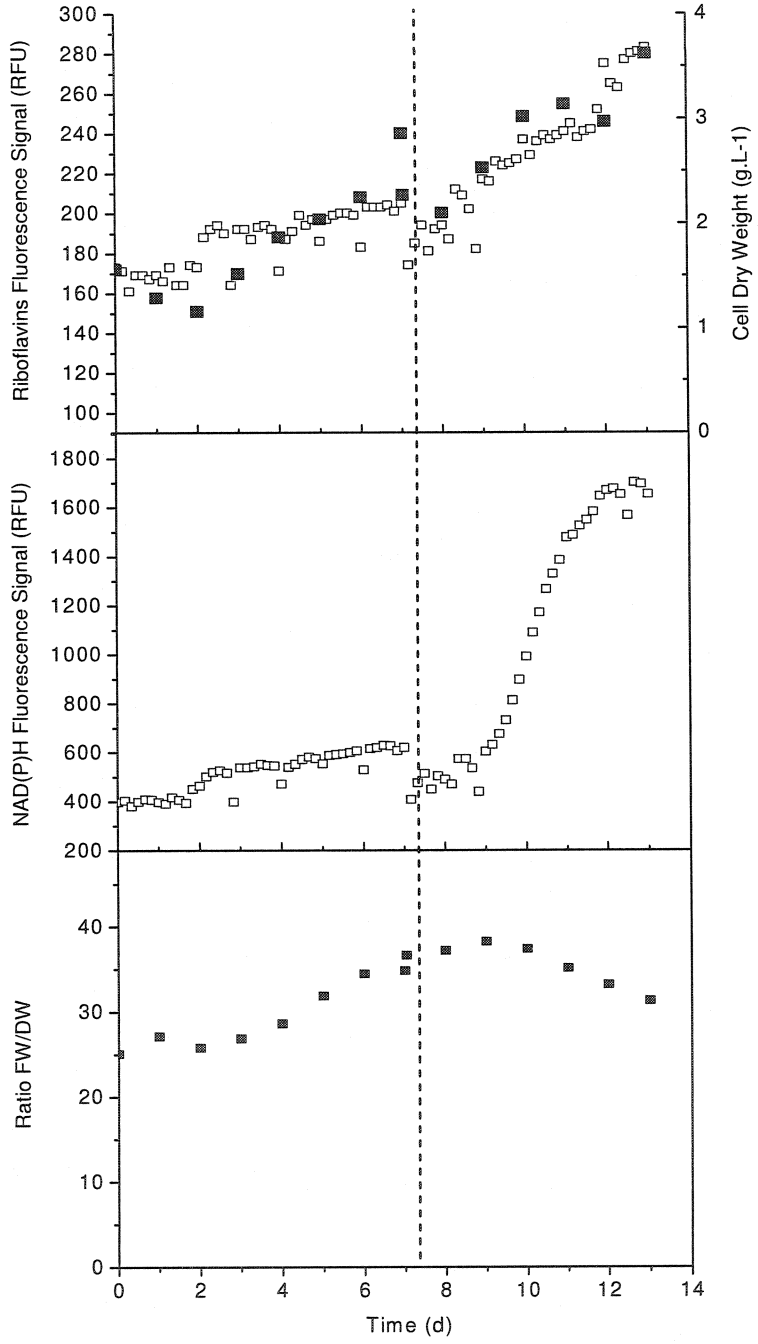


Figure 5.5. Estimation of *C. roseus* biomass by fluorescence signals.
A: Estimation of *C. roseus* dry weight (■) using riboflavins signal (450/530 nm) (□). Addition of fresh medium at the time of elicitation (dashed line) explains the dilution of biomass. **B:** Fluorescence signal corresponding to cofactors NAD(P)H. **C:** FW/DW ratio. Elicitation with jasmonic acid occurred at day 7.

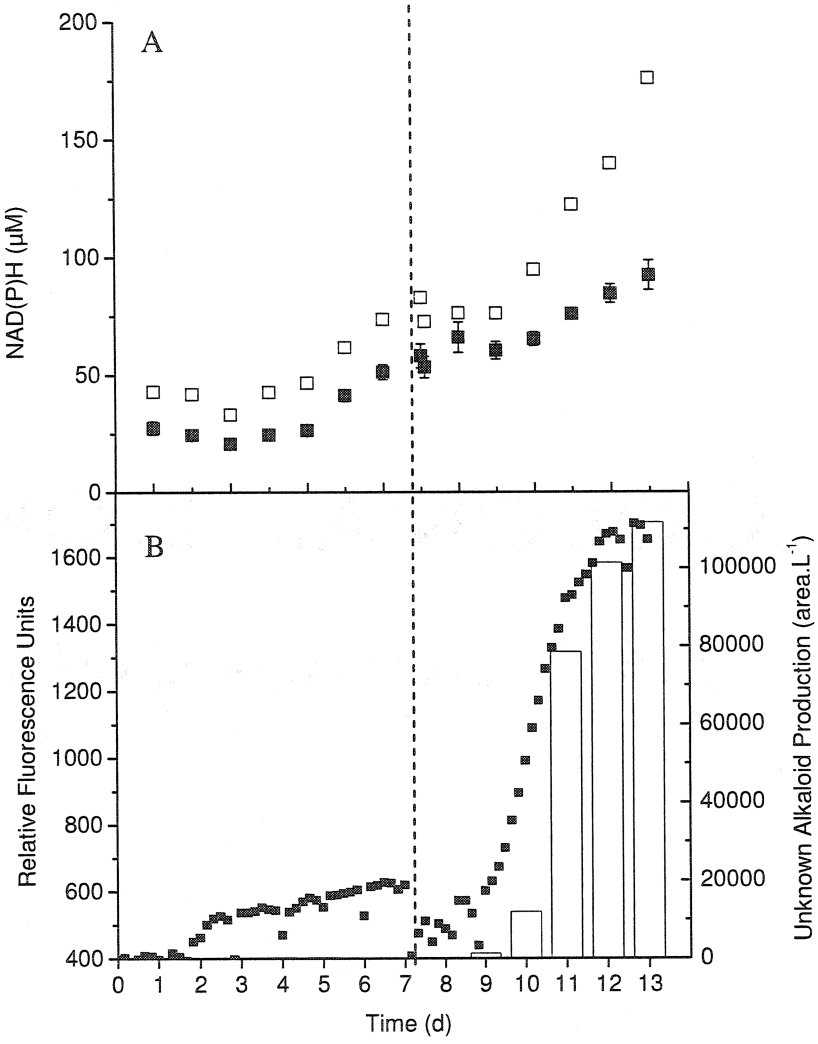


Figure 5.6. A: Total NAD(P)H concentration in the *C. roseus* culture
NAD(P)H was estimated from absorbance at 340 nm (□) or using the modified cycling assay (■). Elicitation occurred at day 7 (dashed line). **B:** Fluorescence signal corresponding to cofactors NAD(P)H (■). An unknown compound (bars) was detected by HPLC at 350/450nm and represented the major peak at these wavelength after elicitation. Its concentration increased with time from day 9 to day 13 and may have biaised the NAD(P)H signal after elicitation.

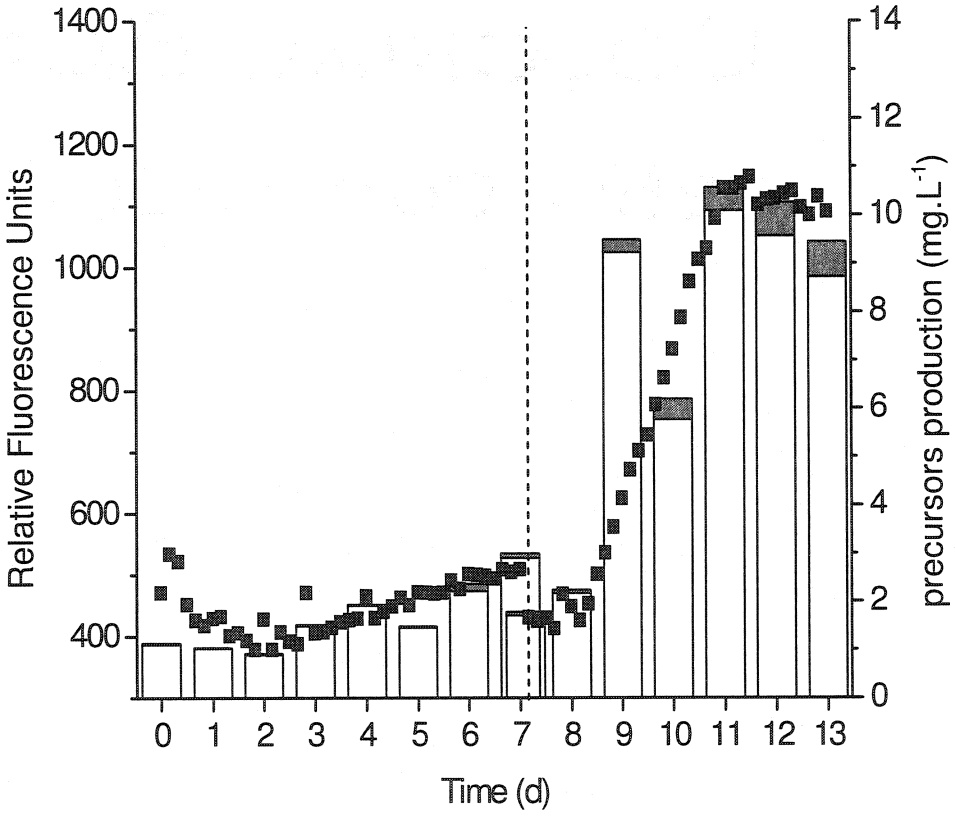


Figure 5.7 Fluorescence signal of TIAs precursors from C. roseus.
Fluorescence signal at 270/ 370 nm (■) and TIAs precursors production from a culture of *C. roseus* cells. Precursors are defined as the sum of intra- and extracellular tryptophan (grey bars) and tryptamine (empty bars) content. Elicitation occurred at day 7 (dashed line).

Secondary Metabolites

TIAs from *C. roseus* were analyzed off-line by HPLC and monitored by *in situ* fluorescence spectroscopy. The CR1 cell line produces a low basal level of secondary metabolites showing only weak peaks on HPLC chromatograms (data not shown). However, secondary metabolism was highly stimulated at day 9. Alkaloids had accumulated 48 h after elicitation (Figure 5.8). Catharanthine was at a low and stable level before elicitation but then increased to reach a maximum of 1.17 mg/L at day 12. Tabersonine and its derivative lochnericine were detected only from day 9. A similar behavior was observed for the unknown compound R1 (molecular weight of 353) that was already detected in parental root line. Furthermore, tabersonine concentration followed tryptamine concentration (figure 5.7) with a maximum at day 10 and then decreased. Tabersonine could have been converted in lochnericine and other derivatives as proposed by previous studies (37, *38*). The CR1 cell line did not produce detectable amounts of serpentine or ajmalicine. CR1 suspension cell line was derived from a fully established hairy root line previously used (*12*). Culture medium was supplemented with hormones (2X) to prevent calli and root tips formation. High auxins level in the medium could be responsible for the low levels of serpentine and ajmalicine as previously suggested (*39, 40*). However, previous results (Figure 2) showed that these compounds could be quantified by the proposed technique using a fluorescence multi-wavelength probe. Measurements on elicited *C. roseus* hairy roots also showed the fluorescence probe to be effective in monitoring ajmalicine and serpentine in addition to tryptamine and tryptophan (unpublished data).

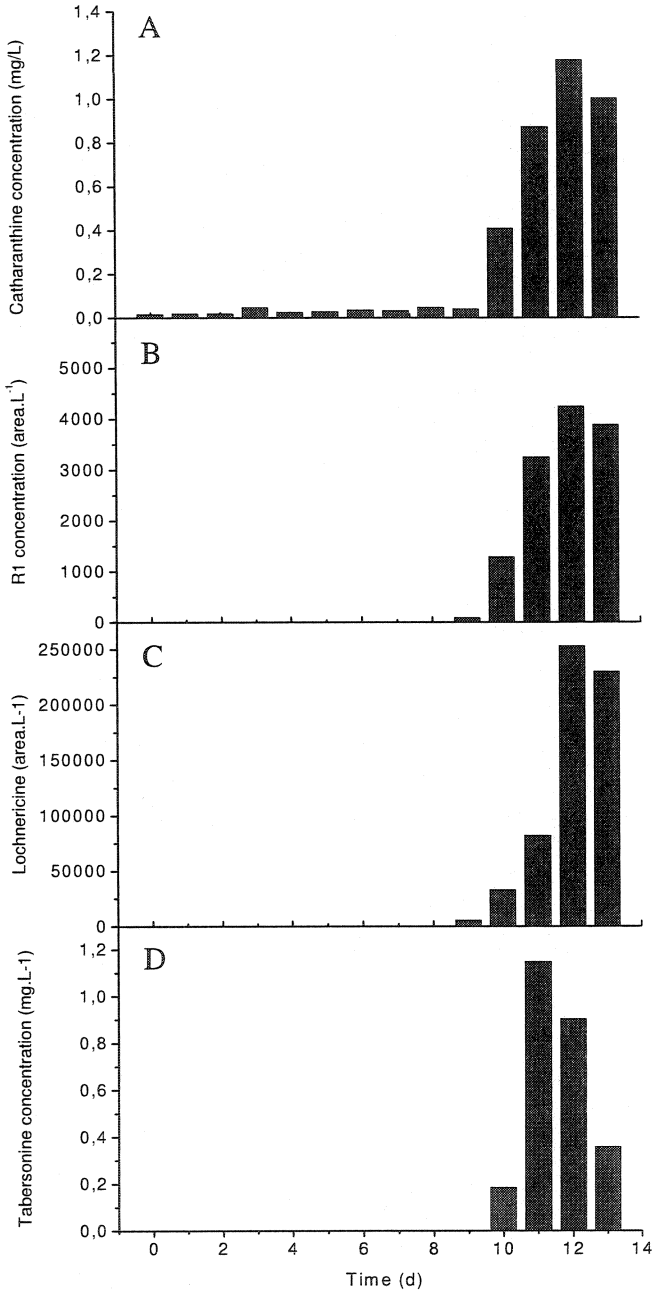


Figure 5.8. Alkaloids from C.roseus culture determined off-line by HPLC analysis
Unknown R1 (B) was revealed in previous studies (unpublished results). Lochnericine (C) was identified by mass spectrometry but the absence of a standard prevented any quantitative estimation. Catharanthine (A) and Tabersonine (D) were identified and quantified according to standard solutions

5.2.5- Conclusion

The use of a multi-wavelength fluorescence probe was shown to be a simple and non-invasive tool capable to monitor plant cell cultures *in situ*. Indeed, cell suspension cultures of *E. californica* and *C. roseus* were performed and *in situ* measurements of endogenous fluorophores allowed for real-time estimation of cell concentration, biomass activity and secondary metabolites production. *In situ* NAD(P)H fluorescence signal seemed to follow cellular metabolic activity for *E. californica* and cell dry weight for *C. roseus* during the pre-elicitation phase. Controlled conditions in the bioreactor culture as compared to those in shake flasks may explain these contradictory results. However, riboflavins fluorescence signal showed to be a reliable measure for on-line biomass estimation, both for the growth and elicited phases of the culture. Because of similar fluorescence spectra, only total alkaloids can be monitored *in situ* for *E. californica* but ajmalicine and serpentine could be monitored explicitly for *C. roseus*. In the case of *C. roseus*, fluorescence from tryptophan and tryptamine showed to be a good indicator of the cellular response to elicitation. The multi-wavelength fluorescence probe studied in this work showed to be an effective tool to follow metabolic and production parameters in well controlled bioreactor cultures.

5.2.6- Acknowledgments

This research project was funded by the Canadian Research Chair Program, the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the "Fonds Québécois pour la Recherche en Nature et Technologies" (FQRNT).

5.2.7- References

(1) Marose, S.; Lindemann, C.; Scheper, T. Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring. *Biotechnol. Prog.* **1998,** *14,*63-74.

(2) Hagedorn, A.; Levadoux, W.; Groleau, D.; Tartakovsky, B. Evaluation of multiwavelength culture fluorescence for monitoring the aroma compound 4-Hydroxy-2(or 5)-Ethyl-5(or 2)-Methyl-3(2H)-Furanone (HEMF) production. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 361-367.

(3) Li, J. K. and Humphrey, A. E. Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 1043-1049.

(4) Tartakovsky, B.; Sheintuch, M.; Hilmer, J. M.; Scheper, T. Application of scanning fluorometry for monitoring of a fermentation process. *Biotechnol Prog.* **1996**, *12*, 126-131.

(5) Skibsted, E.; Lindemann, C.; Roca, C.; Olsson, L. On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence probe using multivariate calibration. *J. Biotechnol.* **2001**, *88*, 47-57.

(6) Jolicoeur, M.; Germette, S.; Gaudette, M.; Perrier, M.; Bécard, G. Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi : a symbiotic physiological marker. *Plant Physiol.* **1998**, *116*,1279-1288.

(7) Jolicoeur, M.; Chavarie, C.; Carreau, P. J.; Archambault, J. Development of a Helical-Ribbon Impeller Bioreactor for High-Density Plant-Cell Suspension-Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **1992,** *39*, 511-521.

(8) Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* **1968,** 50, 151-158.

(9) Tikhomiroff, C.; Allais, S.; Klvana, M.; Hisiger, S.; Jolicoeur, M. Continuous selective extraction of secondary metabolites from *Catharanthus roseus* hairy roots with silicon oil in a two-liquid-phase bioreactor. *Biotechnol Prog.* **2002,** *18,* 1003-1009.

(10) Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with

tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **1962,** *15*, 473-497.

(11) Klvana, M., Legros, R. and Jolicoeur, M. In situ extraction strategy affects benzophenanthridine alkaloid production fluxes in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Biotechnol. Bioeng*. In press.

(12) Tikhomiroff, C. and Jolicoeur, M. Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **2002**, *26*, 87-93.

(13) Bernofsky, C. and Swan, M. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal. Biochem.* **1973,** *53*, 452-8.

(14) Gibon, Y. and Larher, F. Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. *Anal. Biochem.* **1997,** *251*, 153-7.

(15) Roos, W.; Evers, S.; Hieke, M.; Tschope, M.; Schumann, B. Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids - phytoalexin biosynthesis in cultured cells of *Eschscholtzia californica*. *Plant Physiol.* **1998,** *118*, 349-364.

(16) Hoellinger, H.; Re, M.; Deroussent, A.; Singh, R. P.; Cresteil, T. Quantitative liquid chromatographic determination of sanguinarine in cell culture medium and in rat urine and plasma. *J. Chromatogr. B*. **2004**, *799*, 195-200.

(17) Lee, C. W. T. and Shuler, M. L. Different shake flask closures alter gas-phase composition and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell-suspensions. *Biotechnol. Techn.* **1991**, *5*, 173-178.

(18) Merillon, J. M.; Rideau, M.; Chenieux, J. C. Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells *in vitro*. *Planta*

Med. **1984**, *50*, 497-501.

(19) Moreno, P. R. H.; Vanderheijden, R.; Verpoorte, R. Cell and tissue-cultures of *Catharanthus roseus* - A literature survey .2. Updating from 1988 to 1993. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1995,** 42, 1-25.

(20) Bhadra, R.; Vani, S.; Shanks, J. V. Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 41, 581-592.

(21) Toivonen, L.; Balsevich, J.; Kurz, W. G. W. Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1989**, 18, 79-93.

(22) Vazquezflota, F.; Morenovalenzuela, O.; Mirandaham, M. L.; Coellocoello, J.; Loyolavargas, V. M. Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures - Medium optimization and elicitation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1994**, 38, 273-279.

(23) St-Pierre, B.; Vazquez-Flota, F. A.; De Luca, V. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell.* **1999,** 11, 887-900.

(24) Peck, M. W. and Chynoweth, D. P. Online fluorescence-monitoring of the methanogenic fermentation. *Biotechol. Bioeng.* **1992**, *39*, 1151-1160.

(25) Siano, S. A. and Mutharasan, R. NADH and flavin fluorescence responses of starved yeast cultures to substrate additions. *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *34*, 660-670.

(26) Wink, M. Introduction : biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In *Biochemistry of plant secondary metabolism*; Wink, M., Ed.;Sheffield Academic Press: Sheffield, 1999; pp. 1-15.

(27) Harrison, D. E. and Chance, B. Fluorimetric technique for monitoring changes in

the level of reduced nicotinamide nucleotides in continuous cultures of microorganisms. *Appl. Microbiol.* **1970**, *19*, 446-450.

(28) Scheper, T.; Lorenz, T.; Schmidt, W.; Schugerl, K. On-line measurement of culture fluorescence for process monitoring and control of biotechnological processes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1987**, *506*, 431-445.

(29) Li, J. K.; Asali, E. C.; Humphrey, A. E. Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry. *Biotechnol. Prog.* **1991,** *7*, 21-27.

(30) Uppal, A. and Gupta, P. K. Measurement of NADH concentration in normal and malignant human tissues from breast and oral cavity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2003**, *37*, 45-50.

(31) Papadopoulos, A. J.; Zhadin, N. N.; Steinberg, M. L.; Alfano, R. R. Fluorescence spectroscopy of normal, SV40-transformed human keratinocytes, and carcinoma cells. *Cancer Biochem. Biophys.* **1999,** *17*, 13-23.

(32) Pradhan, A.; Pal, P.; Durocher, G.; Villeneuve, L.; Balassy, A.; Babai, F.; Gaboury, L.; Blanchard, L. Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species. *J.Photoch.Photobio. B.* **1995,** *31*, 101-112.

(33) Horvath, J. J.; Glazier, S. A.; Spangler, C. J. *In-situ* fluorescence cell mass measurements of *Saccharomyces cerevisiae* using cellular tryptophan. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9*, 666-670.

(34) Lindemann, C.; Marose, S.; Nielsen, H. O.; Scheper, T. 2-Dimensional fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring. *Probe Actuat. B-Chem.* **1998**, *51*, 273-277.

(35) Geerlings, A.; Hallard, D.; Caballero, A. M.; Cardoso, I. L.; Van Der Heijden, R.; Verpoorte, R. Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'ledgeriana' hairy root

culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **1999**, *19*, 191-196.

(36) Menke, F. L. H.; Parchmann, S.; Mueller, M. J.; Kijne, J. W.; Memelink, J. Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **1999,** 119, 1289-1296.

(37) Shanks, J. V.; Bhadra, R.; Morgan, J.; Rijhwani, S.; Vani, S. Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: Implications for metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **1998,** *58*, 333-338.

(38) Rodriguez, S.; Compagnon, V.; Crouch, N. P.; St-Pierre, B.; De Luca, V. Jasmonate-induced epoxidation of tabersonine by a cytochrome P-450 in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry.* **2003**, *64*, 401-409.

(39) Whitmer, S.; Verpoorte, R.; Canel, C. Influence of auxins on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1998**, *53*, 135-141.

(40) El-Sayed, M. and Verpoorte, R. Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **2002,** *68*, 265-270.

Chapitre 6 – Suivi de la l'activité métabolique et de la production d'une protéine recombinante par une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde

6.1- Présentation de l'article

Au cours du chapitre précédemment, une sonde à fluorescence a été utilisée pour suivre deux cultures végétales. Nous avons voulu adapter l'utilisation de ce système à d'autres types cellulaires. L'objectif ce travail est donc de vérifier si une seule sonde peut-être suffisante pour suivre à la fois la biomasse et la production de protéines recombinantes. La synthèse de protéines recombinantes est de plus en plus courante car elle permet d'obtenir de grandes quantités de produits, afin de faire face à une demande en pleine croissance de l'industrie pharmaceutique essentiellement. Cependant, il est difficile d'évaluer le niveau de production avant la récolte. Le cas échéant, l'échantillonnage de la culture est indispensable et peut être source de contamination, ce qui provoquerait la perte de toute la culture. La quantité de protéines produites dépend à la fois du système d'expression et de la souche utilisée, mais aussi de l'état de la biomasse.

Au cours de ce travail, deux cultures ont été réalisées en bioréacteur avec une souche de la levure *Pichia patoris* et une lignée de cellules de mammifères, NSO. Ces deux lignées expriment une protéine recombinante, la GFP (*Green Fluorescent Protein*) de manière inductible. Les cultures ont été suivies en insérant une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde dans le bioréacteur. Les signaux de fluorescence du NAD(P)H, du tryptophane et des riboflavines enregistrés *in situ* ont montré une importante corrélation avec la concentration des cellules de levures pendant la phase de croissance. La présence de plusieurs composés autofluorescents dans le milieu pour les cellules animales a empêché de suivre efficacement les composés endogènes et l'incorporation du

tryptophane et des riboflavines dans les cellules. Le suivi de la production de GFP a été réalisée au cours des deux cultures et les résultats ont été confrontés avec succès à des analyses protéiques réalisées après extraction par d'autres méthodes de mesure.

La sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde se révèle donc comme un outil d'évaluation *in situ* de la biomasse et du niveau de production de protéines recombinantes. Toutefois, il est nécessaire d'optimiser le milieu de culture afin de diminuer le bruit de fond et d'améliorer la qualité des données.

Ce travail a été soumis pour publication dans la revue scientifique *Journal of Biotechnology*.

6.2- Manuscrit # 2

A Multi-wavelength Fluorescence Probe: Is One Probe Capable for On-Line Monitoring of Recombinant Protein Production and Biomass Activity?

Steve Hisiger and Mario Jolicoeur*

Canada Research Chair on the Development of Metabolic Engineering Tools

Bio-P^2, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal,

P.O. Box 6079 Centre-ville Station, Montréal, Québec

*Corresponding authors

6.2.1- Abstract

Monitoring cell culture performance requires maximizing the number and the quality of measured parameters. *In situ* 2D fluorescence spectroscopy could permit intensification of simultaneous data acquisition. The use of a multi-wavelength fluorescence probe is proposed for monitoring GFP producing cultures in bioreactor. The yeast *Pichia pastoris* and NSO mammalian cell cultures were studied as model systems. Tryptophane, NAD(P)H and riboflavins (riboflavin, FMN, FAD) signals were effective for on-line yeast biomass estimation during the growth phase. During the GFP production phase, *in situ* measurements of the GFP concentration from the fluorescence probe were well correlated with off-line analyses. Tryptophan and NAD(P)H signals diverged from

biomass while GFP production phase. With NS0 cells, results showed that the culture parameters have to be optimized for the use of a fluorescence probe. The use of serum and phenol-red interfered with NAD(P)H and riboflavins fluorescence signals. Nevertheless, it appears that a multi-wavelength probe could be useful for culture monitoring biomass, cell activity and recombinant protein expression in an improved medium

6.2.2- Keywords

in situ fluorescence spectroscopy, GFP, NAD(P)H, Tryptophane, *Pichia pastoris*, NS0

6.2.3- Introduction

Bioprocess development and industrial biotechnology require adequate monitoring of cell culture state parameters. In addition to commonly used O_2, CO_2, pH, redox potential and conductivity probes, attention is now being placed on developing probes capable to follow on-line and non-invasively cellular physiologic state, cell mass and production level. Many metabolites such as pyridine nucleotides (NADH and NADPH as NAD(P)H), tryptophan, riboflavins (riboflavin, FMN, FAD) and pyridoxine are autofluorescent and can thus be potentially monitored *in situ* using a fluorescence probe with a high sensitivity (µM). In addition, the use of fluorescent proteins is now common in studies on protein synthesis and production. The fluorescence signal from NAD(P)H has been used as reporter for biomass. Harrison and Chance (1970) were the first, to our knowledge, to report on the use of fluorometry to monitor intracellular NAD(P)H level. *C. botanica* cultures were excited in the 330-370 nm range and the emission fluorescence was measured in the 440-480 nm range. A good correlation was found between cell concentration and NADH fluorescence signal. NAD(P)H has been shown to follow fairly well growth (Harrison and Chance, 1970, Asali et al., 1992, Farabegoli et al., 2003), but in general NAD(P)H has rather been suggested as a marker of cellular activity (Scheper et al., 1987; Li et al., 1991; Siano and Mutharasan, 1989, 1991). Thus, interpretation of NAD(P)H fluorescence may not be straightforward and it is

thus highly recommended to monitor multiple metabolites simultaneously (Li and Humphrey 1991, Li et al., 1991), data redundancy being so useful. Other endogenous fluorophores such as tryptophan, riboflavins and pyridoxine were observed to be even better than NAD(P)H for biomass estimation in several cases. A major reason for this is that these metabolites are less sensitive to diverse stresses such as oxygen limitation. Tryprophan fluorescence signal showed to be reliable for monitoring cell concentration in baker's yeast and in *C. utilis* fermentation, while pyridoxine fluorescence signal was highly correlated with *S. cerevisae* biomass (Li et al., 1991). Other authors found that tryptophan correlated well with *S. cerevisae* cell concentration (Horvath et al., 1993).

The Green Fluorescent Protein (GFP) can be expressed in prokaryotic or eucaryotic cells as a "reporter gene" and does not usually interfere with cell growth (Chalfie et al., 1994). As a fusion protein or under control of a specific promoter, GFP can be easily quantified. Indeed, GFP has been extensively used in bacteria (Albano et al., 1998, DeLisa et al., 1999, Cha et al., 2000), mammalian cells (Bi et al., 2002), plant cells (Liu et al., 2001, Su et al., 2004) and yeasts (Lu et al., 2002, Li et al., 2000) to study promoter activity or to assess cell transfection or recombinant protein production. Randers-Eichhorn et al. (1997) were the first, to our knowledge, to follow GFP fluorescence on-line using a probe equipped with a LED excitation. This probe was tested with *E. coli* to monitor a pBAD-GFP fusion protein. They showed that the probe was able to quantitatively monitor GFP expression on-line. Fluorescence probes have then been used in bioreactors to study protein synthesis and production (Lu et al., 2001, Liu et al., 2001, DeLisa et al., 1999, Reischer et al., 2004, Su et al., 2004) as well as adenovirus particles production (Gilbert et al., 2000).

NAD(P)H, tryptophan, riboflavins and GFP have a different fluorescence spectrum and can then be potentially monitored simultaneously giving on-line data on cellular physiological state and production level. A multi-wavelength fluorescence probe (Lindemann et al., 1998) was studied in this work to follow simultaneously protein production (via GFP fluorescence), the energetic state of the cells (via NAD(P)H fluorescence), and biomass growth (via NADH, tryptophan, and riboflavins

fluorescence). Recombinant *Pichia pastoris* and NS0 cells expressing GFP were cultured in bioreactor in batch mode and use as model system to test the use of the multi-wavelength fluorescence probe.

6.2.4- Material and methods

6.2.4.1- *Pichia pastoris*

Strain and plasmid

Pichia pastoris strain Mut^{s} harboring a GFP expression vector was obtained from Dr. Groleau (Biotechnology Research Institute (BRI, Montréal, Québec, Canada). Briefly, rsGFP gene from pQBI63 plasmid (Quantum Biogene Inc., Montréal, Canada) was amplified by PCR and then inserted into EcoR I-Xba I sites of the shuttle vector pPICZ B (Invitrogen, Carlsabad, USA). The plasmid was then inserted into KM71H strain of *P. pastoris* as suggested (Invitrogen). GFP expression is driven by the AOX1 promoter.

Culture

One colony was selected from a Petri dish to inoculate a culture tube containing 2 mL of buffered minimal glycerol-complex medium (BMGY). BMGY consist in: yeast extract 10 $g.L^{-1}$, peptone 20 $g.L^{-1}$, yeast nitrogen base (without amino acids) 13.4 $g.L^{-1}$, biotin 0.2 $g.L^{-1}$, glycerol 10 $g.L^{-1}$, potassium phosphate 100 mM, pH 6.0. The culture tube was incubated at 250 rpm for 24 h at 30°C. Then, 1 mL of liquid culture was transferred into a 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of BMGY medium for 30 h at 30°C and 250 rpm. This culture was used to seed the bioreactor. A 3.5-L bioreactor equipped with two Rushton impellers (Chemap, Alfa-Laval, Switzerland) containing 2.5 L of Basal Salt Medium (BSM) was sterilized *in situ* for 45 min at 121°C and 1 atm. BSM consist in: $CaSO_4$ 0.23 $g.L^{-1}$, K_2SO_4 4.55 $g.L^{-1}$, $MgSO_4.7H_2O$ 3.72 $g.L^{-1}$, KOH 4.13 $g.L^{-1}$, Glycerol 20 $g.L^{-1}$, H_3PO_4 (85%) 6.7 mL. Culture medium pH was adjusted to 5.5 using NH_4OH 28%. 10 mL of filter-sterilized *Pichia* trace metals solution (PTM1: $CuSO_4.5H_2O$ 6 $g.L^{-1}$,

NaI 0.08 $g.L^{-1}$, $MnSO_4.H_2O$ 3 $g.L^{-1}$, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.2 $g.L^{-1}$, H_3BO_4 0.02 $g.L^{-1}$, $CoCl_2$ 0.5 $g.L^{-1}$, $ZnCl_2$ 20 $g.L^{-1}$, $FeSO_4.7H_20$ 65 $g.L^{-1}$, Biotin 0.04 $g.L^{-1}$, H_2SO_4 5 mL) was added to the culture medium. Culture was performed at 30°C. Agitation was initially at 200 rpm and increased during the cultivation to control dissolved oxygen above 30% air saturation. Growth was performed in a batch mode using 20 $g.L^{-1}$ glycerol as carbon source (Sigma, cat # G2025). At glycerol depletion, which can be detected from a sudden dissolved oxygen (D.O.) increase, the culture was kept under carbon limiting conditions for 2 hours to allow for complete glycerol consumption and for removal of AOX1 promoter inhibition. Then 1% final (v/v) methanol was added to induce the AOX1 promoter and GFP production.

Biomass from yeast culture was estimated off-line by reading optical dentsity (O.D.) at 600 nm with a Unicam UV-Vis spectrophotometer (ThermoOnix, Cambridge, UK). After sampling, cells were centrifuged for 5 min at 5000 g then resuspended in PBS (Phosphate Buffer Saline) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada, cat # 21013 CV). 1 mL was used for O.D. measurement. Culture samples were kept at –20°C for subsequent analysis.

6.2.4.2- NSO

Cell line and culture

The GFP expressing NSO cell line was obtained form Dr B. Massie (BRI, Montréal, Canada). The NSO cell line contains two integrated plasmid. pUHD172-rtTA-Neo coding reverse tetracycline transactivator was inserted by electroporation. Then, integration of the pAdTR5-K7-GFP vector (Massie et al, 1998) allowing for tetracycline induced GFP expression was performed. Frozen NSO cells in Dubelcco's modified Eagle medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada, cat # 10013 CV) containing 10% (v/v) Foetal Bovine Serum (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada, cat # 080-150), 10 % (v/v) Dimethyl Sulfoxyde (DMSO) (Sigma, cat # 2438), were thawed quickly at 37°C and were immediately added to 10 mL of fresh DMEM +10 % FBS then centrifuged for

10 min at 150 g. Supernatant was removed and cells were resuspended into DMEM with 10% FBS at 37°C at a final concentration of $0.4x10^6$ cells. mL^{-1}. Cells were grown in DMEM 10% FBS in T-flask (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada) under 5% CO_2 at 37°C and subcultured every two days. Bioreactor culture was inoculated at $0.4x10^6$ cells.mL^{-1} using DMEM with 10% FBS for a final volume of 2.4 L. The bioreactor consisted in a modified 3.5-L bioreactor wich had been used for *P. pastoris*. A double helical ribbon impeller was designed as described by Jolicoeur et al. (1992) to replace the high shear Rushton impellers. A set of 4 surface baffles were installed instead of 3 because of the available space. Agitation was kept constant at 45 rpm and temperature was set at 37°C. Oxygen transfer was performed through surface aeration at a constant flow of 200 mL.min^{-1} of air enriched in oxygen and CO_2. O_2 enrichment was controlled to keep the D.O. above 50 % of air saturation and CO_2 fraction was changed to keep pH constant at 7.2. After 24 h of culture, induction of the rtTA system was performed by adding doxycycline-HCl (Sigma, cat # 44577), a tetracycline analog, at a final concentration of 1 mg/L. Cells were counted using Trypan blue exclusion on a hemacytometer. Viability was estimated as percentage of non-blue cells to total cell number. Culture samples were kept at –20°C for subsequent analyses.

6.2.4.3- Glycerol analysis.

Glycerol was analyzed by HPLC (Beckmann, Mississauga, Ontario, Canada) using an ERC 7515A refractive index detector. 100 µL of 0.45 µm filtered culture broth was injected. Isocratic elution was performed using a ACN:H_2O (75:25) mixture at 0.5 mL.min^{-1} through a Alltech 700CH Carbohydrate column (Alltech, Guelph, Ontario, Canada). A calibration curve was obtained using glycerol standard solutions (Sigma, cat # G2025).

6.2.4.4- Off-line NAD(P)H measurement

Analysis of NAD(P)H cellular content for both *P. pastoris* and NSO was performed using a cycling assay modified from Bernofsky and Swan (1973) and Gibon and Larher (1997). In the presence of an intermediate electron acceptor like 1-methoxy PMS, NADH and to a lower level NADPH reduce tetrazolium salts and provoke a shift in dye absorbance. 1 mL of bioreactor culture sample was centrifuged (5 min at 5000 g for *P. pastoris* and 10 min at 150 g for NSO). The pellet was rinsed with 1 mL of PBS (Wisent, cat # 21013 CV) then centrifuged as previously described. The pellet was resuspended in 300 µL of NaOH 0.2N, vigorously vortexed and placed for 10 min in a 70°C water bath for extraction and protein denaturation. Samples were cooled on ice and neutralized by slowly adding 300 µL HCl 0.2 N while mixing. 100 µl of each sample were mixed with 100 µL of the reaction mixture. The reaction solution consists in phosphate buffer 50 mM pH 7.4 containing 0.1 mM of WST-5 (Dojindo, Gaithersburg, MD, USA, cat # PW765) and 5 µM 1-methoxy PMS (Dojindo, Gaithersburg, MD, USA, cat # PT805) as an intermediate electron acceptor. Reaction occurred at room temperature for 10 min and samples were read for absorbance at 530 nm using a microplate reader (Dynatech, Chantilly, VA, USA). NAD(P)H content of *P. pastoris* and of NSO cells was quantified using a calibration curve performed with 50 mM phosphate buffer in the range 0- 200 µM NADH (Sigma, cat # 43420).

6.2.4.5- *In situ* Fluorescence Measurement

In situ fluorescence measurements were performed using a multi-wavelength fluorescence probe (Delta Light and Optics, Lyngby, Denmark). The probe consists in a central unit which contain a Xe lamp and a probe which can be inserted into a standard 25 mm port bioreactor side port. The probe is linked to the central unit by two optical channels, one to guide the excitation light and the other to return the emission signal. Two independent filterwheel carrousels are mounted allowing for selection of the

respective excitation and emission wavelengths (bandwith of 20 nm). The emission signal is collected and amplified by a photomultiplicator. The photomultiplicator gain was software adjustable to prevent signal saturation. A 2-Dimensional spectrum could be collected from 270 nm to 550 nm for emission and from 310 nm to 590 nm for excitation at each reading. A complete scan could be performed within a minute.

6.2.4.6- Protein extraction and Western Blot

Protein extraction from *P. pastoris* was performed as described in Ausubel et al. (1987) and Choi and Jiménez-Flores (2001). A glass beads method was used. Yeast cells were collected from the bioreactor then centrifuged for 5 min at 5000 g. Next steps were performed at 4°C. Pellet was rinsed in PBS then resuspended in 3 volumes of disruption buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.9, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM, glycerol 5%, DTT 1 mM, NH_4SO_4, PMSF 1 mM) added to 1X Protease cocktail inhibitor (Sigma, cat # P8215). The suspension was transferred into a 2 mL screw cap tube and 4 volumes of acid-washed glass beads (400-650 µm; Sigma, cat # G-9268) were added. The suspension was disrupted by vortexing vigorously 3 times for 60 s and cooling the tube on ice between each vortexing. The resulting extract was transferred to a clean tube and the beads were rinsed with 1 volume of disruption buffer. Samples were kept at –80°C until GFP analysis.

Proteins from NSO were extracted as follows. Cells were rinced in PBS then centrifuged at 150 g for 10 min at 4°C. The pellet was quickly frozen by submerging the tube in liquid nitrogen. All subsequent steps occurred on ice. The pellet was resuspended in 100 µL of extraction buffer (Tris-HCl 80 mM pH 6.8, SDS 2 % (w/v), glycerol 10%, PMSF 1mM), the tube was vortexed vigorously and placed for 10 minutes on ice. The lysate was centrifuged for 10 min at 21000 g for clarification. The supernatant fluid was kept at –80°C until Western blot analysis.

Proteins extracted from both *Pichia pastoris* and NSO cells were analyzed using the same procedure. 4X sample buffer (Tris-base 250mM pH6.8, SDS 8% (w/v), bromophenol blue 0.01 % (w/v) and glycerol 40 % (v/v)) was added to each sample which was boiled for 5 min. 0.1 µg of purified GFP (Qbiogene, Rutherford, CA, USA, cat # AFP 5201) was used as standard control. Protein extracts were separated on a 15 % SDS-Polyacrylamide gel as described by Laemmli (1970) on a Mini-Protean II electrophoresis cell (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada, cat # 165-2940). Proteins were transferred onto a 0.45 µm Immobilon™ PVDF membrane (Millipore, Nepean, Ontario, Canada, cat # IPVH00100) applying a current of 100 mA at 30V for 45 minutes. Western blot detection was performed using a 1:2000 dilution of a mouse polyclonal anti-GFP (Qbiogene, cat # AFP5001). Secondary immuno-detection used a 1:10000 dilution of an anti-mouse IgG coupled to horse raddish peroxidase (Vector, Burlingame, CA, USA, cat # PI-200). Chemiluminescence was generated using an ECL plus kit (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada, cat # RDN2132) as substrate for HRP. The membrane was then scanned by a ChemiImager 5500 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) for luminescent band detection.

6.2.4.7- Off-line fluorescence GFP analysis

Protein extracts obtained as described above were assayed for fluorescence using a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Scanning parameters were: excitation 477 nm, emission 511 nm, cut-off 495 nm. Calibration curves generated in extraction buffer with a recombinant purified GFP (Qbiogene, cat # AFP 5201) were used for GFP quantification.

6.2.5- Results and discussion

6.2.5.1- Monitoring of *Pichia pastoris* bioreactor culture

Pichia pastoris is a methylotrophic yeast able to grow on different carbon sources such as glycerol and methanol. The use of methanol as substrate is enabled by a characteristic pathway switch (Cereghino and Cregg, 2000; Ren et al., 2003). In the presence of methanol as unique carbon source, specific enzymes are expressed. Generally these enzymes are under the control of strong promoters like the Alcohol Oxygenase 1 promoter (AOX1). The use of this AOX1 promoter such as in this work is very useful for recombinant protein expression (Gelissen, 2000) because it is highly active in presence of methanol (Cregg and Higgins, 1995). Moreover, inducibility of AOX1 allows for a two phase bioreactor culture with a growth phase using glycerol as carbon source followed by a recombinant protein production phase induced using methanol at glycerol depletion. As shown in 6.1, an exponential growth was observed until glycerol depletion at 17.5 h, which was revealed by a sudden increase in dissolved oxygen. The culture was then maintained under carbon limiting state for 2 hours as suggested by Gellissen et al. (1995) and Raschke et al. (1996) since residual glycerol could reduce AOX1 promoter activity (Hollenberg and Gellissen, 1997; Lal et al., 1997). Then, methanol was introduced to initiate GFP production.

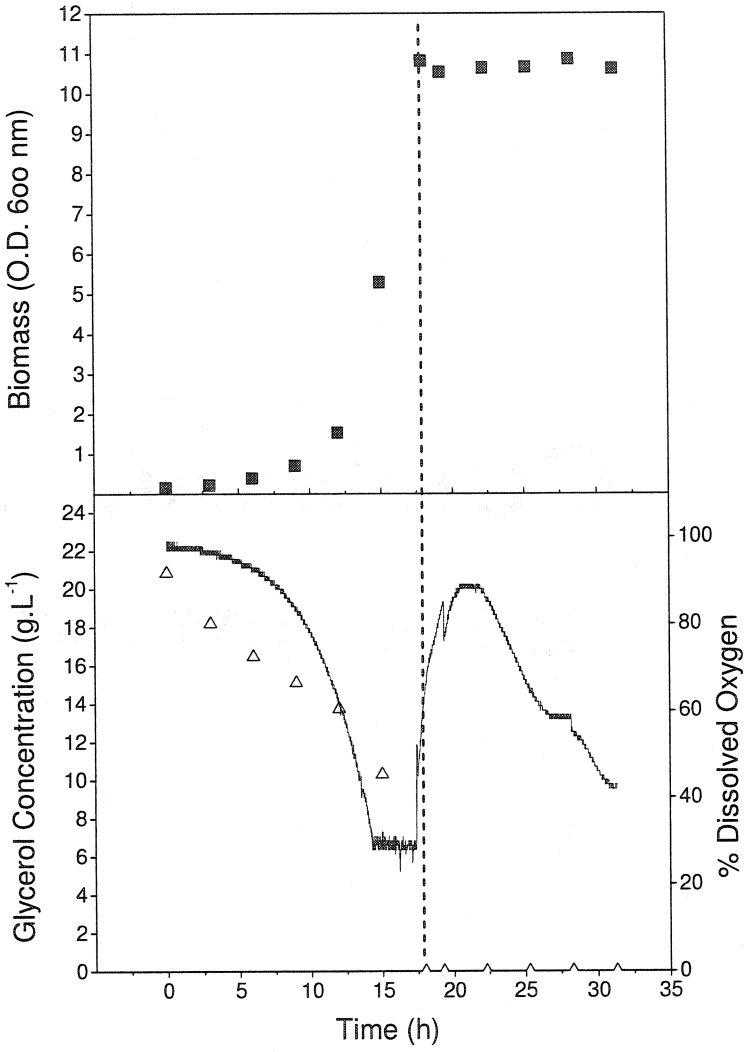


Figure 6.1. *Pichia pastoris* two-phase culture.
A. Biomass estimation (■), B. glycerol concentration in medium (△), and percentage of dissolved oxygen (solid line). Methanol was injected at 19.3 h (dashed line).

NAD(P)H, tryptophane and riboflavins fluorescence signals followed cell concentration

Previous studies performed with *E. coli* and *S. cerevisae* showed that NAD(P)H can be used for biomass estimation (Scheper at al., 1987; Li et al., 1991). In this study, on-line NAD(P)H, *tryptophan and riboflavins* fluorescence signals (330/450nm, 270/370 nm and 450/530nm, respectively) read by the fluorescence probe were correlated (R^2=0.99, 0.99 and 0.96 respectively) with *P. pastoris* cell concentration during exponential growth (Figure 6.2). This result suggests that cellular concentration of these metabolites remained constant during growth of *P. pastoris*. However, off-line NAD(P)H measurments and those determined by the fluorescence probe were similar suggesting that there was no other metabolite or medium constituent interfering with the NAD(P)H fluorescence signal (Figure 6.3).

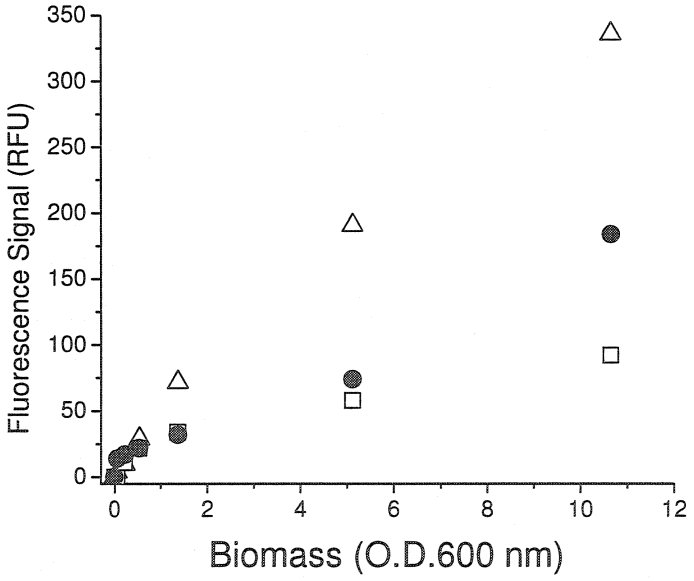


Figure 6.2. On-line fluorescence measurement for three *Pichia pastoris* fluorophores used for biomass estimation during exponential growth phase.
NAD(P)H read at 330/450 nm (△), tryptophan read at 270/370 nm (□) and riboflavins read at 470/530 nm (●) for various biomass concentrations. Correlation coefficient was greater than 0.99 for NAD(P)H and riboflavins estimation and 0.96 for tryptophan.

Although it was not the case in this study, oxygen limitations can cause fluctuations in the NAD(P)H cell content (Siano et Mutharasan, 1989). NADH produced during glycolysis and by the TCA cycle is re-oxydized to NAD^+ by oxydative phosphorylation along the respiration chain. NADH turnover rate may differ between aerobic and anaerobic conditions resulting in NADH variations inside the cells. To prevent from estimating biomass from a variable signal, other autofluorescent metabolites have been studied. Horvath et al. (1993) found that in *S. cerevisae*, the tryptophan signal was more reliable than using NAD(P)H for biomass estimation because it is less sensitive to oxygen fluctuations. In this study, the tryptophan signal showed to be less sensitive than NAD(P)H showing a lower slope (Figure 6.2). The fluorescence signal from riboflavins was also used as a biomass marker by Lindemann et al. (1998) for *S. cerevisae*. These authors showed that this signal was well correlated with biomass, at least until 35 absorbance units at 590 nm. A similar linear correlation was obtained in this study with a higher slope than that for tryptophan. Thus, there are three different fluorescence signals that are available for *in situ* biomass estimation for *P. pastoris* during the growth phase (Li et al., 1991; Li et al., 1998). The potential of using these signals during the recombinant protein production phase is discussed in the next section.

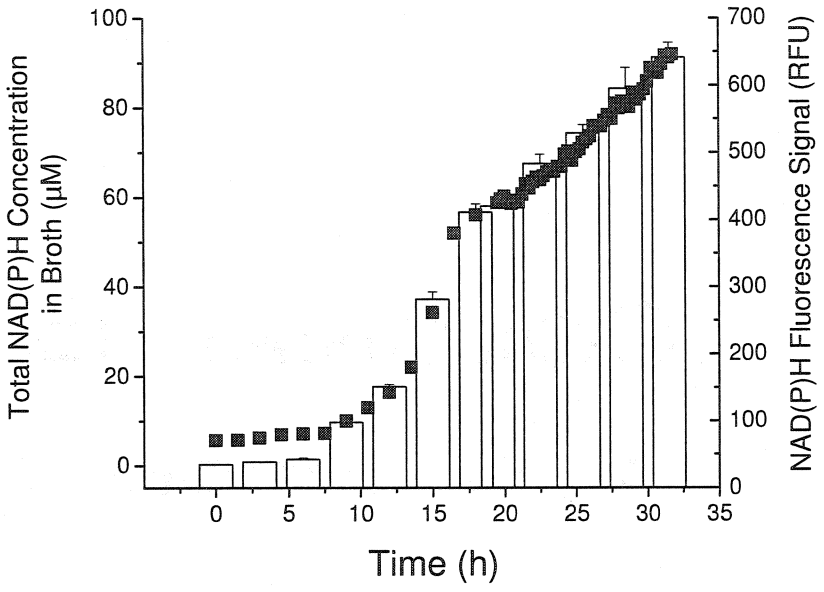


Figure 6.3. NAD(P)H fluorescence signal (330/450 nm) from *Pichis pastoris* culture monitored on-line (■), and NAD(P)H concentration determined off-line (bars)

GFP can be monitored in situ but its signal overlaps with the riboflavins signal

GFP production was induced by adding 1% (v/v) methanol in the bioreactor at 19.5 h. As the yeast used is a Mut^s strain, no significant growth was observed after glycerol depletion (Figure 6.1). The fluorescence signal corresponding to GFP, which was at noise level before MeOH induction (Figure 6.4) increased exponentially from 15 min to 5.5 h after methanol addition, and reach a maximum production rate of 1473 RFU.h^{-1}. From 25 h to 28.5 h, the signal raised linearly to the maximum rate then slowed down. GFP was also analyzed off-line during the culture. Western blot analyses confirmed that the 470/510 nm signal corresponded to GFP. Moreover, a quantitative analysis of the GFP was performed using purified GFP (0-50 mg.L^{-1}) and a spectrofluorometer to obtain a more accurate calibration of the fluorescence. Off-line and

in situ GFP fluorescence measurements were well correlated (R^2=0.94), as previously observed for *E. coli* (Randers-Eichhorn et al., 1997; Albano et al., 1998). A final GFP concentration of 36 $mg.L^{-1}$ was reached 12 h after AOX1 induction (Figure 6.4) as calculated from the off-line measurements. Such a high level in GFP production, increases the risk of fluorescence signal overlapping. Riboflavins fluoresces at similar wavelengths to those for GFP with a maximum at 450/530 nm for riboflavins and 470/510 nm for GFP. Therefore, this prevents the use of the riboflavins signal for biomass estimation in presence of GFP. However, GFP fluorescence did not overlapped with the tryptophan signal. Although no growth was observed during the production phase as showed in Figure 6.1, the tryptophan signal increased from 118 RFU after methanol addition to 163 RFU at the end of the culture. This increase in tryptophan can be attributed to intracellular accumulation in that amino acid and/or diverse proteins (including GFP) containing tryptophane units. Thus, the fluorescence signal from tryptophane is biaised. Fortunately, fluorescence from NAD(P)H was not biased by the GFP fluorescence, because GFP has a single excitation peak at 488 nm (QBiogene, 2004). Then, the increase of NAD(P)H fluorescence signal from 354 RFU to 575 RFU during the methanol phase (Figure 6.3) can not be due to GFP fluorescence neither to biomass growth.

Off-line analysis confirmed the increase in the cellular content in NAD(P)H which was observed by the fluorescence probe after methanol addition. Peck et al. (1992) have already shown that the NAD(P)H fluorescence signal could vary depending on the metabolic pathway used by the cells. Indeed, when switching from glycerol to methanol, *P. pastoris* uses a different pathway than that for glycerol metabolism and different amounts of NAD(P)H units are involved. After methanol oxidation by methanol oxidase, formaldehyde is formed and, it can then be metabolized by either a assimilatory or a dissimilatory pathway (Cereghino and Cregg, 2000; Gellissen 2000). The assimilatory pathway includes pyruvate formation from formaldehyde and then TCA utilization of the pyruvate. In dissimilatory pathway, formaldehyde is metabolized in formate which is then oxidized in CO_2. Dissimilatory pathway results in the net synthesis of 2 moles of

NADH from 1 mole of formaldehyde. It is assumed that the increase of the NAD(P)H fluorescence signal after methanol addition could be partially attributed to this change in pathway. At constant cell concentration after methanol induction, the on-line NAD(P)H fluorescence signal migth then, be a useful tool for the estimation of the cellular metabolic activity.

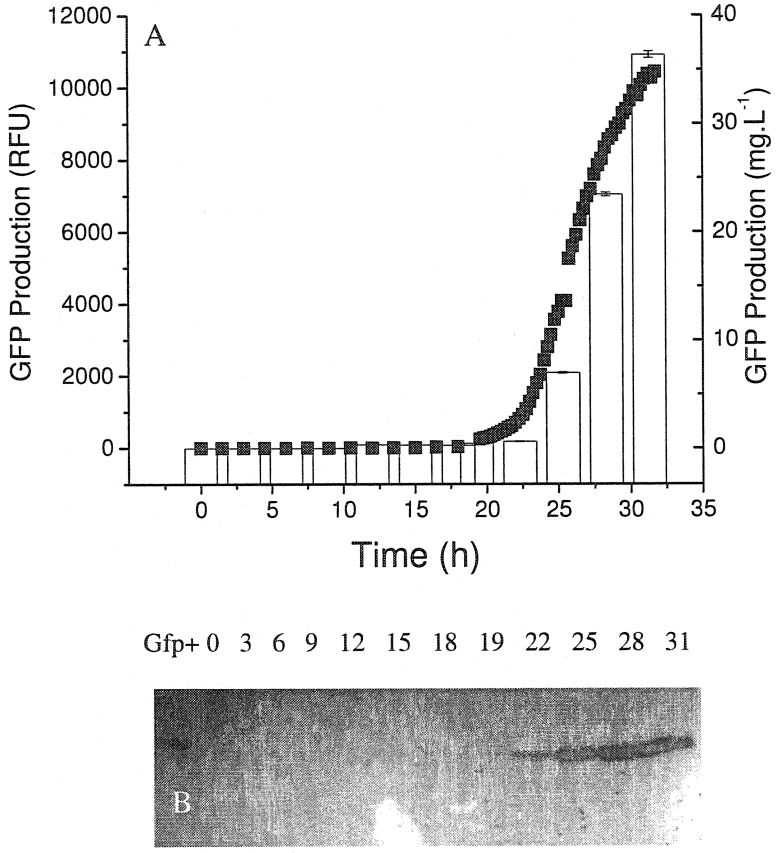


Figure 6.4. A. GFP production of the *Pichia pastoris* cell culture
A. Monitoring using on-line multi-wavelength probe (470/510 nm) (■), and from off-line analysis of intracellular content using a spectrophotometer (bars). B. Western blot detection of the GFP.

6.2.5.2- NSO cell culture

Many human recombinant proteins can not be produced in non-mammalian expression systems because of specific folding and post-translational modifications that are required. Myeloma NSO cells were studied as a model system to evaluate the use of the multi-wavelength fluorescence probe to monitor a bioreactor culture. A NSO cell line was transfected with a *GFP* gene. Mammalian cells were cultured in a batch mode in a bioreactor equipped with a helical ribbon impeller. A maximum cell density of $2.5.10^6$ cells.mL^{-1} was reached (Figure 6.5). Cell viability was over 90% until the 60th hour of the culture. GFP expression was induced with the addition of doxycycline at 24 h. No decrease in cell viability was observed after induction of GFP production from the rtTa system.

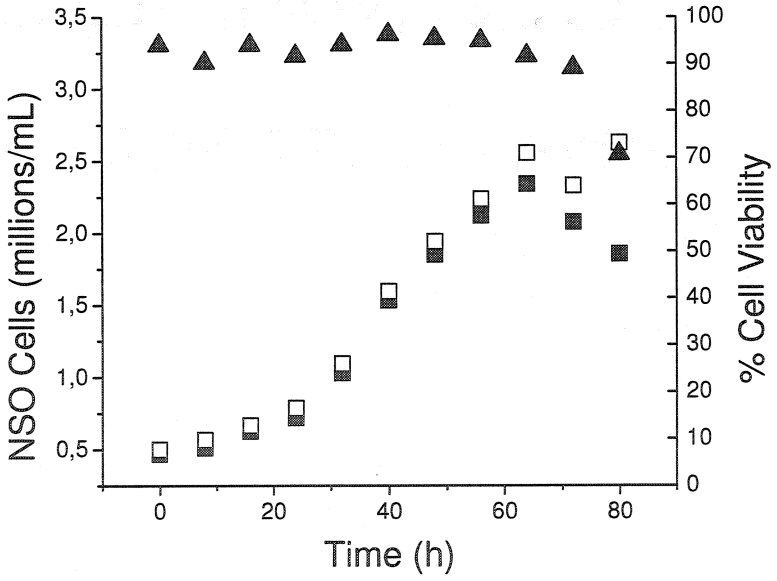


Figure 6.5. Growth curve of NSO cell culture
Viable (■), total cell concentration (□) and cell viability (▲) for NSO cell culture.

On-line cell growth estimation requires a specific medium design

Similarly the *P. pastoris* cultures, fluorescence signals corresponding to tryptophan, NAD(P)H and riboflavins were monitored and compared to cells growth. However, as tryptophan and riboflavins can not be synthesized *de novo* by mammalian cells contrary to yeasts, they were supplied to the cells by the medium. In addition, the fluorescence signal from free tryptophane was certainly biased by the high protein content of the culture medium. Background fluorescence from the medium and from the medium plus serum were analyzed separately and showed respective fluorescence values of 1539 RFU and 2037 RFU at 270/370 nm (data not shown). Indeed, a high fluorescence intensity at 270/370 nm (tryptophan) was recorded at the beginning of the culture for fresh medium (Figure 6.6B) and then it dropped by 100 RFU immediately after inoculation. The rapid decrease in fluorescence may have been due to the dilution caused by the addition of spent medium at the inoculation time (dilution of 1:3). The 270/370 nm signal decreased during the cultivation independently of the behavior of the culture. It was not clear whether or not this was because of intracellular translocation of free tryptophan from the medium, its incorporation into protein or tryptophan degradation. Results thus showed that the multi-wavelength fluorescence probe may be useful for monitoring tryptophan in medium. Results obtained for the riboflavins (Figure 6.6A) showed that the fluorescence signal correlated well with cell concentration. However, as for *P. Pastoris*, the GFP fluorescence signal overlaps with the fluorescence signal from riboflavins (Figure 6.6A and 6.7A). DMEM and DMEM plus serum showed the same fluorescence background at 450/530 nm (data not shown). In addition, there was a high initial fluorescence background signal that could be attributed not only to riboflavins present in medium but also to phenol-red. Commonly used as a pH indicator in commercial media phenol-red exhibits a fluorescence at the wavelengths used for riboflavins. As shown in Figure 6.6C, the NAD(P)H fluorescence signal did not follow at all cell growth and fluctuations were observed at the beginning and at the end of the culture. The signal could have been biased by an unidentified medium or cell constituent.

The NAD(P)H fluorescence signal decreased while cell growth. However, off-line NAD(P)H analysis showed that NAD(P)H concentration was related to the cell concentration. It is interesting to note that off-line data seems diverge sligthly from cell density at the end of the growth phase (56^{th} hour). Indeed, NAD(P)H total concentration seems maximal at the 56^{th} hour whereas maximum cell density was reached at 60 h. Decrease of the NAD(P)H specific cellular content could be used as an early signal announcing the end of the cell growth phase. The specific NAD(P)H content then decreased until the end of the culture.

GFP signal can be monitored on-line

GFP fluorescence measured on-line started to increase from the 6^{th} hour post-induction (Figure 6.7). The GFP production rate calculated from on-line fluorescence measurements was 6.3 and 7.6 $RFU.10^{-6}$ $cells.h^{-1}$ at 8 h and 24 h post-induction, respectively. GFP production measured at 470/510 nm was maximum at the 56^{th} hour of culture which corresponded to the maximum total NAD(P)H content (Figure 6.6C). The GFP fluorescence signal then had reached a plateau suggesting that protein synthesis had become limited. Thus, GFP production stopped simultaneously with growth at 56 h. Lu et al. (2002) proposed that the first derivative of the fluorescence signal (dRFU/dt) could depict gene expression and that a lag occurs between cessation of protein synthesis and fluorescence signal. The GFP signal remained at a constant value (400 RFU) then decreased slightly, eventually due to protein degradation. Western blot and off-line fluorescence analyses of GFP expression confirmed that the 470/510 nm signal correlated to GFP concentration and was not biased by any medium constituents including serum. However, the multi-wavelength fluorescence probe showed a high sensitivity since it was able to detect a level of GFP production as low as 0.05 μg/mL.

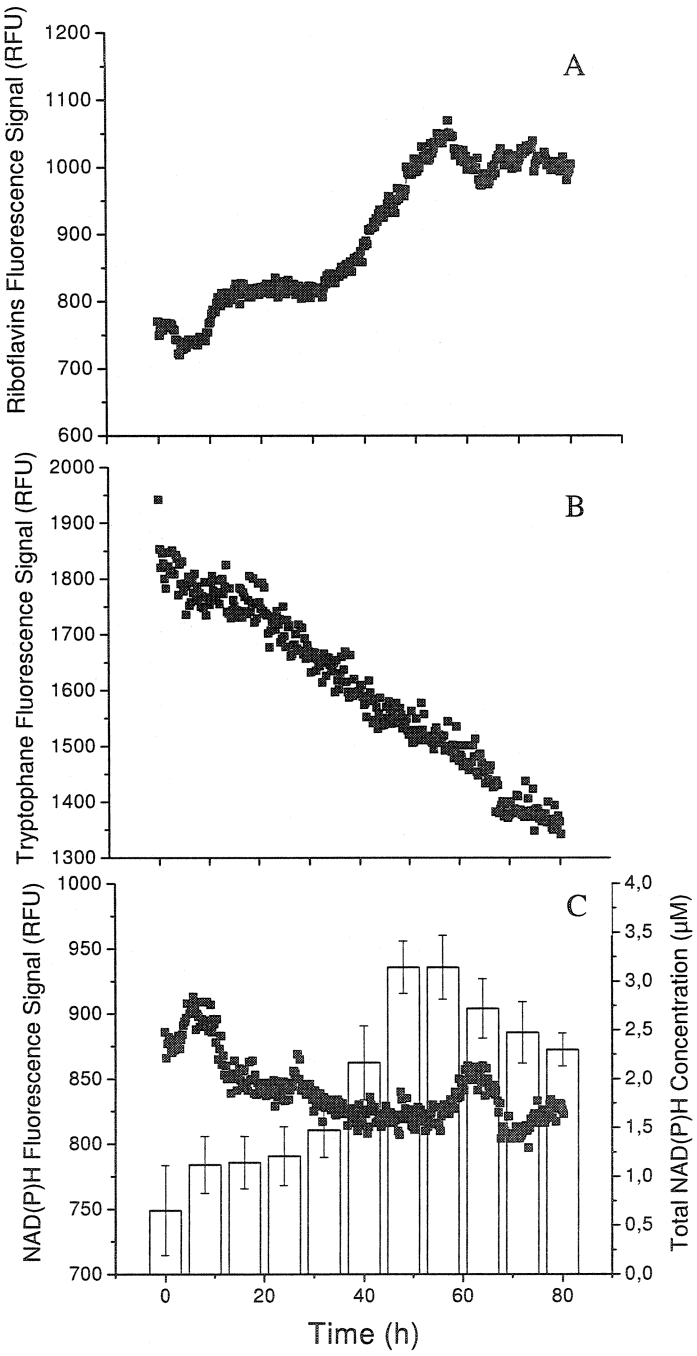


Figure 6.6. Fluorescence signals for on-line estimation of NSO cell concentration. A. Fluorescence signal at 450/530 nm corresponding to riboflavins. B. Tryptophan signal at 270/370 nm. C. NADH signal at 330/450 nm (■) and NADH content determined off-line (bars).

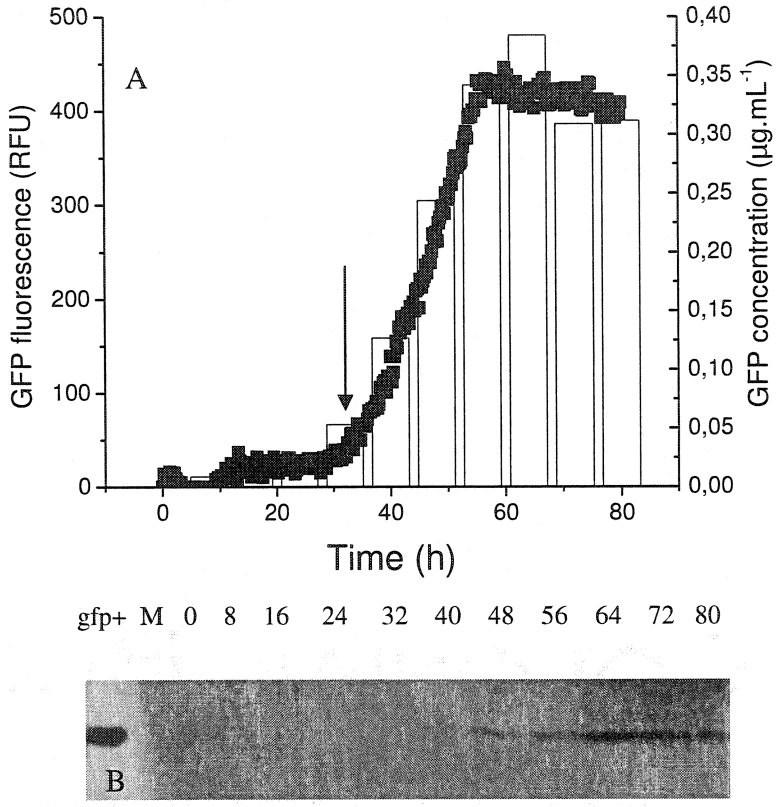


Figure 6.7. GFP production in NSO cell culture.
A. On-line (470/510 nm) fluorescence signal (■) and off-line measurements of intracellular content (bars). B. Western blot detection of GFP. (GFP+ : purified GFP, M : Medium at the end of culture, time is given in hours). Induction is shown by an arrow.

6.2.6- Conclusion

Monitoring of GFP producing recombinant yeast and mammalian cell cultures was performed using a multi-wavelength fluorescence probe. With *P. pastoris*, the NAD(P)H, tryptophan and riboflavins fluorescence signals correlated very well with biomass during the growth on glycerol. During the recombinant protein production phase, GFP was easily detected due to its high fluorescence level at 470/510 nm and quantitative

analysis was possible in respect to high correlation with off-line data. No signal interference were observed between NAD(P)H, tryptophan and GFP. However, these signals showed to divert from biomass during the methanol phase contrary to the situation with glycerol. It is suggested that cellular NAD(P)H concentration varied due to differences in metabolism caused by the switch from glycerol to methanol. Variations of cellular protein content may have also biased the tryptophan fluorescence signal. For NS0 cells, use of the multi-wavelength probe showed to be efficient to follow GFP concentration. However, medium optimization is required since high background fluorescence from medium constituents such as phenol-red and serum overlap with NAD(P)H, riboflavins and tryptophan signals. 2D Fluorescence spectrometry thus appears to be a useful tool for monitoring metabolic and recombinant protein production in microbial and mammalian cell bioreactor cultures.

6.2.7- Acknowledgments

Authors want to thank Dr. D. Groleau of the Biotechnology Research Institute (BRI) (NRC) for providing the *P. pastoris* strain and Dr. B. Massie, also from BRI, for the NSO cell line. This research project was funded by the Canadian Research Chair Program, the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the "Fonds Québécois pour la Recherche en Nature et Technologies" (FQRNT).

6.2.8- References

Albano, C.R., Randers-Eichhorn, L., Bentley, W.E. and Rao, G. (1998) Green Fluorescent Protein as a Real Time Quantitative Reporter of Heterologous Protein Production. Biotechnol. Progress 14, 351-354.

Asali, E.C., Mutharasan, R. and Humphrey, A.E. (1992) Use of Nad(P)H-Fluorescence for Monitoring the Response of Starved Cells of *Catharanthus roseus* in Suspension to Metabolic Perturbations. J. Biotechnol. 23, 83-94.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and

Struhl, K. (1987) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, Brooklyn, N. Y.

Bernofsky, C. and Swan, M. (1973) An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. Anal. Biochem. 53, 452-8.

Bi, X.J., Wirth, M., Beer, C., Kim, E.J., Gu, M.B. and Zeng, A.P. (2002) Dynamic Characterization of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells Containing an Inducible C-Fos Promoter Gfp Expression System as a Biomarker. J. Biotechnol. 93, 231-242.

Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000) Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia Pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24, 45-66.

Cha, H.J., Wu, C.F., Valdes, J.J., Rao, G. and Bentley, W.E. (2000) Observations of Green Fluorescent Protein as a Fusion Partner in Genetically Engineered *Escherichia coli*: Monitoring Protein Expression and Solubility. Biotechnol. Bioeng. 67, 565-574.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994) Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression. Science 263, 802-805.

Choi, B.K. and Jimenez-Flores, R. (2001) Expression and purification of glycosylated bovine beta-casein (L70S/P71S) in *Pichia pastoris*. J. Agric. Food Chem. 49, 1761-6.

Corish, P. and Tyler-Smith, C. (1999) Attenuation of Green Fluorescent Protein Half-Life in Mammalian Cells. Protein Eng. 12, 1035-1040.

Cregg, J.M. and Higgins, D.R. (1995) Production of Foreign Proteins in the Yeast *Pichia pastoris*. Can. J. Bot. 73, S891-S897

Delisa, M.P., Li, J.C., Rao, G., Weigand, W.A. and Bentley, W.E. (1999) Monitoring Gfp-Operon Fusion Protein Expression During High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli* Using an on-Line Optical Sensor. Biotechnol. Bioeng. 65, 54-64.

Farabegoli, G., Hellinga, C., Heijnen, J.J. and Van Loosdrecht, M.C.M. (2003) Study on the Use of Nadh Fluorescence Measurements for Monitoring Wastewater Treatment Systems. Water Res. 37, 2732-2738.

Gellissen, G. (2000) Heterologous Protein Production in Methylotrophic Yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 741-750.

Gellissen, G., Hollenberg, C.P. and Janowicz, Z.A. (1995) Gene expression in methylotrophic yeasts. Bioprocess Technol. 22, 195-239.

Gibon, Y. and Larher, F. (1997) Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. Anal. Biochem. 251, 153-7.

Gilbert, P.A., Garnier, A., Jacob, D. and Kamen, A. (2000) On-Line Measurement of Green Fluorescent Protein (Gfp) Fluorescence for the Monitoring of Recombinant Adenovirus Production. Biotechnol. Letters 22, 561-567.

Harrison, D.E. and Chance, B. (1970) Fluorimetric technique for monitoring changes in the level of reduced nicotinamide nucleotides in continuous cultures of microorganisms. Appl. Microbiol. 19, 446-50.

Hollenberg, C.P. and Gellissen, G. (1997) Production of Recombinant Proteins by Methylotrophic Yeasts. Curr. Opin. Biotechnol. 8, 554-560.

Horvath, J.J., Glazier, S.A. and Spangler, C.J. (1993) *In-Situ* Fluorescence Cell Mass Measurements of *Saccharomyces cerevisiae* Using Cellular Tryptophan. Biotechnol. Prog. 9, 666-670.

Jolicoeur, M., Chavarie, C., Carreau, P.J. and Archambault, J. (1992) Development of a Helical-Ribbon Impeller Bioreactor for High-Density Plant Cell Suspension Culture. Biotechnol. Bioeng. 39, 511-521.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lal, S.K., Tulasiram, P. and Jameel, S. (1997) Expression and Characterization of the Hepatitis E Virus Orf3 Protein in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. Gene 190, 63-67.

Li, J.C., Wang, S., Vandusen, W.J., Schultz, L.D., George, H.A., Herber, W.K., Chae,

H.J., Bentley, W.E. and Rao, G. (2000) Green Fluorescent Protein in *Saccharomyces cerevisiae*: Real-Time Studies of the Gal1 Promoter. Biotechnol. Bioeng. 70, 187-196.

Li, J.K., Asali, E.C. and Humphrey, A.E. (1991) Monitoring Cell Concentration and Activity by Multiple Excitation Fluorometry. Biotechnol. Prog. 7, 21-27.

Li, J.K. and Humphrey, A.E. (1991) Use of Fluorometry for Monitoring and Control of a Bioreactor. Biotechnol. Bioeng. 37, 1043-1049.

Li, X.Q., Zhao, X.N., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C. and Kain, S.R. (1998) Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein Transcription Reporter. J. Biol. Chem. 273, 34970-34975.

Lindemann, C., Marose, S., Nielsen, H.O. and Scheper, T. (1998) 2-Dimensional Fluorescence Spectroscopy for on-Line Bioprocess Monitoring. Sensor Actuat. B-Chem. 51, 273-277.

Liu, S., Bugos, R.C., Dharmasiri, N. and Su, W.W. (2001) Green Fluorescent Protein as a Secretory Reporter and a Tool for Process Optimization in Transgenic Plant Cell Cultures. J. Biotechnol. 87, 1-16.

Lu, C.H., Albano, C.R., Bentley, W.E. and Rao, G. (2001) Differential Rates of Gene Expression Monitored by Green Fluorescent Protein. Abstr. Pap. Am. Chem. S. 221, U115

Lu, C.H., Albano, C.R., Bentley, W.E. and Rao, G. (2002) Differential Rates of Gene Expression Monitored by Green Fluorescent Protein. Biotechnol. Bioeng. 79, 429-437.

Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D.D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Belanger, F. and Langelier, Y. (1998) Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. J. Virol. 72, 2289-96.

Peck, M.W. and Chynoweth, D.P. (1992) On-line Fluorescence Monitoring of the Methanogenic Fermentation. Biotechnol. Bioeng. 39, 1151-1160.

Qbiogene inc., (2004) Autofluorescent Proteins AFP's™ Applications Manual.

Randers-Eichhorn, L., Albano, C.R., Sipior, J., Bentley, W.E. and Rao, G. (1997) On-Line Green Fluorescent Protein Sensor With Led Excitation. Biotechnol. Bioeng. 55, 921-926.

Raschke, W.C., Neiditch, B.R., Hendricks, M. and Cregg, J.M. (1996) Inducible Expression of a Heterologous Protein in *Hansenula polymorpha* Using the Alcohol Oxidase 1 Promoter of *Pichia pastoris*. Gene 177, 163-167.

Reischer, H., Schotola, I., Striedner, G., Potschacher, F. and Bayer, K. (2004) Evaluation of the GFP Signal and Its Aptitude for Novel On-Line Monitoring Strategies of Recombinant Fermentation Processes. J. Biotechnol. 108, 115-125.

Ren, H.T., Yuan, J.Q. and Bellgardt, K.H. (2003) Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. J. Biotechnol. 106, 53-68.

Scheper, T., Lorenz, T., Schmidt, W. and Schugerl, K. (1987) On-line measurement of culture fluorescence for process monitoring and control of biotechnological processes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 506, 431-45.

Siano, S.A. and Mutharasan, R. (1989) NADH and Flavin Fluorescence Responses of Starved Yeast Cultures to Substrate Additions. Biotechnol. Bioeng. 34, 660-670.

Siano, S.A. and Mutharasan, R. (1991) NADH Fluorescence and Oxygen-Uptake Responses of Hybridoma Cultures to Substrate Pulse and Step Changes. Biotechnol. Bioeng. 37, 141-159.

Su, W.W., Guan, P.Z. and Bugos, R.C. (2004) High-Level Secretion of Functional Green Fluorescent Protein From Transgenic Tobacco Cell Cultures: Characterization and Sensing. Biotechnol. Bioeng. 85, 610-619.

Chapitre 7 – Modification du métabolisme secondaire de racines transformées de *Catharanthus roseus* par génie génétique

La production des composés d'intérêt pharmaceutique vinblastine et vincristine en culture *in vitro* est à ce jour impossible. Les travaux exposés dans ce chapitre visent, dans un premier temps, à mettre en évidence à partir de la littérature le blocage métabolique intervenant au niveau de la biosynthèse du précurseur vindoline. Nous proposons par la suite de modifier ce métabolisme en forçant l'expression inductible de deux enzymes clefs qui ne sont pas actives dans les racines. Après la construction des vecteurs d'expression, une technique d'insertion des gènes par *Agrobacterium tumefasciens* a été testée. Dans le chapitre précédent, il a été démontré que la GFP pouvait être suivie *in situ* dans des cultures en bioréacteur de levures et de cellules animales. L'insertion du gène de la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible dans des cellules sera également tentée. L'insertion de la GFP a pour objectif d'élargir les résultats du chapitre précédent à une culture végétale et de développer un protocole de transfection.

7.1- État de la recherche

7.1.1- Utilisation générique du génie génétique

Il convient tout d'abord de définir le terme de génie génétique. Le génie génétique représente l'ensemble des techniques visant à étudier ou à modifier de façon contrôlée l'expression des gènes dans une entité biologique. Depuis la découverte de l'ADN en 1868 par Friedrich Miescher et l'élucidation du code génétique en 1961, les perspectives concernant la possibilité de manipuler le support de l'hérédité ont conduit à de nombreuses recherches. L'engouement des scientifiques et les progrès techniques réalisés

ont donné naissance à une nouvelle discipline dans le domaine des sciences : la biotechnologie.

Les applications du génie génétique sont nombreuses et peuvent être présentées comme suit :

- Amélioration agronomique d'une espèce végétale (augmentation du rendement, résistance à des pathogènes)
- Synthèse de protéines recombinantes (à des fins thérapeutiques ou de recherche)
- Thérapie génique (remplacement *in vivo* d'un gène défectueux)

Dans toutes ces applications, la logique est identique. Elle consiste à construire un vecteur contenant le gène d'intérêt puis à insérer ce vecteur dans un organisme cible et à activer l'expression du gène *in vivo*.

Le premier exemple industriel de production de protéines recombinante est la synthèse en 1982 d'insuline humaine par la bactérie *Escherichia coli*. De part leur simplicité, les bactéries ont été les premiers organismes à être utilisés pour la production de protéines recombinantes. Toutefois, les limites de ce système sont apparues très rapidement et désormais tous les types cellulaires (bactérie, levures, cellules animales ou végétales) font l'objet d'études par génie génétique.

Très peu d'applications commerciales déposées faisant état de la production d'une protéine recombinante dans des plantes ont été répertoriées à ce jour (Horn et al., 2004). Cependant, la technologie est en place et de nombreux essais ont été effectués (Doran, 2000, Daniell et al., 2001). Les systèmes végétaux privilégiés sont soit la plante entière, soit les cultures de cellules en suspension ou plus récemment les racines transformées (Doran, 2000, Gaume et al., 2003). Les caractéristiques de ces systèmes ont été présentées dans la partie 2.2. du présent document.

A titre d'exemples récents, on peut citer la synthèse d'une protéine de lait humain, la sCD14, dans des cellules de tabac (Girard et al., 2004), l'expression de l'antigène Tat du virus HIV-1 dans la pomme de terre (Kim et Langridge, 2004) ou la synthèse d'une cytokine humaine, l'interleukine-12, dans des plants de tabac (Gutiérrez-Ortega et al, 2004).

7.1.2- Génie génétique et alcaloïdes

De part leurs intérêts multiples au niveau industriel, les voies biosynthétiques des alcaloïdes ainsi que leur régulation ont fait l'objet d'un décryptage intensif durant les 20 dernières années (Facchini, 2001, Verpoorte et al., 2002). L'application du génie génétique permet de modifier l'expression de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire.

Plusieurs essais de modification du métabolisme secondaire de *Catharanthus roseus* ont été effectués en vue d'augmenter la production d'alcaloïdes. Deux gènes ont particulièrement été la cible de ces recherches. Il s'agit du gène *TDC* codant la tryptophane décarboxylase et du gène *STR1* codant la strictosidine synthase. La voie de synthèse de la strictosidine est rappelée à la figure 7.1.

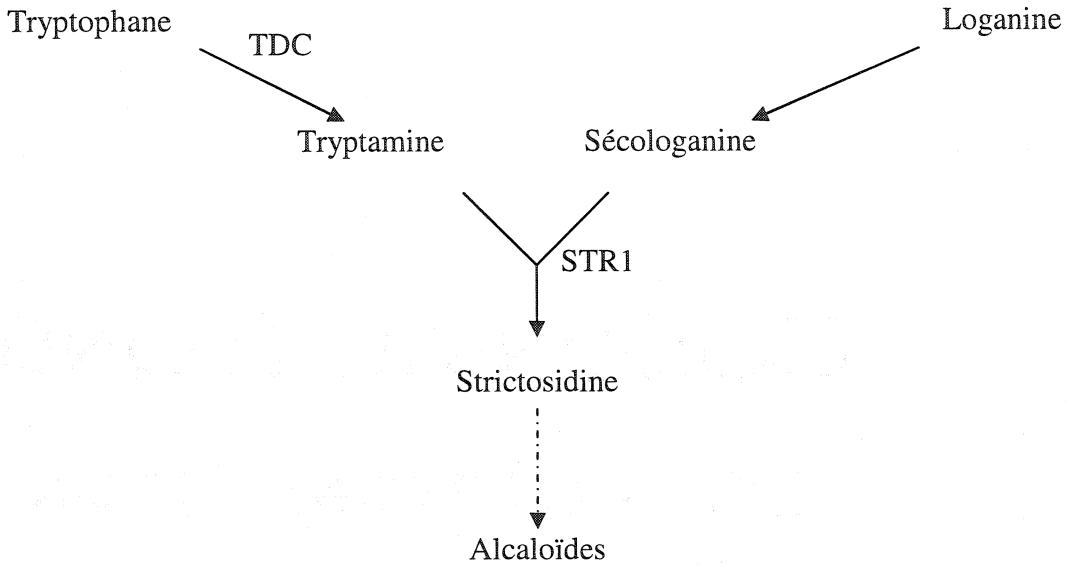


Figure 7.1. Voie de synthèse de la strictosidine.

TDC : tryptophane décarboxylase ; STR1 : strictosidine synthase.

(D'après Meijer et al., 1993c)

Dans l'objectif d'augmenter la synthèse de tryptamine, considérée alors comme une étape limitante (Meijer et al., 1993c), Goddijn et collaborateurs ont inséré le gène *TDC* dans des plantes via une transformation *par Agrobacterium tumefasciens* (Goddijn et al., 1995). Bien que l'activité de la TDC ait été augmentée dans les cals résultant de la transformation, la production d'alcaloïdes n'a pas été modifiée comparativement au contrôle. Une autre étude menée par Canel et al. (1998) a mis en évidence le fait que la voie limitante pour la synthèse de la strictosidine était la voie des iridoïdes. En effet, la surexpression du gène *TDC* en combinaison avec le gène *STR1* n'augmentait pas la

synthèse de strictosidine par rapport à un transgène surexprimant uniquement *STR1* (Canel et al., 1998). Ces résultats ont été confirmés par des études démontrant que l'ajout du précurseur loganine dans le milieu de culture d'une lignée surexprimant *STR1* permettait d'augmenter la production de strictosidine et d'alcaloïdes terpènes indoles (Whitmer et al., 1998a). Le génie génétique peut ainsi être utilisé pour mettre en évidence une voie limitante dans un réseau métabolique.

Une voie métabolique peut aussi être créée au sein d'une espèce où elle n'existe pas de façon endogène. Ainsi, la synthèse de strictosidine a été rendu possible dans des cellules de tabac en les transformant avec les gènes *TDC* et *STR1* de *C. roseus* et en fournissant aux cellules la sécologanine nécessaire par un apport extérieur (Hallard et al., 1997).

D'autres essais de modification du métabolisme secondaire par génie génétique sont présentés dans le tableau 7.1.

Tableau 7.1 Exemples de modification du métabolisme secondaire par génie génétique

Espèce cible	Transgène	Résultat obtenu	Référence
Nicotiana rustica	Ornithine décarboxylase (ODC)	Augmentation de la production de nicotine, putrescine et N-méthylputrescine	Hamill *et al.*, 1989
Nicotiana tabacum	Lysine décarboxylase (LDC)	Augmentation de la production de cadaverine et anabasine	Fecker *et al.*, 1993
Atropa belladona	Hyoscyamine-6β-hydroxylase (H6H)	Augmentation de la production de scopolamine	Yun *et al.*, 1992
Hyoscyamus muticus	Hyoscyamine-6β-hydroxylase (H6H)	Augmentation de la production de scopolamine	Jouhikainen *et al.*, 1999
Peganum harmala	Tryptophane décarboxylase (TDC)	Augmentation de la production de sérotonine	Berlin *et al.*, 1993

7.1.3- Problématique

Les deux anticancéreux de *Catharanthus roseus* sont produits à l'échelle industrielle par la plante entière. La forte valeur commerciale de ces molécules (5 millions de dollars américains par kilogramme) a suscité de nombreuses recherches afin de décrypter les voies de biosynthèse menant à ces composés. À ce jour, aucune observation de la synthèse de vinblastine ou de vincristine n'a été réalisée sur des cultures *in vitro*. Il semble donc évident qu'un blocage génétique ou métabolique survient à un certain niveau dans ce schéma de synthèse. Il est clairement accepté par l'ensemble de la communauté scientifique que la synthèse simultanée en culture des deux précurseurs de la vinblastine, soit la catharanthine et la vindoline, pourrait être l'étape limitante dans ce procédé. La catharanthine est produite dans la plupart des lignées cellulaires développées (y compris les lignées développées au sein de notre laboratoire). Cependant, la vindoline n'a pratiquement jamais été observée en culture *in vitro*, sauf dans des pousses régénérées de cals ou dans des pousses transformées (Miura et al., 1988, O'Keefe et al., 1997). Ainsi, aucune culture de cellules en suspension ou de racines transformées n'a démontré de capacité à produire la vindoline.

Des études réalisées sur la plante entière ont néanmoins réussi à mettre en évidence la totalité de la voie métabolique entre la tabersonine et la vindoline (DeLuca et Laflamme, 2001) (figure 7.2).

À ce jour, 3 gènes codant des enzymes impliquées dans la transformation de la tabersonine en vindoline ont été clonés. Il s'agit de celui de la tabersonine-16-hydroxylase (Schröder et al., 1999), le gène de la D4H (Vazquez-Flota et al., 1997) et le gène codant la DAT (St-Pierre et al., 1998).

La synhtèse de vindoline est régulée par le développement de la plante. En effet, la vindoline ainsi que la vinblastine et la vincristine sont détectées en plus grande quantité dans des jeunes pousses de *C. roseus*, alors que la production diminue avec la maturité de la plante (DeLuca et St-Pierre, 2000). Cette régulation liée au développement est aussi

sous le contrôle de la lumière. Des semences qui se sont développées à l'obscurité produisent de grandes quantités de tabersonine mais très peu de vindoline (Balsevich et al., 1986). Lorsqu'elles sont placées à la lumière, la tabersonine est rapidement convertie en vindoline. Ce résultat est confirmé par l'étude de la régulation de 4 enzymes impliquées : la T16H, la NMT, la D4H et la DAT. Toutes ces enzymes sont activées par la lumière que ce soit de façon transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. La synthèse d'ARN messagers de *T16H* et *DAT* est fortement augmentée par l'exposition des plants à la lumière (St-Pierre et DeLuca, 1995, DeLuca et al., 1988, St-Pierre et al., 1998). L'activation de la D4H par la lumière semble s'exercer à un niveau post-trasncriptionnel puisque l'activité de cette enzyme est augmentée après exposition à la lumière sans qu'il n'y ait de variation du niveau de transcription de son gène (Vazquez-Flota et DeLuca, 1998).

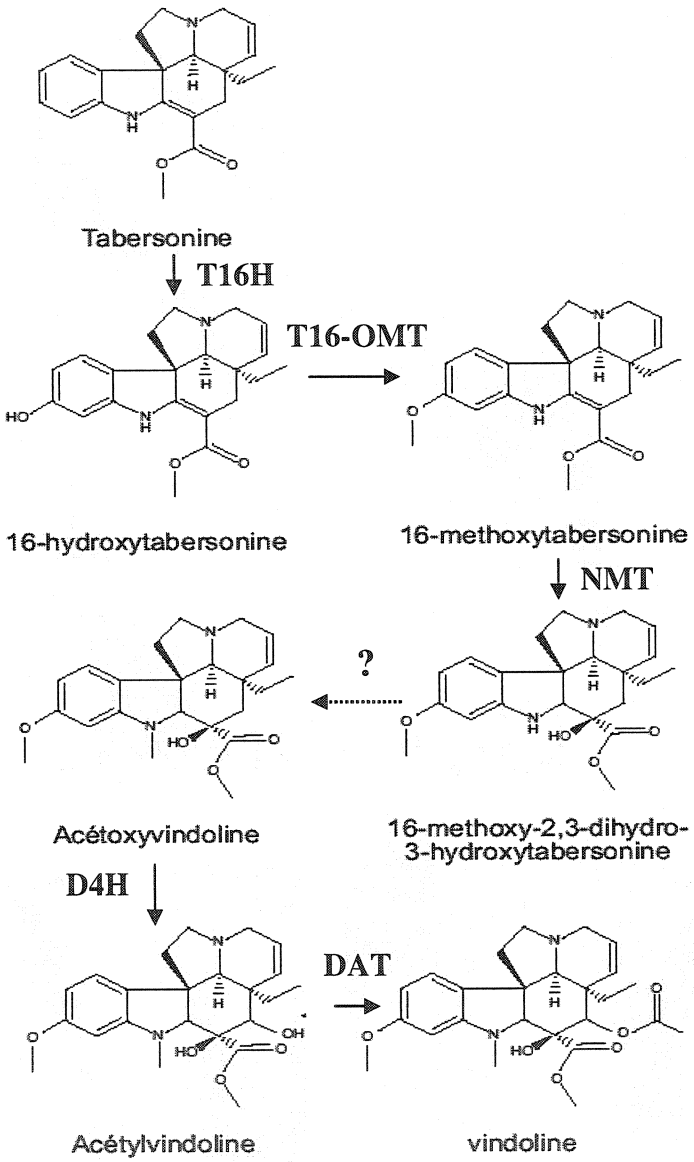


Figure 7.2 Schéma métabolique de la biosynthèse de vindoline

T16H : Tabersonine-16-hydroxylase ; T16-OMT : 16-hydorxytabersonine-O-méthyl transférase ; NMT : 16-méthoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine-N-méthyl transférase ; D4H : Désacétoxybindoline-hydroxylase ; DAT : Déacétylvindoline-4-O-acétyltransférase. La flèche en pointillés représente une enzyme qui n'a pas encore été isolée (D'après DeLuca et Laflamme, 2001).

La tabersonine est présente dans toutes les cultures *in vitro* sous forme de racines transformées ou de cellules en suspension. Bien que la protéine T16H n'ait été détectée à l'origine que dans des organes (jeunes feuilles ou tiges) où il y avait production de vindoline (St-Pierre et DeLuca, 1995), cette enzyme a été répertoriée par la suite dans des cellules en suspension où elle a été isolée (Schröder et al., 1999). On peut donc penser que cette enzyme est présente dans des cellules dédifférenciées et qu'elle peut être activée par la lumière. La première étape d'hydroxylation de la tabersonine ne semble pas représenter le blocage métabolique anhiliant la synthèse de vindoline dans des cellules en suspension.

Une étude menée par St-Pierre et collaborateurs (1999) a permis de localiser spécifiquement la présence des enzymes D4H et DAT dans les parties aériennes de la plante (feuilles, tiges, bouton floral) et de démontrer l'absence d'ARN messagers pour ces enzymes dans les racines.

Par une approche de génie génétique, nous avons voulu forcer l'expression de deux enzymes impliquées dans les dernières étapes de biosynthèse de la vindoline dans des racines de *Catharanthus roseus*.

7.2- Choix des éléments cibles de la construction génétique

L'introduction de gènes dans un organisme ainsi que l'expression de ceux-ci nécessite une certaine intégrité et la présence des différents éléments essentiels à l'expression d'un gène soit, un promoteur qui va contrôler le niveau d'expression, une partie codante qui soutient l'information génétique et un terminateur portant le signal permettant d'arrêter la transcritpion.

7.2.1- Choix des gènes d'intérêts

Pour cette étude trois gènes vont être utilisés.

Gène de la D4H (EC 1.14.11.11). Il code pour la désacétoxyvindoline-hydroxylase qui convertit l'acétoxyvindoline en acétylvindoline. Il a été cloné en 1997 par Vazquez-Flota et collaborateurs (Vazquez-Flota et al., 1997). Il est composé de 4232 nucléotides et comporte deux introns. Afin de minimiser la taille de la construction, seule sa partie codante sera utilisé. La séquence codante du gène *D4H* est présentée en annexe (figure B.1)

Gène de la DAT (EC 2.3.1.107). Ce gène code la dernière enzyme impliquée dans la biosynhtèse de vindoline : la déacétylvindoine-17-O-acétyl transférase, qui convertit l'acétylvindoline en vindoline. Il a été cloné en 1998 par St-Pierre (St-Pierre et al., 1998). Seule la partie codante de ce gène composé de 1320 nucléotides est disponible. Elle est présentée en annexe (figure B.2).

Gène de la GFP. L'utilisation de ce gène va servir de marqueur de transformation afin de vérifier si le transfert des gènes a été efficace. Il va ensuite être utilisé comme rapporteur de l'induction du métabolisme secondaire. En effet, son expression peut être suivi en continu via l'utilisation d'une sonde à fluorescence tel qu'indiqué dans l'article présenté au chapitre 6 de ce mémoire. Il provient du plasmide p1302 de la compagnie Cambia Biogene (Canberra, Australie). Il code pour la protéine mGFP5 qui est une variante de la GFP d'*Aequorea victoria* dont un intron cryptique a été enlevé afin de permettre son expression dans les cellules végétales (Haseloff et al., 1997).

7.2.2- Choix du promoteur

Le promoteur utilisé est le même pour les trois gènes considérés. Il doit répondre aux caractéristiques suivante :

- actif dans les racines de *Catharanthus roseus*
- activité moyenne
- inductible en même temps que le reste du métabolisme secondaire

Le promoteur de la strictosidine synthase, une enzyme impliquée au début du métabolisme secondaire qui catalyse la synthèse de strictosidine à partir de tryptamine et de sécologanine, a été choisi. Plusieurs études de caractérisation ont été menés sur ce promoteur. Il est activé par l'élicitation à l'acide jasmonique, par de l'extrait de levures et par les rayons UV (Menke et al., 1999, Pasquali et al., 1999). De plus, la présence d'ARN messager de *STR1* est plus importante dans les racines que dans les autres partie de la plante, ce qui suggère une expression tissu-spécifique (St-Pierre et al., 1999). Ainsi, couplé aux gènes *D4H*, *DAT* et *GFP*, il pourrait activer leur transcription et ainsi permettre la synthèse d'enzymes au moment de l'induction du métabolisme secondaire lors de la phase de production des alcaloïdes. La séquence du promoteur *str1* est indiquée en annexe (figure B.6).

7.2.3- Choix du terminateur

Le terminateur utilisé pour chacune des constructions est celui du gène de la nopaline synthase (NOS), présent sur les plasmides d'expression utilisés.

7.3- Construction des vecteurs d'expression

7.3.1- Matériel et méthodes

La démarche expérimentale adoptée pour réaliser ces constructions est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7.2. Démarche expérimentale des étapes d'isolement des gènes et de construction des vecteurs d'expression

	Étapes
1	Isoler le promoteur *STR1* de l'ADN génomique de *C. roseus* et le cloner dans un plasmide d'amplification
2	Préparer une banque d'ADNc à partir des ARN messagers de feuilles de *C. roseus* car *DAT* et *D4H* ne s'expriment que dans les feuilles
3	Cloner les ADNc de *DAT* et *D4H* dans un plasmide d'amplification
4	Fusionner le promoteur *STR1* en amont des ADNc de *DAT* et *D4H*
5	Insérer le promoteur *STR1* en amont du gène de la GFP dans un plasmide binaire qui sera utilisé pour la transformation des racines

Isolement du promoteur *STR1*. Le promoteur *STR1* est isolé à partir de 100 mg de poids humide de racines transformées de la lignée GAO. Le tissu frais est congelé dans l'azote liquide puis broyé dans un mortier refroidi. L'ADN génomique est ensuite extrait en utilisant le kit DNeasy Plant (Qiagen, Mississauga, Canada). Le promoteur STR1 est amplifié par PCR en utilisant les amorces (SIGMA Genosys, Oakville, Canada):

sens :5'-GAGA<u>GTCGAC</u>CATAATTAATTAATCCCTACAACTGATTTC-3'
SalI

antisens : 5'-GAGAGGATCCTGTTGACTGTAAATGATGGGAG-3'
BamHI

Le mélange réactionnel contient 70 ng d'ADN génomique, 500 nM de chaque amorce, 1,25 mM de $MgSO_4$, 200 µM de dNTP, 2.5 U de Pwo polymérase et du tampon réaction 1X pour un volume final de 20µL.

Le cycle de PCR est le suivant : dénaturation initial pendant 5 min à 95°C, puis 35 cycles : 30 s à 95°C, 30 s à 54°C, 45 s à 72°C, suivis d'une élongation finale de 8 minutes à 72°C.

Après amplification, le produit de la PCR est séparé sur gel d'agarose 1% (poids/volume) puis la bande correspondante à 600 pb est excisée avec une lame de rasoir. L'ADN est extrait du gel par le kit QIAEXII (Qiagen, Mississauga, Canada). Le fragment est ensuite cloné dans le vecteur pCR4-TOPO (Invitrogen, Burlington, CANADA) conformément aux spécifications du fabricant après la modification suivante. L'enzyme Pwo n'ajoute pas un nucléotide dATP en 3' de l'élongation contrairement à la Taq polymérase. Ce nucléotide est nécessaire pour le clonage dans pCR4-TOPO. Il a donc été ajouté de la manière suivante. 8µL du produit de la PCR purifié sur gel est incubé pendant 15 minutes à 72°C dans du tampon réactionnel 1X contenant 2,5 mM de $MgCl_2$, 1U Taq polymérase, 20 µM dATP. Le plasmide est ensuite inséré dans une souche compétente d'*E.coli* par choc thermique (30 secondes à 42°C puis le tube est immédiatement refroidi dans la glace). Les bactéries sont incubées pendant 1 h à 37°C dans 250 µL de milieu SOC avant d'être étalées sur milieu LB solide contenant 50 µg/mL de kanamycine et incubées pendant 24 h afin de sélectionner les clones ayant intégré le transgène. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries selon la méthode MiniPrep décrite par Sambrook et al., (1989).

Isolement d'ARN des feuilles et rétrotranscription. L'ARN total est extrait de 100 mg de feuilles (poids humide) de *Catharanthus roseus* par le kit RNeasy (Qiagen, Mississauga, Canada). 1 µg d'ARN total est utilisé pour la rétrotranscritpion. Le mélange de 100 µL contient du tampon FSB (*First Strand Buffer*) 1X, 10 mM de DTT, 1 mM de

ddNTP, 500 pmol d'oligodT20. Aprés une étape de 10 minutes de dénaturation à 70°C, 20U de MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, Canada) et 1 µL d'inhibiteur de ribonucléase sont ajoutés au mélange réactionnel. La réaction est effectuée pendant 1 h à 37°C.

Isolement de l'ADNc *D4H*. L'ADNc de *D4H* est amplifié par PCR en utilisant les amorces :

sens : 5'-GAGAGGATCCATGCCTAAGTCTTGGCCAATTG-3'
BamHI
antisens :5'-GAGAGGTACCCTAATTGTTTAACCTGACAGCTCGTCCATGC-3'
KpnI

Le mélange réactionnel contenant 1 µM de chaque amorce, 3µL d'ADNc, 200 µM de dNTP, 1,25mM de $MgSO_4$, et 9,5 µL d'eau est incubé pendant 8 minutes à 95°C. La Pwo polymérase (2.5 U) et son tampon (sans $MgSO_4$) sont ajoutés après les 8 minutes dans le mélange chaud afin d'éviter la synhtèse de dimères d'amorces. La PCR débute par 6 cycles de *Touchdown* où la température d'appariement est diminuée d'un degré C/cycle: 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min 45 s, puis se poursuit par 35 cycles classique: 95°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 1 min 45 s et s'achève par une élongation finale de 8 minutes à 72°C.

La technique *touchdown* permet d'augmenter la spécificité du produit de PCR. Le fragment amplifié est purifié sur gel d'agarose puis cloné dans pCR4-TOPO comme décrit précédemment.

Isolement de l'ADNc *DAT*. L'ADNc de *DAT* est amplifié par PCR en utilisant les amorces :

sens : 5'-GAGAGGATCCATGGAGTCAGGAAAAATATCG-3'
BamHI
antisens :5'-GAGAGGTACCTTAATTAGAAACAAATTGAAGTAGCTG-3'
KpnI

L'amplification par PCR et le clonage dans pCR4-TOPO s'effectuent comme décrits pour l'ADNc de *D4H*.

Construction de pBK-str1-dat. Comme le plasmide pCR4-TOPO ne dispose pas de sites de restriction adéquats pour effectuer la construction *STR1-DAT*, l'ADNc de *DAT* doit être cloné dans une autre vecteur bactérien, pBK-CMV. Le plasmide pBK-CMV (carte présenté en annexe, figure B.4) est ouvert par KpnI puis BamHI (NewEngland Biolabs, Pickering, Canada). L'ADNc de *DAT* est amplifié par PCR à partir du plasmide pCR4-TOPO-dat en utlisant les mêmes conditions que précédemment. Après purification sur gel, le produit de la PCR (dont les amorces contiennent les sites BamHI et KpnI) est digéré par les deux enzymes de restriction utilisées pour ouvrir le vecteur pBK-CMV. L'ADNc de *DAT* est ensuite inséré par ligation dans pBK-CMV. Cent ng de plasmide sont mélangés avec 100 ng d'ADNc. La ligation s'effectue en présence de 2,5U de ligase du phage T4 (Invitrogen) pendant 12h à 25°C. Le produit de ligation est précipité à l'éthanol puis resuspendu dans 3 µL d'H_2O. Il est ensuite inséré dans la souche électrocompétente d'*E.coli* Xl1 par électroporation (14,6 kV/cm, 1s). Les clones positifs sont isolés sur milieu LB solide contenant 50µg/mL de kanamycine. Le plasmide pBK-dat est alors récupéré par Miniprep (Sambrook et al., 1989) puis digéré par SalI/BamHI pour accueillir le promoteur *STR1*. *STR1* est amplifié de pCR4-TOPO-Str1 en utilisant les mêmes amorces que précédemment puis le produit de la PCR est digéré par SalI/BamHI. Le promoteur est ensuite cloné dans pBK-dat. Le plasmide obtenu se nomme pBK-str1-dat.

Construction de pBK-str1-d4h. Même démarche que pour la création de pBK-str1-dat (décrit ci-haut).

Construction de p1302-str1. Le plasmide p1302 (Cambia, Canberra, Australie) comportant le gène de la mGFP5 (carte en annexe figure B.5) est digéré par SalI/NcoI afin d'enlever le promoteur CaMV35S. Str1 est amplifié par PCR en utilisant les amorces :

sens :5'-GAGAGTCGACCATAATTAATTAATCCCTACAACTGATTTC-3'
SalI
antisens : 5'-GAGACCATGGTGTTGACTGTAAATGATGGGAG-3'
NcoI

Le promoteur est ensuite digéré par SalI/NcoI puis cloné dans p1302.

7.3.2- Résultats

L'isolement du promoteur STR1 a été très délicate car le signal après amplification par PCR d'ADN génomique demeurait très faible. De plus, la présence d'une bande non-spécifique située à environ 300 pb indiquerait la présence d'une séquence similaire autre que celle du promoteur *STR1* dans l'ADN de *Catharanthus roseus*. Après plusieurs essais, le promoteur a été cloné avec succès dans le vecteur pTOPO. Afin de vérifirer l'intégrité de la séquence nucléotidique, le promoteur a été séquencé. La séquence a été confrontée à la base de données du NCBI (National Center of Biotechnology) La construction pTOPO-str1 obtenue a donc servi de base pour toutes les manipulations subséquentes du promoteur. Celui-ci a donc été amplifié en même temps que le plasmide dans *E. coli*.

Après rétrotranscription, les gènes *DAT* et *D4H* n'étaient pas ou pu détectés dans les échantillons d'ADNc utilisés en utilisant une concentration de sels Mg^{2+} standard de 1,25 mM contenu dans le tampon de la Pwo. Une optimisation de la concentration en sels a donc été effectuée et 3 concentrations différentes ont été testées (1,25mM, 2,5mM, 5 mM). Les résultats sont présentés à la figure 7.3.

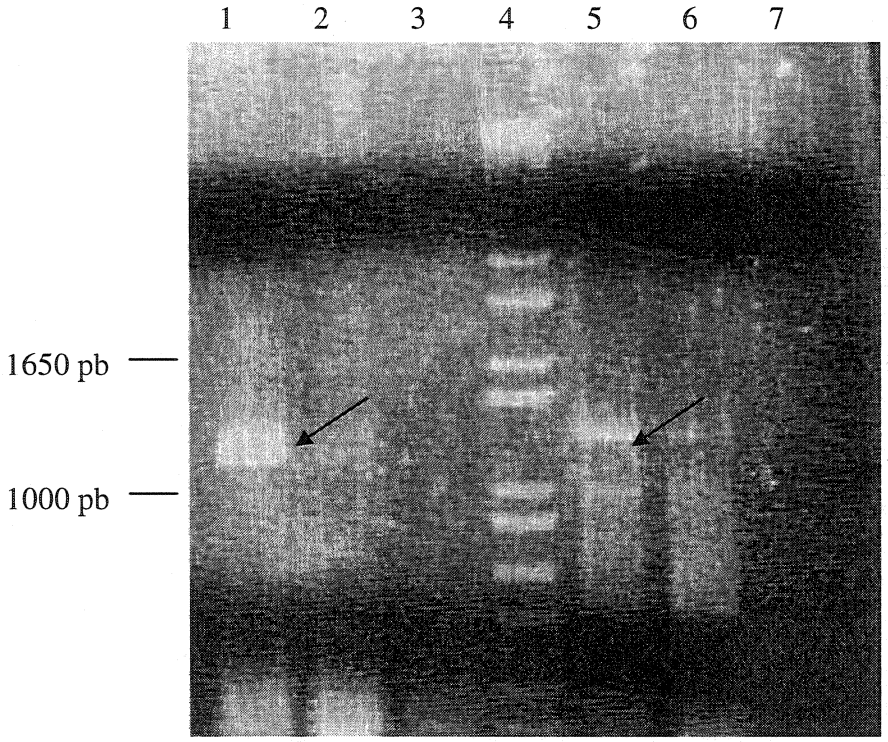


Figure 7.3 Optimisation de la concentration en sels Mg^{2+} pour l'amplification des ADNc des gènes *D4H* et *DAT*
1. PCR *DAT* 1,25mM, 2. PCR *DAT* 2,5 mM, 3. PCR *DAT* 5mM, 4. 1kb ladder, 5. PCR *D4H* 1,25mM, 6. PCR *D4H* 2,5mM, 7. PCR *D4H* 5mM.
Les produits recherchés sont indiquées par des flêches.

Il apparait clairement que la concentration en sels influence fortement l'amplification. Ainsi, la quantité de produit obtenu est inversement proportionnelle à la quantité d'ions Mg^{2+} présente dans la solution réactionnelle. La fixation des amorces sur les séquences cibles est dépendante à la fois de la température et de la concentration en sels. Les essais effectués en abaissant la température d'appariement à 50°C n'ont pas permis une meilleure amplification, contrairement à une modification de la concentration

en ions Mg^{2+}. Le design des amorces nécessite une attention particulière quant à la séquence cible à amplifier. Le contenu en bases (G+C) ainsi que les derniers nucléotides d'appariement doivent être considérés afin d'optimiser la réaction de PCR. Toutefois, le clonage de séquences codantes ne permet pas de choisir la séquence d'appariement des amorces sur le gène car la séquence doit être entière pour pouvoir êttre utilisée. Les régions 5' et 3' des deux ADNc de *DAT* et *D4H* sont très riches en bases faibles (adénine et thymidine). Ces deux bases sont considérées comme faibles par rapport aux bases G et C car leur appariement ne nécessite que deux liaisons hydrogène au lieu de trois. Il peut être ainsi nécessaire de réduire la force ionique du tampon pour favoriser un appariement.

Les gènes *D4H* et *DAT* ont été clonés séparément dans le plasmide pBK. L'addition du promoteur de la strictosidine synthase comme élément contrôlant la transcription a permis d'obtenir les plasmides pBK-str1-dat et pBK-str1-d4h. La figure 7.4 illustre une digestion enzymatique mettant en évidence la présence des différents éléments clonés.

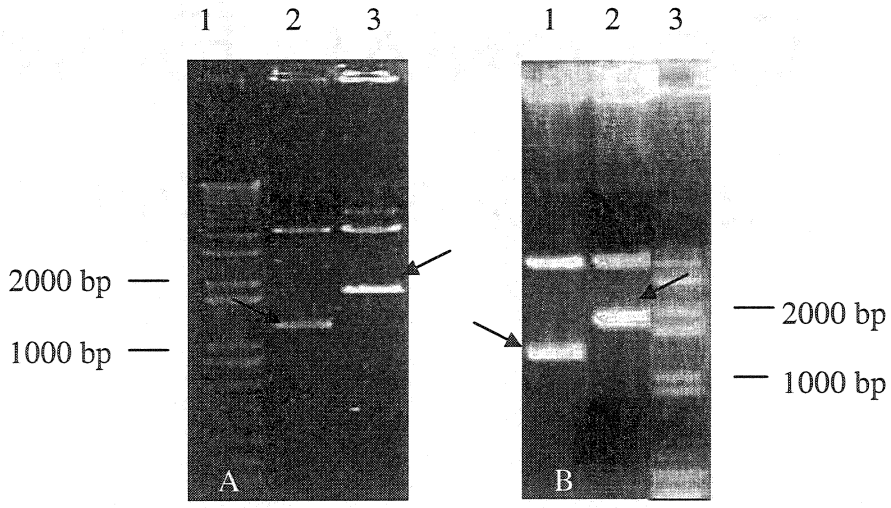


Figure 7.4. Vérification des constructions par digestion enzymatique
A. Digestion de pBK-Str1-dat par : ligne 2 : SalI/BamHI, ligne 3 : BamHI/KpnI, ligne 1 : 1kb ladder
B. Digestion de pBK-Str1-d4h par : ligne 1 : SalI/BamHI, ligne 2 : BamHI/KpnI, ligne 3 : 1kb ladder
Les produits recherchés sont indiquées par des flêches.

Pour la construction pBK-str1-d4h, on retrouve une bande à environ 2000 pb qui correspond à la taille de l'insert Str1 (600 pb) + fragment d4h (1400 pb).

Pour la construction pBK-str1-dat, on retrouve une bande à environ 1900 pb qui correspond à la taille de l'insert Str1 (600 pb) + fragment dat (1320 pb).

La présence du promoteur en série avec le gène correspondant a été vérifiée par PCR en utilisant plusieurs couples d'amorces. Le plasmide pBK-str1-dat est donné en exemple (Figure 7.5). Le couple d'amorces *STR1* (5' et 3') permet d'amplifier un fragment à 600 pb, le couple d'amorces *DAT* (5' et 3') a permis d'amplifier un fragment à 1300 pb environ et l'utilisation de l'amorce 5' de *STR1* et 3' de *DAT* amplifie un fragment à 1900 pb qui correspond à la somme des longueurs des 2 inserts.

Les constructions obtenues renferment les gènes *DAT* et *D4H* impliqués dans le métabolisme de la vindoline, sous le contrôle du promoteur racinaire *STR1* (Figure 7.6).

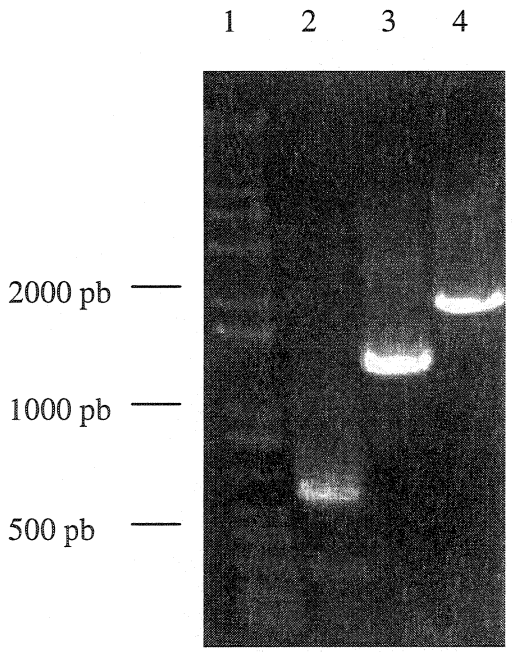


Figure 7.5. Vérification de la construction pBK-str1-dat par PCR
Ligne 1: 1 kb ladder, Ligne 2: PCR avec amorces 5' et 3' de *STR1*, Ligne 3 : PCR avec amorces 5' et 3' de *DAT*, PCR avec amorces 5' de *STR1* et 3' de *DAT*.

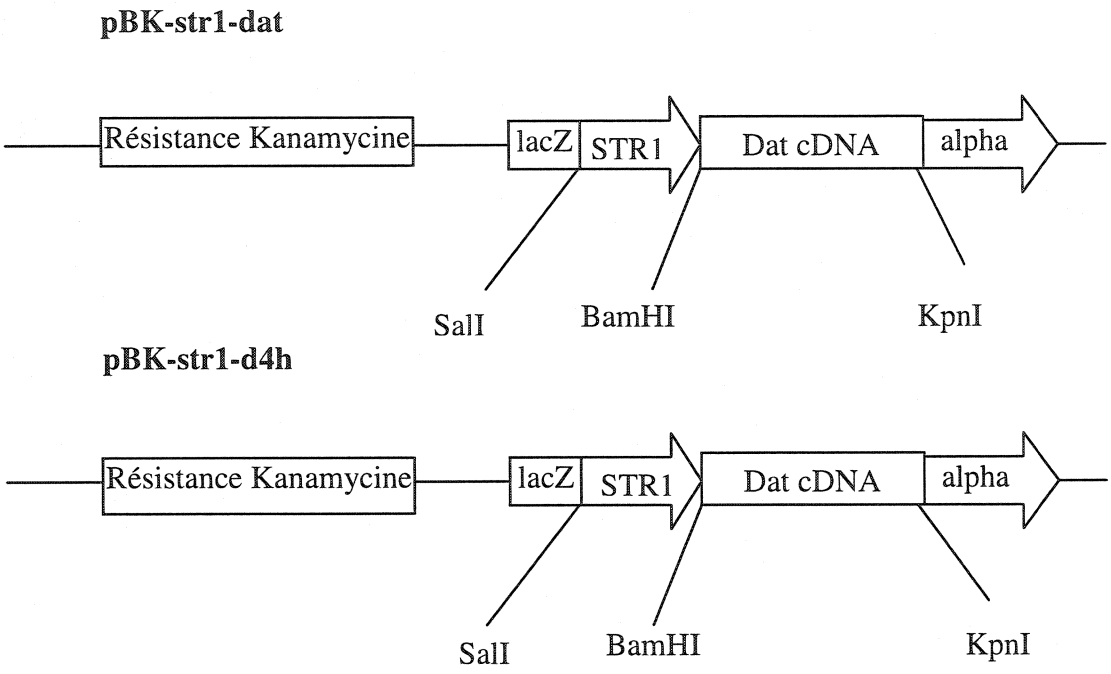


Figure 7.6. Détail des constructions pBK-str1-dat et pBK-str1-D4h.
Les ADNc de *DAT* et *D4H* sous le contrôle du promoteur Str1 sont insérés au milieu du promoteur LacZ alpha bactérien permettant une sélection blanc-bleu des clones positifs.

Afin de vérifier l'intégrité de la construction pCambia1302-str1, une digestion enzymatique du plasmide a été réalisée (Figure 7.7). Cette digestion permet de sortir du vecteur pCambia1302 un fragment de 600 pb dont la taille correspond au promoteur str1.

Le vecteur pCambia-str1 a été partiellement séquencé afin de vérifier que le promoteur était inséré correctement. Les résultats de ce séquençage sont montrés en annexe (figure B.6) et démontrent que le plasmide contient bien le gène de la mGFP5 sous le contrôle direct du promoteur *STR1*. Le schéma de la construction p1302-str1 est indiqué à la figure 7.8.

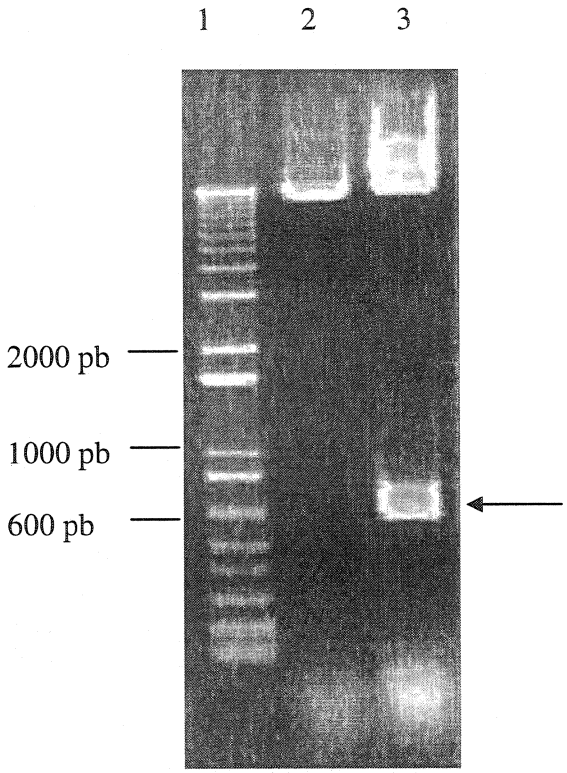


Figure 7.7 Digestion SalI/NcoI de p1302-str1
Ligne 1: 1 kb ladder, ligne 2: digestion SalI de p1302-str1, ligne 3 digestion SalI/NcoI de p1302-str1

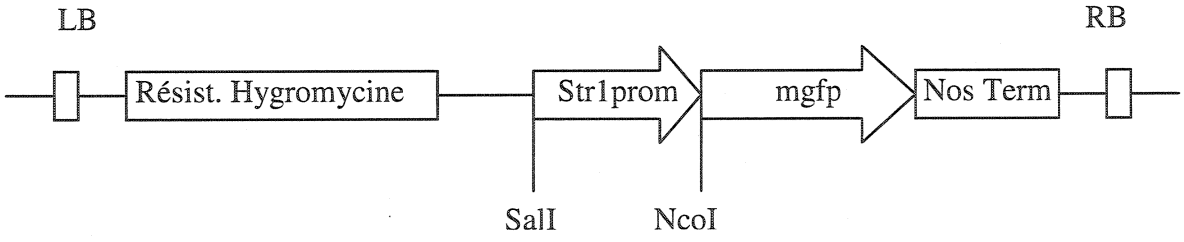


Figure 7.8 Schéma du T-DNA de la construction p1302-Str1

Le plasmide p1302-str1 va être utilisé afin de mettre au point le protocole de transformation qui permettra d'insérer les deux gènes *DAT* et *D4H* sous le contrôle du promoteur *STR1* dans des racines transformées de *C. roseus*.

7.4- Insertion des gènes clonés dans des racines transformées de *C. roseus*

Les cellules végétales sont beaucoup plus difficiles à transfecter que les cellules animales ou microbiennes. La présence d'une paroi pecto-cellulosique rigide rend impossible la transfection par choc thermique ou par surfactant.

On distingue 3 techniques différentes permettant d'insérer un transgène dans une cellule végétale ou dans un tissu. Il s'agit de la transformation de la plante par *Agrobacterium tumesfasciens*, de l'électroporation et de la biolistique.

La transformation par *Agrobacterium* est la méthode la plus utilisée pour insérer un gène dans les plantes dicotylédones (Zupan et al., 2000). Cette bactérie est présente à l'état naturel dans le sol et parasite les plantes en favorisant l'apparition d'une tumeur au niveau de la zone infectée causant la maladie de la galle du collet. Brièvement, la bactérie est capable de transférer une partie de son plasmide Ti (*tumor inducing*) aux cellules adjacentes à un site de blessure de la plante. La partie tranférée est appelée T-DNA (*transfered* DNA). Elle est entourée de deux régions répétées de 25 paires de bases, les régions bordantes. Le T-DNA renferme les gènes codant pour la synthèse d'opines qui sont des dérivés de sucres et d'acides aminés que la plante va synhtétiser mais qui ne vont pouvoir être utilisés que par la bactérie. Le T-DNA contient également des gènes qui vont diriger la synthèse d'auxines et de cytokinines. Ces hormones végétales vont favoriser la multiplication cellulaire au niveau du site d'infection et sont à l'origine du développement de la tumeur végétale. Le plasmide Ti sauvage est très grand (200kb) et donc difficile à manipuler. Le développement de vecteurs binaires (Bevan, 1984) a permis de mettre au point un sytème efficace de tranfert de gène. Dans un tel système, la

bactérie *Agrobacterium* possède un plasmide Ti désarmé. Tout le T-DNA a été enlevé et il ne reste plus que les gènes *vir* qui sont responsables du transfert de gène et de l'intégration au génome de la plante. On introduit alors dans la bactérie un deuxième plasmide, le vecteur binaire, qui lui contient un T-DNA de synthèse comprenant les transgènes à transfecter entourés des régions bordantes répétées. Sous l'action des gènes *vir* présents sur le plasmide Ti désarmé, le T-DNA va être découpé au niveau des régions bordantes puis intégrer au génôme de la plante. Il faut noter que le plasmide supportant le T-DNA recombinant possède une origine de réplication lui permettant d'être amplifié dans la bactérie *E. coli*, ce qui simplifie la synthèse d'une grande quantité de vecteurs. Le principe de la transformation est résumé à la figure 7.9 .

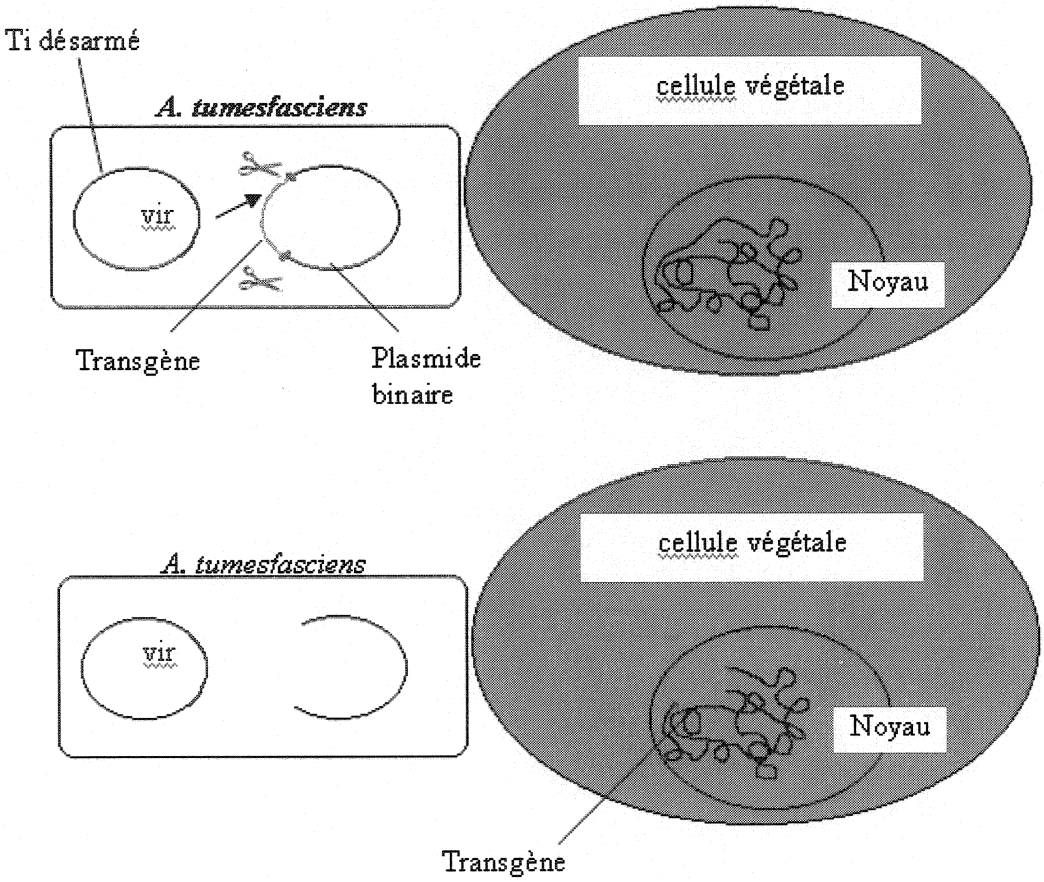


Figure 7.9. Principe de l'insertion d'un transgène par le système binaire *d'A. tumefasciens.*

Lorsque la tranformation est effectuée, il est nécessaire d'enlever les bactéries *A. tumefasciens* de la culture en utilisant un antibiotique. L'association du transgène avec un gène de résistance à un herbicide à l'intérieur du T-DNA permet de sélectionner les cellules qui ont été efficacement tranformées. Ainsi, lors de l'ajout de l'herbicide dans le milieu de culture, seules les cellules qui possèdent le transgène vont pouvoir survivre.

Nous avons donc choisi de transformer les racines de *Catharanthus roseus* en utilisant le système binaire d'*A. tumefasciens*. Le gène utilisé est celui de la GFP sous le contrôle du promoteur str1. Il est situé à l'intérieur du T-DNA du vecteur p1302-str1.

7.4.1- Matériel et méthodes

Amplification de p1302-str1. Le plasmide construit précédemment et amplifié dans la bactérie *E. coli* est ensuite inséré dans la souche LB4404 d'*Agrobacterium tumefasciens*. Cette souche possède un plasmide Ti désarmé contenant les gènes *vir* nécessaires à la transfection. Un microtube d'*A. tumefasciens* est décongelé sur la glace. 100 ng de p1302-str1 sont mélangés à la suspension bactérienne. le transfert est effectué par électroporation (14,6 kV/cm, 1 s). Les bactéries sont ensuite resuspendues dans du milieu LB, incubées pendant 1 h à 30°C puis mises sur milieu LB solide contenant de la kanamycine à 50 µg/mL comme antibiotique de sélection, et incubées pendant 48 h à 30°C. La boite de Pétri contenant les colonies sera ensuite conservée à 4°C.

Transformation des racines. 48 heures avant la transformation, les apex de racines transformées par *A. rhizogenes* de la lignée GAO âgées de 1 mois sont découpés en fragments d'environ 0,5 cm de long. Ces fragments sont placés sur du milieu MS solide + 1 mg/L de NAA + 0,1 mg/L de kinétine à raison de 25 fragments par boite. Une colonie de *A. tumefasciens* LB4404 est mise en culture dans 2 mL de LB + 50 µg/mL de kanamycine pendant 24 h à 37°C. La suspension bactérienne va alors servir à inoculer un flacon contenant 50 mL de milieu LB + 50 µg/mL de kanamycine. Lorsque la densité optique à 600 nm (DO_{600}) de la suspension atteint une valeur de 0,8 unité d'absorbance, les bactéries sont centrifugées pendant 5 minutes à 5000 g puis resuspendues dans du milieu MS afin d'obtenir une DO_{600} de 0,05 unité d'absorbance. Les fragments de racines sont ensuite plongés pendant 1 minute dans la solution d'*Agrobacterium*. Les racines sont ensuite rapidement séchées sur du papier Whatman Numéro 1 (Fisher scientifics, Nepean,

Canada) puis incubées sur milieu MS solide + 1 mg/L de NAA + 0,1 mg/L de kinétine pendant 72 h à 25°C. Des racines plongées pendant 1 minute dans du milieu MS sans bactéries serviront de témoins négatifs.

Sélection des transformants. Afin d'éliminer *Agrobacterium*, les racines sont transférées sur milieu MS solide +1 mg/L de NAA + 0,1 mg/L de kinétine contenant 500 mg/L de céfotaxime (Sigma, Oakville, Canada) et de l'hygromycine à 50 µg/mL (Sigma, Oakville, Canada). L'ajout d'hygromycine dans le milieu a pour objectif de sélectionner les clones positifs. Une partie des racines ne sera pas soumise à l'herbicide et servira de contrôle. Les boites sont incubées pendant 3 semaines à l'obscurité et à 25°C.

7.4.2- Résultats

Les résultats des essais de transformation sont présentés dans le tableau 7.3.

Les racines qui n'ont pas été en contact avec *A. tumefasciens* se sont développées sur tous les milieux dépourvus d'hygromycine, indiquant que l'antibiotique céfotaxime n'avait pas d'effet néfaste sur la croissance racinaire.

De plus, la présence d'hygromycine dans le milieu à une concentration de 50 µg/mL, a tué toutes les racines qui n'ont pas été incubées dans la solution bactérienne. La sélection par herbicide est donc efficace.

Tableau 7.3 Résultats des essais de transformation avec p1302-str1

	Milieu MS + céfotaxime	**Milieu MS + hygromycine**	**Milieu MS + céfotaxime + hygromycine**	**Milieu MS**
Racines + *Agrobacterium*	Disparition du biofilm bactérien. Développement des racines, formation de cals	Mort des racines et développement bactérien	Mort des racines	Développement bactérien intense, faible développement racinaire, mort de la moitié des racines
Racines – *Agrobacterium*	Formation de cals	Mort des racines	Mort des racines	Formation de cals

Après co-cultivation des racines avec *A. tumefasciens*, un important développement bactérien est observé le long des fragments racinaires. La présence d'antibiotique pour éliminer la bactérie est essentielle. En absence d'antibiotique, les bactéries envahissent la racine et provoque sa mort dans 50 % des cas. Les racines qui survivent ne se développent que faiblement. De plus, dès qu'on met ces racines sur un milieu sélectif, on observe une nécrose racinaire, indiquant qu'aucune cellule n'est transformée.

Malgré plusieurs essais effectués afin de trouver les conditions optimales de transfection et de co-cultivation, il n'a pas été possible d'isoler un clone racinaire exprimant une résistance à l'herbicide et ayant donc intégré le transgène. Les paramètres qui ont été modifiés sont: la concentration bactérienne, la durée de co-cultivation, le

milieu utilisé (milieu riche MS ou milieu pauvre M3P3S), la présence d'hormones dans le milieu de culture ainsi que la concentration en hygromycine.

Trés peu de protocoles font référence à l'utilisation de racines comme matériel de base pour l'insertion de gènes par *Agrobacterium tumefasciens*. Ainsi, la plupart des protocoles décrits dans la littérature utilisent des fragments de cotylédons ou des disques découpés dans de jeunes feuilles (Bhalla et Smith, 1998, Wang et To., 2004). Il est néanmoins intéressant de vouloir tranférer des gènes dans des racines déjà transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. En effet, il a été démontré que les racines transformées présentent une forte capacité à produire des métabolites secondaires (Shanks et Morgan, 1999). La modification du métabolisme secondaire par génie génétique permettrait d'utiliser un tissu déjà très productif comme matériel de départ. L'insertion de gènes par *Agrobacterium* permet au transgène de s'intégrer au génôme végétal et donc d'avoir une expression stable et non pas transitoire (comme avec la biolistique ou l'électroporation par exemple). Il existe différentes possibilités pour obtenir des *hairy roots* transgéniques. Le gène d'intérêt peut d'abord être inséré dans les feuilles de la plante par un protocole classique puis la plante obtenue sera ensuite transformée par *A. rhizogenes* afin d'obtenir le phénotype de la maladie du chevelu racinaire. Cette méthode impose un test des nombreux clones obtenus car l'insertion du Ri-T-DNA se fait de façon aléatoire dans le génôme de la plante et la capacité de production en métabolites secondaires diffère grandement d'un clone à l'autre. La deuxième solution consite alors à sélectionner le clone racinaire le plus productif puis à lui transférer le gène d'intérêt. C'est cette stratégie qui a été privilégiée au cours de cette étude. À ce jour, seulement une étude fait référence à un protocole similaire à celui testé au cours de ce projet (Meritt et al., 1999). Les auteurs ont réussi à insérer le gène de la GFP dans des *hairy roots* de *Hyoscyamus muticus* par transformation par *A. tumefasciens*. Une autre technique développée consiste à co-infecter des feuilles avec une souche d'*A .tumefasciens* comportant le transgène et une souche d'*A. rhizogenes* pour le développement du phénotype racines transformées (Torregrosa et Bouquet, 1997 ; Kifle et al., 1999). Cependant, le taux de co-

transformation est faible et il est difficile d'obtenir des racines transformées exprimant le transgène.

7.4.3- Conclusion

Nous n'avons pas été en mesure d'obtenir de transformants exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur *STR1*. Nous n'avons donc pas pu tester l'insertion des gènes *DAT* et *D4H* dans des racines transformées de *C. roseus*. Il se peut que ce clone soit récalcitrant à une double transformation successive par *A. tumefasciens* alors qu'il est déjà transformé par *A. rhizogenes*. Néanmoins, il est nécessaire de tester d'autres techniques de transfert de gènes afin de savoir si l'expression forcée des enzymes D4H et DAT permettrait de lever le blocage métabolique qui intervient dans la voie de biosynthèse de la vindoline dans les cultures *in vitro*.

Chapitre 8 – Discussion générale

Très peu de procédés utilisant des cellules végétales font l'objet d'application industrielle, que ce soit pour la production de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique ou de protéines recombinantes. Néanmoins, la capacité de ce système cellulaire à produire des molécules complexes au niveau structurel dont la synthèse chimique n'est pas économique a été clairement démontrée. Au même titre que les cellules de mammifères ou les microorganismes, les connaissances en culture cellulaire ont permis de développer des systèmes de culture *in vitro* en bioréacteur permettant d'atteindre une haute densité de biomasse végétale (Jolicoeur et al., 1992, Yokoi et al., 1993, Schlatmann et al., 1997). Les caractéristiques critiques tels que la viscosité de la suspension et la sensibilité au cisaillement ont requis le développement de nouveaux procédés (Kieran et al., 1997). D'un point de vue technique il est donc envisageable d'utiliser ces « usines à molécules » à grande échelle. Cependant, les principaux inconvénients sont d'ordre économique et font état de la faible productivité des cellules pour les composés d'intérêts ainsi que du manque de reproductibilité entre chaque culture (Verpoorte et al., 2002).

Plusieurs stratégies ont été mises en place afin d'augmenter la productivité en métabolites secondaires : élicitation (Rijhwani et Shanks 1998, Zhao et al., 2001b) modification du métabolisme par génie génétique (Canel et al., 1998, Lessard et al., 2002), ou extraction du produit en continu pour lever un éventuel rétrocontrôle négatif du produit final (Tikhomiroff et al., 2002, Lee-Parsons et Shuler, 2002, Klvana et al., sous presse). Dans tous les cas, il est indispensable de connaître de façon la plus détaillée possible l'ensemble des voies métaboliques menant au composé d'intérêt ainsi que tous les composés intermédiaires. La diversité du monde végétal impose par sa nature une très importante capacité de production quant à la quantité de molécules différentes pouvant être synthétisées. Très peu de ces voies métaboliques sont entièrement connues et l'oubli d'une seule réaction dans une voie de biosynthèse peut limiter tous les efforts

d'optimisation de flux. En effet, prenons l'exemple de la tabersonine, qui est un intermédiaire dans la production de l'alcaloïde indole vinblastine dans *Catharanthus roseus*. Cette molécule représente une cible pour l'optimisation métabolique car elle est à l'origine de la voie de synthèse de la vindoline, précurseur direct de la vinblastine. Il serait tentant d'augmenter la production de tabersonine pour augmenter le flux vers la vindoline. À l'aide de l'analyse d'un extrait racinaire de *C. roseus* par LC/MS, nous avons mis en évidence la présence de composés dérivés de la tabersonine. Cependant, ces molécules, identifiées par leur masse moléculaire comme étant la löchnericine et la hörammericine, ne participent pas à la synthèse de vindoline (Morgan et Shanks, 1999). D'autres molécules présentant un spectre d'absorption UV similaire à la tabersonine ont été détectées. Malgré la détermination de la masse moléculaire de ces composés, il est impossible de les identifier car plusieurs composés présentent la même masse. Il est alors nécessaire de les purifier afin de les analyser par RMN. Ainsi, nous avons mis au point une méthode HPLC semi-préparative qui nous a permis de purifier ces composés inconnus. Cependant, malgré l'accumulation de plusieurs fractions, leur concentration respective est demeurée insuffisante pour une détermination du spectre RMN de ces molécules dans les conditions d'analyse disponibles au laboratoire. Il sera donc indispensable de mettre en oeuvre un système de production dont l'objectif serait de fournir une biomasse suffisante pour servir de matière première au procédé de purification.

L'identification des composés indéterminés permettrait de déterminer s'il existe, dans les lignées racinaires ou dans la culture en suspension qui en a été dérivée, des molécules intermédiaires entre la tabersonine et la vindoline. En effet, bien que la tabersonine soit présente dans toutes les cultures *in vitro* contrairement à la vindoline, aucune étude n'a précisément démontré à laquelle des six étapes requises s'effectue le blocage métabolique. Il ne semble pas s'agir d'une étape limitante dont le flux est très réduit mais plutôt d'un blocage complet puisque aucune trace de vindoline n'a été observée (Moreno et al., 1995, Verpoorte et al, 1999). Une fois les réactions limitantes

clairement identifiées, il sera alors possible d'intervenir par modification génétique pour tenter de rétablir l'ensemble de cette voie et de permettre la synthèse *in vitro* de vindoline et pourquoi pas par la suite, de vinblastine.

Au cours de ce projet, nous avons mis en place un moyen favorisant l'expression des enzymes clefs impliquées dans les deux dernières étapes de synthèse de la vindoline : la DAT et la D4H. Pour ce faire des constructions génétiques ont été réalisées. Les ADNc de ces deux enzymes ont été mis sous le contrôle transcritpionnel du promoteur de la strictosidine synthase (STR1), qui actif et inductible dans les racines. Afin d'établir un protocole de transfection permettant l'insertion stable de ces constructions dans des racines transformées de *C. roseus*, une autre construction modèle a été réalisée en utilisant le gène rapporteur de la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du promoteur *STR1*. Une méthode de transfection par *Agrobacterium tumefasciens* en utilisant un plasmide binaire a été testée puisque cette technique permet une insertion stable du transgène au génome végétal et donc un maintient du transgène dans les cellules filles. Cependant, malgré la modification de plusieurs paramètres pouvant influencer la transfection, aucune insertion du T-DNA recombinant n'a été observée. Bien que cette stratégie se soit révélée efficace pour une autre espèce végétale, il est possible que la transformation par un plasmide binaire de *A. tumefasciens* de racines de *C. roseus* déjà transformées par la plasmide sauvage *A. rhizogenes* ne soit pas envisageable. En effet, la présence et l'expression du Ri-T-DNA sauvage pourrait inhiber les mécanismes d'intégration du plasmide recombinant. Du moins, si cette transfection est possible, elle nécessite des conditions particulières qui restent à établir. Comme nous avons voulu tester si le rétablissement de l'activité des deux enzymes D4H et DAT a un effet sur le déblocage de la synthèse de vindoline, une expression transitoire de ces enzymes pourrait s'avérer suffisante. Il est alors envisageable d'utiliser la technique de biolistique ou bombardement de particules. Il s'agit de précipiter l'ADN à transfecter sur des particules d'or ou de tungstène puis de bombarder les tissus à l'aide d'un jet d'air comprimé. Les particules vont alors perforer les membranes puis l'ADN va se solubiliser dans le noyau

cellulaire. Cette méthode a été souvent utilisée pour transfecter des espèces récalcitrantes à la transformation par *Agrobacterium* (Lessard et al., 2002). Plusieurs protocoles de transfection de *C. roseus* par bombardement de particules sont disponibles dans la littérature (Van der Fits et Memelink, 1997, Hilliou et al., 1999, Zárate et al., 1999). Cependant, cette technique nécessite une sélection par antibiotiques des cellules transformées. Une régénération de la plante entière à partir de ces cellules permettrait d'obtenir un organisme génétiquement modifié complet. Une récente étude (Choi et al., 2004) expose un protocole permettant la régénération de plantes entières de *C. roseus* à partir de racines transformées. Il est donc envisageable d'insérer les transgènes dans nos racines transformées par biolistique puis de régénérer différents systèmes de culture (racines transformées, cals, cellules en suspension et plante entière) afin de vérifier l'impact de l'expression de la D4H et la DAT dans ces cultures.

Le développement d'un procédé de culture n'est pas seulement limité par la faible productivité des cellules végétales. Il est aussi nécessaire de caractériser et de documenter chaque culture avec le plus de précision et de rapidité possible. Idéalement, l'ensemble des paramètres de culture devrait pouvoir être estimé en continu en temps réel. Outre les paramètres environnementaux qui peuvent être facilement estimés dans les cultures en bioréacteur (pH, O_2, température, conductivité, capacitance...) le suivi de la croissance et de la production est nécessaire et plus délicat à mettre en place. En effet, il est indispensable de mettre au point des outils permettant des mesures rapides et non-destructrices pour analyser ces paramètres. Au cours de ce projet, nous avons testé l'utilisation d'une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde pour le suivi de la production d'alcaloïdes, d'une protéine recombinante et de la croissance ou de l'activité métabolique de différents types cellulaires. Ainsi, il a été démontré qu'il est possible d'identifier plusieurs marqueurs endogènes autofluorescents pouvant servir de véritables témoins du comportement de la culture. La mesure du NAD(P)H a été souvent utilisée pour estimer la croissance de bactéries ou de levures. Nous avons vu que ce signal était effectivement corrélé à la biomasse pendant la phase de croissance exponentielle de la

levure *Pichia pastoris*, mais qu'il dérivait par la suite pendant la phase de production de GFP suite à un changement de la source de carbone. Pour qu'il soit utilisable pour une estimation précise de la biomasse, le contenu en NAD(P)H intracellulaire doit être stable. C'est le cas en phase exponentielle de croissance lorsque celle-ci est importante et qu'il n'y pas de perturbation du métabolisme. Ainsi, pour la culture de cellules de *C. roseus* en bioréacteur, ce signal peut être utilisé pour le suivi de la croissance. Cependant, une modification des conditions de culture telle que : une fluctuation importante du niveau d'oxygène, l'éliciation des cellules ou un changement dans le métabolisme suite à l'ajout d'une nouvelle source de carbone rompt le régime établi. Pour les cellules d'*Eschscholtzia californica* cultivées en flacons, le signal de NAD(P)H augmenta brusquement entre le jour 0 et le jour 2. Le choc d'inoculation a sans doute provoqué un stress des cellules qui sont passées d'un milieu épuisé en nutriment à un milieu frais. La concentration intracellulaire en NAD(P)H sembla se stabiliser par la suite. Cependant, l'introduction d'une perturbation telle que l'élicitation par la chitine fait chuter le signal de NAD(P)H. Cette baisse a pu être causée par l'augmentation de la synthèse d'alcaloïdes qui implique des réactions consommant des molécules de NADPH (Wink, 1999). Comme il est impossible de différencier NADH et NADPH car ils possèdent un spectre de fluorescence similaire, cette hypothèse nécessite d'être confirmée par d'autres techniques analytiques comme le suivi spécifique du NADPH par RMN. Le signal de NAD(P)H est donc plus un rapporteur de l'activité métabolique des cellules qu'un témoin rigoureux de la croissance. Pour les cellules NSO, le suivi du NAD(P)H n'a pas pu être fait *in situ* à cause de l'interférence d'autres composés présents dans le milieu de culture, tels que le rouge phénol utilisé comme indicateur de pH. Néanmoins, l'analyse hors-ligne du contenu intracellulaire par la méthode de réduction des sels de tétrazolium révèla que le niveau de NAD(P)H dans les cellules était stable pendant la phase de croissance. La concentration globale en NAD(P)H par litre de milieu était donc corrélée avec le nombre de cellules viables. De plus, la concentration spécifique en NAD(P)H diminua quelques heures avant la chute de viabilité. Elle pourrait donc servir de signal précurseur métabolique et permettre d'anticiper la mortalité cellulaire, observation décisive pour

déterminer l'arrêt de la culture. Pour qu'il soit analysable *in situ* dans une culture de cellules animales, le signal de NAD(P)H doit être suffisamment élevé par rapport au bruit de fond. Cela implique de diminuer le bruit de fond provoqué par la présence de diverses substances dans les milieux non-définis et enrichis en sérum. L'autofluorescence du milieu doit être réduite au minimum par l'utilisation de milieux définis sans sérum et sans indicateurs colorés (tel que le rouge phénol fréquemment utilisé comme indicateur de pH). La validité de ce signal nécessitera également la détermination du seuil de détection et donc la densité cellulaire minimale permettant une quantification précise. La présence de sérum interfère aussi fortement avec la mesure du signal de fluorescence du tryptophane (Ex 270nm/ Em 370nm). Ce signal est également corrélé à la biomasse pour la culture de *Pichia pastoris*. Pour vérifier son utilité sur une culture de cellules animales, il est indispensable de supprimer le sérum de la culture car il contient une grande quantité de protéines renfermant des résidus de tryptophane. Cependant, les milieux sans sérum pour hybridomes nécessitent l'ajout d'albumine. Il reste à vérifier si celle-ci n'interférerait pas autant que le sérum avec la mesure du tryptophane. Le cas échéant, la consommation globale du tryptophane par les cellules pourrait alors être rapportée au suivi de la biomasse.

Le signal du tryptophane a également été suivi dans les cultures de cellules végétales. Dans ce cas, contrairement aux cellules animales et aux levures, le suivi de cet acide aminé pourrait être un témoin de la production d'alcaloïdes. En effet, le noyau indole de tous les alcaloïdes de *C. roseus* provient du tryptophane qui est transformé en tryptamine. Ces deux molécules ne diffèrent sur le plan structural que par un groupement carboxyl absent sur la tryptamine et possèdent donc un spectre de fluorescence identique. Il n'est donc pas possible de les différencier en culture. Cependant, la synthèse de tryptamine augmenta fortement après élicitation des cellules à l'acide jasmonique et cette induction était clairement visible sur les enregistrements de fluorescence. Le niveau d'induction du métabolisme secondaire peut donc être suivi par ce signal. Les alcaloïdes ajmalicine et serpentine sont autofluorescents et pourraient donc être suivis à l'intérieur

de la culture. Bien que ces molécules soient présentes dans la lignée racinaire à l'origine des cellules en suspension, elles se situent à des concentrations inférieures au seuil de détection dans nos cultures en bioréacteur. Une expérience réalisée sur des racines transformées a démontré que la serpentine pouvait être détectable sur la matrice de fluorescence car elle possède un spectre très spécifique (Figure C.1 et C.2 en annexe). Cependant, la culture de racines transformées ne se prête pas bien à une estimation *in situ* du contenu intracellulaire car il s'agit d'un système de culture hétérogène. La densité racinaire est très différente d'une zone à l'autre du système de culture et comme il s'agit d'un tissu différencié, plusieurs types cellulaires se côtoient en culture et n'ont potentiellement pas la même capacité de production. Plusieurs lignées de cellules en suspension peuvent, selon la littérature, produire de la serpentine et de l'ajmalicine (Knobloch et Berlin, 1980, Scragg et al., 1989, Zhao et al., 2001d). Le développement d'une telle lignée permettrait d'obtenir la matière première pour un suivi plus poussée du métabolisme secondaire par fluorescence. La sonde à fluorescence multi-longueurs d'ondes se révèle donc un outil très intéressant pour le suivi des cultures en bioréacteur. De part sa capacité à balayer un spectre d'excitation et d'émission en un temps très court, plusieurs composés peuvent être analysés simultanément. Ainsi, nous avons démontré que la production d'une protéine fluorescente, la GFP, souvent utilisée comme protéine rapporteur, peut être suivie de façon précise *in situ* dans une culture de levures et dans une culture de cellules animales en plus des autres fluorophores endogènes déjà énumérés. En essayant d'exprimer la GFP dans des cellules de *C. roseus*, nous avons voulu démontrer que ce pouvait être également le cas dans une culture de cellules végétales. Trés récemment, Su et al. (2004) ont démontré que la sécrétion de GFP dans le milieu par des cellules de tabac pouvait être suivie en continu par une sonde monochromatique mesurant le signal à 515 nm après une excitation à 470 nm. Ce résultat permet d'envisager le suivi de la production de protéines recombinantes fusionnées avec la GFP par un site de clivage. Le fluorophore contenu dans la GFP permettrait le suivi quantitatif en continu de la protéine d'intérêt. La présence d'un site de clivage permettrait par digestion enzymatique de supprimer la partie GFP indésirable pour les applications

ultérieures de la protéine d'intérêt. La production de protéines recombinantes par des cellules végétales est fortement envisagée depuis plusieurs années, et les seules applications commerciales ont été enregistrées dans des des cultures de plantes entières (comme la trypsine produite dans le maïs par exemple). Un des principaux problèmes est la récupération de la protéine d'intérêt. Si celle-ci est intracellulaire, plusieurs étapes de lyse et de purification sont nécessaires, ce qui représente la majeure partie du coût de production. Même si la protéine est excrétée dans le milieu, il est difficile de séparer le milieu des cellules végétales dans un procédé en continu à cause de leur hétérogénéité et de la présence d'aggrégats. L'utilisation de racines transformées comme biomasse pour la production de protéines recombinantes est intéressante. En effet, le milieu peut efficacement être recirculé à travers le lit racinaire et donc être isolé de la biomasse. Plusieurs essais ont démontré que des protéines recombinantes peuvent être excrétées dans le milieu de culture (Wongsamuth et Doran, 1997, Gaume et al., 2003). Le milieu de culture recirculé pourrait alors être observé par la sonde à fluorescence avant et après le passage à travers une colonne contenant une phase solide d'adsorption des protéines. Ceci permettrait de déterminer efficacement la quantité de protéines produites ainsi que le niveau de protéines retenues par la phase solide. La saturation de la phase adsorbante pourrait facilement être déterminée en temps réel et le changement de colonne pourrait se faire immédiatement afin de conserver une capacité d'extraction suffisante. Un tel système adapté à la production de métabolites secondaires autofluorescents est actuellement en développement au sein de l'unité de recherche.

Chapitre 9 – Conclusion et recommandations

Au cours de ces travaux sur le métabolisme secondaire, une lignée cellulaire de *Catharanthus roseus* a été développée à partir de racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. La présence d'auxines et de cytokinines dans le milieu de culture est indispensable pour prévenir la différentiation cellulaire. Bien que disposant du même patrimoine génétique, la production de métabolites secondaires diffère dans les cellules en suspension par rapport à la culture racinaire. En absence d'éliciteur, le niveau de production d'alcaloides demeure très faible. Cependant, l'ajout d'acide jasmonique stimule fortement la production qui débute 24 heures après l'addition de l'éliciteur. L'adaptation d'un bioréacteur pour la culture de cellules animales et végétales a permis de cultiver cette lignée en bioréacteur. L'activité métabolique et la production d'alcaloïdes ont été suivies *in situ* par une sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde. Le signal correspondant au NAD(P)H permet un bon suivi de la biomasse avant l'élicitation. Cependant, l'ajout d'acide jasmonique provoque la production d'un alcaloïde indéterminé qui fluoresce aux mêmes longueurs d'onde que le NAD(P)H et masque donc ce signal. Le tryptophane et la tryptamine, deux précurseurs des alcaloides indoles, possèdent le même spectre de fluorescence et ne peuvent donc pas être différenciés. Toutefois la tryptamine est 3 fois plus fluorescente que le tryptophane et elle est présente en quantité neuf fois plus importante. Le signal émis à 370 nm pour une excitation à 270 nm est ainsi principalement dû à la présence de tryptamine dans la culture. Il est donc possible de suivre en temps réel la production de ce précurseur avec la sonde. Des essais de calibration ont démontré que l'ajmalicine et la serpentine peuvent être également quantifiées *in situ* par le sytème proposé. Cependant, ces deux alcaloides ne sont étrangement pas présents dans la lignée cellulaire alors qu'ils sont produits par la lignée racinaire d'origine. La présence d'hormones dans le milieu de culture pourrait être la cause de ce phénomène.

La polyvalence du montage a permis de réaliser des cultures de levures et de cellules de mammifères au sein du même réacteur en modifiant légèrement la configuration. Le métabolisme et la production de GFP ont été suivis par fluorescence. Plusieurs fluorophores endogènes peuvent être utilisés pour suivre l'évolution de la biomasse pendant la phase de croissance de *Pichia pastoris*, soit le tryptophane, le NAD(P)H ou les riboflavines. Après induction, la synthèse de GFP est observable de façon quantitative. Les signaux de NAD(P)H et de tryptophane divergent alors que la biomasse reste stable en phase de production. Le signal correspondant aux fluorophores cités précédemment ne permet pas de suivre l'évolution de la biomasse de la culture de cellules NSO. En effet, une importante interférence est créée par les composés du milieu, en particulier les protéines présentes dans le sérum, les vitamines et le rouge phénol utilisé classiquement comme indicateur coloré. Il serait nécessaire d'utiliser un milieu défini sans sérum en minimisant la présence de composés autofluorescents afin de permettre une mesure des fluorophores cellulaires. Malgré les interférences du milieu utilisé, la synthèse de GFP, à titre de protéine recombinante modèle, a pu être suivie de façon quantitative et corrélée à des analyses hors-ligne. L'utilisation d'une sonde à fluorescence multi-longueurs d'ondes permet donc de suivre la production d'alcaloides dans des cultures de *Catharanthus roseus*, d'*Eschscholtzia californica* ainsi que la synthèse de GFP dans des cellules de levures et des cellules de mammifères. La fusion d'une protéine d'inétrêt avec la GFP permettrait de suivre la biosynthèse en temps réel et d'optimiser les conditions de production ainsi que le moment de la récolte.

Une méthode HPLC a été adaptée pour l'analyse d'un extrait racinaire par LC/MS. Même si plusieurs alcaloïdes jusque là indéterminés dans la méthode de référence ont pu être identifiés, la présence de plusieurs composés de même masse moléculaire a limité leur identification. Il a ainsi fallu mettre en place une méthode semi-préparative qui a permis de récolter 7 fractions pures. Ces fractions ont ensuite été analysées par RMN. Cependant, la concentration trop faible de ces composés a empêché une identification rigoureuse de leur spectre RMN. Il serait donc nécessaire d'utiliser la

méthode semi-préparative développée pour purifer de plus grandes quantités d'alcaloides. Ceci permettrait non seulement d'identifier les composés inconnus mais également de produire des fractions quantifiables par gravimétrie et pouvant alors servir de standards de référence, ces composés n'étant pas disponibles dans le commerce. Plusieurs des molécules non-identifiées (T1, T2, T3 et T4) possèdent une spectre UV similaire à celui de la tabersonine, un précurseur de la vindoline. Il s'agit donc vraisemblablement de dérivés de ce composé. Leur identification pourrait permettre de déterminer où s'effectue le blocage métabolique *in vitro* dans la voie de synthèse de la vindoline.

La modification du métabolisme secondaire de *C. roseus* a été tentée dans l'intention de débloquer la voie de synthèse de la vindoline. Pour ce faire, les gènes codant pour deux enzymes (DAT et D4H) impliquées dans sa biosynthèse au niveau de la plante entière ont été isolés à partir d'ARN messagers de feuilles puis placés sous le contrôle du promoteur de la strictosidine synthase. Afin de mettre au point un protocole de transfection par *Agrobacterium tumefasciens* permettant d'insérer ces gènes, une construction génétique contenant le gène de la GFP sous le contôle du promoteur *STR 1* a été réalisée. Malgré tous les essais d'optimisation, il n'a pas été possible d'intégrer ce gène au génome des racines transfromées de *C. roseus*. Il serait alors souhaitable d'utiliser une autre méthode de transfection telle que la biolistique pour insérer les gènes d'intérêt dans les racines afin de vérifier si l'expression de la D4H et la DAT suffit à lever le blocage de la synthèse de vindoline. La présence de vindoline dans des cultures permettrait alors d'envisager la production des anticancéreux vinblastine et vincristine par des techniques *in vitro*. Il s'agit sans doute d'un des grands défis actuels du génie métabolique appliqué à biotechnologie végétale.

Bibliographie

AHMAD, N., GUPTA, S., HUSAIN, M.M., HEISKANEN, K.M., MUKHTAR, H. 2000. "Differential Antiproliferative and Apoptotic Response of Sanguinarine for Cancer Cells Versus Normal Cells". *Clinical Cancer Research.* 6 :4. 1524-1528.

ALBANO, C.R., RANDERS-EICHHORN, L., BENTLEY, W.E., RAO, G. 1998. "Green Fluorescent Protein as a Real Time Quantitative Reporter of Heterologous Protein Production". *Biotechnology Progress.* 14:2. 351-354.

AMSELEM, J., TEPFER, M. 1992. "Molecular-Basis for Novel Root Phenotypes Induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 on Cucumber". *Plant Molecular Biology.* 19:3. 421-432.

ASALI, E.C., MUTHARASAN, R., HUMPHREY, A.E. 1992. "Use of NAD(P)H-Fluorescence for Monitoring the Response of Starved Cells of *Catharanthus roseus* in Suspension to Metabolic Perturbations". *Journal of Biotechnology.* 23:1. 83-94.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. et al. 1987. *Current protocols in molecular biology.* Brooklyn, N. Y. Greene Publishing Associates .

BAIZA, A.M., QUIROZ-MORENO, A., RUIZ, J.A., LOYOLA-VARGAS, V.M. 1999. "Genetic Stability of Hairy Root Cultures of *Datura stramonium*". *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 59:1. 9-17.

BALANDRIN, M. J., KLOCKE, J.A. "Medicinal, aromatic and industrial material from plants". *Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plants.* Sous la direction de Y.P.S. Bajaj. 1988 : Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1-36.

BALSEVICH, J., DE LUCA, V., KURZ, W.G.W. 1986. "Altered alkaloid pattern in dark-grown seedling of *Catharanthus roseus*. The isolation and characterization of 4-desacetoxyvindoline : a novel indole alkaloid and proposed precursor of vindoline". *Heterocycles*. 24:2415-2421.

BECARD, G., FORTIN, J.A. 1988. "Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots". *New Phytology*. 108:211-218.

BERLIN, J., FORCHE, E., WRAY, V., HAMMER, J., HOSEL, W. 1983. "Formation of benzophenanthiridinealkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*". *Zeitung Naturforschung*. 38:346-352.

BERLIN, J., RUGENHAGEN, C., GREIDZIAK, N., KUZOVKINA, I.N., WITTE, L., WRAY, V. 1993. "Hairy Root Cultures of *Peganum harmala* .3. Biosynthesis of Serotonin and Beta-Carboline Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Peganum harmala*". *Phytochemistry*. 33:3. 593-597.

BERNOFSKY, C., SWAN, M. 1973. "An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide". *Analytical Biochemistry*. 53:2. 452-8.

BEVAN, M. 1984. "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation". *Nucleic Acids Research*. 12:22. 8711-8721.

BHADRA, R., VANI, S., SHANKS, J.V. 1993. "Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*". *Biotechnology and Bioengineering*. 41:5. 581-592.

BHALLA, P.L., SMITH, N. 1998. "*Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Cauliflower, *Brassica oleracea Var. botrytis*". *Molecular Breeding*. 4:6. 531-541.

BI, X.J., WIRTH, M., BEER, C., KIM, E.J., GU, M.B. , ZENG, A.P. 2002. "Dynamic Characterization of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells Containing an Inducible C-Fos Promoter GFP Expression System as a Biomarker". *Journal of Biotechnology*. 93:3. 231-242.

BIONDI, S., LENZI, C., BARALDI, R., BAGNI, N. 1997. "Hormonal Effects on Growth and Morphology of Normal and Hairy Roots of *Hyoscyamus muticus*". *Journal of Plant Growth Regulation*. 16:3. 159-167.

BOUCHARD-MARCHAND, E. 2000. *Études biocinétiques et nutritionnelles de racines transformées de carotte en culture in vitro.* École Polytechnique de Montréal, département de génie chimique.

BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E. 2001. "Production of Plant Secondary Metabolites: a Historical Perspective". *Plant Science*. 161:5. 839-851.

CACACE, S., SCHRODER, G., WEHINGER, E., STRACK, D., SCHMIDT, J., SCHRODER, J. 2003. "A Flavonol O-Methyltransferase From *Catharanthus roseus* Performing Two Sequential Methylations". *Phytochemistry*. 62:2. 127-137.

CANEL, C., LOPES-CARDOSO, M.I., WHITMER, S., VAN DER FITS, L., PASQUALI, G., VAN DER HEIJDEN, R. et al. 1998. "Effects of Over-Expression of Strictosidine Synthase and Tryptophan Decarboxylase on Alkaloid Production by Cell Cultures of *Catharanthus roseus*". *Planta*. 205:3. 414-419.

CAPORALE, L.H. 1995. "Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry". *Proceeding of the National Academu of Science Of the United States of America* . 92:1. 75-82.

CEREGHINO, J.L., CREGG, J.M. 2000. "Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*". *FEMS Microbiology Reviews*. 24:1. 45-66.

CHA, H.J., WU, C.F., VALDES, J.J., RAO, G., BENTLEY, W.E. 2000. "Observations of Green Fluorescent Protein as a Fusion Partner in Genetically Engineered *Escherichia coli*: Monitoring Protein Expression and Solubility". *Biotechnology and Bioengineering*. 67:5. 565-574.

CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W., PRASHER, D.C. 1994. "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression". *Science*. 263:5148. 802-805.

CHOI, B.K., JIMENEZ-FLORES, R. 2001. "Expression and purification of glycosylated bovine beta-casein (L70S/P71S) in *Pichia pastoris*". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49:4. 1761-6.

CHOI, K.B., MORISHIGE, T., SHITAN, N., YAZAKI, K., SATO, F. 2002. "Molecular Cloning and Characterization of Coclaurine *N*-Methyltransferase from Cultured Cells of *Coptis japonica*", *Journal of Biological Chemistry*. 277 : 830-835

CHOI, P.S., KIM, Y.D., CHOI, K.M., CHUNG, H.J., CHOI, D.W., LIU, J.R. 2004. "Plant Regeneration From Hairy-Root Cultures Transformed by Infection With *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*". *Plant Cell Reports*. 22:11. 828-831.

CHRISTEN, A.A., BLAND, J., GIBSON, G.M. 1989. "Cell cultures as a means to produce taxol". *Proceeding of the American Association for Cancer Research*. 30:566.

CONSTABEL, F., RAMBOLD, S., CHATSON, K.B., KURZ, W.G.W. 1981. "Alkaloid production in *Catharantus roseus* (L) G. Don. VI. Variation in alkaloid spectra of cell lines derived from one single leaf". *Plant Cell Reports*. 1:3-5.

CREGG, J.M., HIGGINS, D.R. 1995. "Production of Foreign Proteins in the Yeast *Pichia pastoris*". *Canadian Journal of Botany-Revue canadienne de botanique*. 73:S891-S897.

DALY, A.E., GILAR, M., KELE, M., NEUE, U.D., DOURDEVILLE, T., GEBLER, J. 2003. The implication of column peak capacity and selectivity on the muli-dimensional LC-MS analysis of complex peptide mixture. In *http://www.waters.com/watersdivision/pdfs/WA31765.pdf*. [En ligne]. (Page consultée le 1er Juillet 2004)

DANIELL, H., STREATFIELD, S.J., WYCOFF, K. 2001. "Medical Molecular Farming: Production of Antibodies, Biopharmaceuticals and Edible Vaccines in Plants". *Trends in Plant Science*. 6:5. 219-226.

DE-EKNAMKUL, D., ELLIS, B.E. 1985. "Effects of macronutriments on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*". *Plant cell reports*. 4:46-49.

DE LUCA, V., ALVAREZ-FERNANDEZ, J., CAMPBELL, D. , KURZ, W.G.W. 1988. "Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharantus roseus*". *Plant physiology*. 86:447-450.

DE LUCA, V., LAFLAMME, P. 2001. "The Expanding Universe of Alkaloid Biosynthesis". *Current Opinion in Plant Biology*. 4:3. 225-233.

DE LUCA, V., MARINEAU, C., BRISSON, N. 1989. "Molecular-Cloning and Analysis of Cdna-Encoding a Plant Tryptophan Decarboxylase - Comparison With Animal Dopa Decarboxylases". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:8. 2582-2586.

DE LUCA, V., ST PIERRE, B. 2000. "The Cell and Developmental Biology of Alkaloid Biosynthesis". *Trends in Plant Science*. 5:4. 168-173.

DECAROLIS, E., CHAN, F., BALSEVICH, J., DELUCA, V. 1990. "Isolation and Characterization of a 2-Oxoglutarate Dependent Dioxygenase Involved in the 2nd-to-Last Step in Vindoline Biosynthesis". *Plant Physiology*. 94:3. 1323-1329.

DELISA, M.P., LI, J.C., RAO, G., WEIGAND, W.A., BENTLEY, W.E. 1999. "Monitoring GFP-Operon Fusion Protein Expression During High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli* Using an on-Line Optical Sensor". *Biotechnology and Bioengineering*. 65:1. 54-64.

DORAN, P. 1997. *Hairy roots, Culture and Applications*. Amsterdam : Harwood Academic Publishers.

DORAN, P.M. 1993. "Design of reactors for plant cell and organs". *Advances Biochemical Engineering Biotechnology*. 48:117-168.

DORAN, P.M. 2000. "Foreign Protein Production in Plant Tissue Cultures". *Current Opinion in Biotechnology*. 11:2. 199-204.

DUBUIS, B., KUT, O.M., PRENOSIL, J.E. 1995. "Pilot-Scale Culture of *Coffea arabica* in a Novel Loop Fluidised Bed Reactor". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 43:2. 171-183.

DUNLOP, D.S., CURTIS, W.R. 1991. "Synergistic response of plant hairy -root cultures to phosphate limitation and fungal elicitation". *Biotechnology progress* . 7:434-438.

DYMOV, S.I., VITAVSKAYA, A.V., DEMETSKAYA, A.V., KOSTENYUK, I.A. 1997. "The Effect of Methyl Jasmonate on the Biomass Increase and Intracellular Biosynthesis of Indole Alkaloids in the Transgenic Culture of *Catharanthus roseus*". *Cytology and Gentetics*. 31:3. 14-18.

EBEL, J., BHAGWAT, A.A., COSIO, E.G., FEGER, M., KISSEL, U., MITHOFER, A. et al. 1995. "Elicitor Binding-Proteins and Signal-Transduction in the Activation of a Phytoalexin Defense Response". *Canadian Journal of Botany-Revue canadienne de botanique*. 73:S506-S510.

EBEL, J., MITHOFER, A. 1998. "Early Events in the Elicitation of Plant Defence". *Planta*. 206:3. 335-348.

EILERT, U., DE LUCA, V., CONSTABEL, F., KURTZ, W.G.W. 1987. "Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 254:491-497.

EL-SAYED, M., VERPOORTE, R. 2002. "Effect of Phytohormones on Growth and Alkaloid Accumulation by a *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures Fed With Alkaloid Precursors Tryptamine and Loganin". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 68:3. 265-270.

FACCHINI, P.J. 2001. "Alkaloid Biosynthesis in Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52:29-66.

FARABEGOLI, G., HELLINGA, C., HEIJNEN, J.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. 2003. "Study on the Use of NADH Fluorescence Measurements for Monitoring Wastewater Treatment Systems". *Water Research*. 37:11. 2732-2738.

FARMER, E.E., RYAN, C.A. 1992. "Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase-Inhibitors". *Plant Cell*. 4:2. 129-134.

FECKER, L.F., RUGENHAGEN, C., BERLIN, J. 1993. "Increased Production of Cadaverine and Anabasine in Hairy Root Cultures of *Nicotiana tabacum* Expressing a Bacterial Lysine Decarboxylase Gene". *Plant Molecular Biology*. 23:1. 11-21.

FIESCHKO, J.C., EGAN, K.M., RITCH, T., KOSKI, R.A., JONES, M., BITTER, G.A. 1987. "Controlled expression and purification of human immune interferon from high-cell-density fermentations of *Saccharomyces cerevisae*". *Biotechnology and Bioengineering*. 29:9. 1113-1121.

FLORES, H.E., VIVANCO, J.M., LOYOLA-VARGAS, V.M. 1999. "'Radicle' Biochemistry: the Biology of Root-Specific Metabolism". *Trends in Plant Science*. 4:6. 220-226.

FRANK, H.A., COGDELL, R.J. 1996. "Carotenoids in Photosynthesis". *Photochemistry and Photobiology*. 63:3. 257-264.

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. 1968. "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells". *Experimantal Cell Research*. 50:1. 151-8.

GAUME, A., KOMARNYTSKY, S., BORISJUK, N., RASKIN, I. 2003. "Rhizosecretion of Recombinant Proteins From Plant Hairy Roots". *Plant Cell Reports*. 21:12. 1188-1193.

GEERLINGS, A., HALLARD, D., CABALLERO, A.M., CARDOSO, I.L., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1999. "Alkaloid Production by a *Cinchona officinalis 'ledgeriana'* Hairy Root Culture Containing Constitutive Expression Constructs of Tryptophan Decarboxylase and Strictosidine Synthase cDNAs From *Catharanthus roseus*". *Plant Cell Reports*. 19:2. 191-196.

GELLISSEN, G. 2000. "Heterologous Protein Production in Methylotrophic Yeasts". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54:6. 741-750.

GELLISSEN, G., HOLLENBERG, C.P., JANOWICZ, Z.A. 1995. "Gene expression in methylotrophic yeasts". *Bioprocess Technology*. 22:195-239.

GIBON, Y., LARHER, F. 1997. "Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium". *Analytical Biochemistry*. 251:2. 153-7.

GILBERT, P.A., GARNIER, A., JACOB, D., KAMEN, A. 2000. "On-Line Measurement of Green Fluorescent Protein (GFP) Fluorescence for the Monitoring of Recombinant Adenovirus Production". *Biotechnology Letters*. 22:7. 561-567.

GIRARD, L.S., BASTIN, M., COURTOIS, D. 2004. "Expression of the Human Milk Protein Scd14 in Tobacco Plant Cell Culture". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 78:3. 253-260.

GIRI, A., NARASU, M.L. 2000. "Transgenic Hairy Roots: Recent Trends and Applications". *Biotechnology Advances*. 18:1. 1-22.

GLASER, V. 1999. "Billion-dollar market blossoms as botanical take root". *Nature biotechnology*. 17:17-18.

GMATI, D., CHEN, J., JOLICOEUR, M. In press. "Development of a High-throughput Bioreactor : Application to *In Vivo* NMR Measurement.". *Biotechnology Bioengineering*.

GODDIJN, O.J.M., PENNINGS, E.J.M., VANDERHELM, P., SCHILPEROORT, R.A., VERPOORTE, R., HOGE, J.H.C. 1995. "Overexpression of a Tryptophan Decarboxylase cDNA in *Catharanthus roseus* Crown Gall Calluses Results in Increased Tryptamine Levels but Not in Increased Terpenoid Indole Alkaloid Production". *Transgenic Research*. 4:5. 315-323.

GOMEZ-GOMEZ, L., BOLLER, T. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity". *Trends in Plant Science*. 7:6 251-256.

GUTIERREZ-ORTEGA, A., AVILA-MORENO, F., SAUCEDO-ARIAS, L.J., SANCHEZ-TORRES, C., GOMEZ-LIM, M.A. 2004. "Expression of a Single-Chain Human Interleukin-12 Gene in Transgenic Tobacco Plants and Functional Studies". *Biotechnology and Bioengineering*. 85:7. 734-740.

HAGEDORN, A., LEVADOUX, W., GROLEAU, D., TARTAKOVSKY, B. 2004. "Evaluation of Multiwavelength Culture Fluorescence for Monitoring the Aroma Compound 4-Hydroxy-2(or 5)-Ethyl-5(or 2)-Methyl-3(2h)-Furanone (Hemf) Production". *Biotechnology Progress*. 20:1. 361-367.

HALLARD, D., VANDERHEIJDEN, R., VERPOORTE, R., CARDOSO, M.I.L., PASQUALI, G., MEMELINK, J. et al. 1997. "Suspension Cultured Transgenic Cells of *Nicotiana tabacum* Expressing Tryptophan Decarboxylase and Strictosidine Synthase cDNAs From *Catharanthus roseus* Produce Strictosidine Upon Secologanin Feeding". *Plant Cell Reports*. 17:1. 50-54.

HAMILL, J.D., ROBINS, R.J., RHODES, M.J.C. 1989. "Alkaloid Production by Transformed Root Culture of *Cinchona ledgeriana*". *Planta Medica*. 4:354-357.

HARRISON, D.E., CHANCE, B. 1970. "Fluorimetric technique for monitoring changes in the level of reduced nicotinamide nucleotides in continuous cultures of microorganisms". *Applied Microbiology*. 19:3. 446-50.

HASELOFF, J., SIEMERING, K.R., PRASHER, D.C., HODGE, S. 1997. "Removal of a Cryptic Intron and Subcellular Localization of Green Fluorescent Protein Are Required to Mark Transgenic Arabidopsis Plants Brightly". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:6. 2122-2127.

HILLIOU, F., CHRISTOU, P., LEECH, M.J. 1999. "Development of an Efficient Transformation System for *Catharanthus roseus* Cell Cultures Using Particle Bombardment". *Plant Science*. 140:2. 179-188.

HO, C.H., HENDERSON, K.A., RORRER, G.L. 1995. "Cell-Damage and Oxygen Mass-Transfer During Cultivation of *Nicotiana tabacum* in a Stirred-Tank Bioreactor". *Biotechnology Progress*. 11:2. 140-145.

HOELLINGER, H., RE, M., DEROUSSENT, A., SINGH, R.P., CRESTEIL, T. 2004. "Quantitative Liquid Chromatographic Determination of Sanguinarine in Cell Culture Medium and in Rat Urine and Plasma". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 799:2. 195-200.

HOLLENBERG, C.P., GELLISSEN, G. 1997. "Production of Recombinant Proteins by Methylotrophic Yeasts". *Current Opinion in Biotechnology*. 8:5. 554-560.

HOLMES, P., LI, S.L., GREEN, K.D., FORD-LLOYD, B.V., THOMAS, N.H. 1997. "Drip-tube technology for continuous culture of hairy roots with integrated alkaloid extraction.". *Hairy Roots, Culture and applications*. Sous la direction de P.M. DoranHarwood Academic. 201-208.

HOOKER, B.S., LEE, J.M., AN, G.H. 1990. "Cultivation of Plant-Cells in a Stirred Vessel - Effect of Impeller Design". *Biotechnology and Bioengineering*. 35:3. 296-304.

HORN, M.E., WOODARD, S.L., HOWARD, J.A. 2004. "Plant molecular farming: systems and products". *Plant Cell Report*. 22:10. 711-20.

HORVATH, J.J., GLAZIER, S.A., SPANGLER, C.J. 1993. "In-Situ Fluorescence Cell Mass Measurements of *Saccharomyces- cerevisiae* Using Cellular Tryptophan". *Biotechnology Progress*. 9:6. 666-670.

IRMLER, S., SCHRODER, G., ST-PIERRE, B., CROUCH, N.P., HOTZE, M., SCHMIDT, J. et al. 2000. "Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*: New Enzyme Activities and Identification of Cytochrome P450cyp72a1 as Secologanin Synthase". *Plant Journal*. 24:6. 797-804.

ISHIKAWA, H., KAWAGUCHI, J., YAO, Y., TAMAOKI, H., ONO, T., FUKUI, F. et al. 1999. "Large-Scale Preparation of Recombinant Human Calcitonin From a Multimeric Fusion Protein Produced in *Escherichia coli*". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87:3. 296-301.

ISLAS-FLORES, I., MORENO-VALENZUELA, O., MINERO-GARCIA, Y., LOYOLA-VARGAS, V.M., MIRANDA-HAM MDE, L. 2002. "Tryptophan decarboxylase from transformed roots of *Catharanthus roseus*". *Molecular Biotechnology*. 21:3. 211-6.

JARDIN, B., TOM, R., CHAVARIE, C., RHO, D., ARCHAMBAULT, J. 1991. "Stimulated indole alkaloid release from *Catharanthus roseus* immobilized cultures. Initial studies". *Journal of Biotechnology*. 21:1-2. 43-62.

JOLICOEUR, M., BOUCHARD-MARCHAND, E., BECARD, G. , PERRIER, M. 2003. "Regulation of Mycorrhizal Symbiosis: Development of a Structured Nutritional Dual Model ". *Ecological Modelling*. 163:3. 245.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P.J., ARCHAMBAULT, J. 1992. "Development of a Helical-Ribbon Impeller Bioreactor for High-Density Plant-Cell Suspension-Culture". *Biotechnology and Bioengineering*. 39:5. 511-521.

JOLICOEUR, M., GERMETTE, S., GAUDETTE, M., PERRIER, M., BECARD, G. 1998 . "Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi. A symbiotic physiological marker". *Plant Physiology*. 116:4. 1279-88.

JONES, A., VELIKY, I.A. 1981. "Effect of medium constituents on the viability of immolized plant cells". *Canadian Journal of Botany-Revue canadienne de botanique*. 59:2095-2101.

JORJANI, P., OZTURK, S.S. 1999. "Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines". *Biotechnology Bioengineering*. 64:3. 349-56.

JOUHIKAINEN, K., LINDGREN, L., JOKELAINEN, T., HILTUNEN, R., TEERI, T.H., OKSMAN-CALDENTEY, K.M. 1999. "Enhancement of Scopolamine Production in *Hyoscyamus muticus* L. Hairy Root Cultures by Genetic Engineering". *Planta*. 208:4. 545-551.

KAUSS, H., JEBLICK, W., DOMARD, A. 1989. "The Degrees of Polymerization and N-Acetylation of Chitosan Determine Its Ability to Elicit Callose Formation in Suspension Cells and Protoplasts of *Catharanthus roseus*". *Planta*. 178:3. 385-392.

KEEN, N.T., PARTRIDEGE, J.E., ZAKI, A. 1972. "Pathogen-produced elicitor of chemical defense mechanism in soybean monogenetically resistant to *Phytaphtora magasperma var. sojae*". *Phytopathology*. 62:768.

KHLEBNIKOV, A., DUBUIS, B., KUT, O.M., PRENOSIL, J.E. 1995. "Growth and Productivity of *Beta vulgaris* Cell-Culture in Fluidized-Bed Reactors". *Bioprocess Engineering*. 14:1. 51-56.

KIERAN, P.M., MACLOUGHLIN, P.F., MALONE, D.M. 1997. "Plant Cell Suspension Cultures: Some Engineering Considerations". *Journal of Biotechnology*. 59:1-2. 39-52.

KIFLE, S., SHAO, M., JUNG, C., CAI, D. 1999. "An Improved Transformation Protocol for Studying Gene Expression in Hairy Roots of Sugar Beet (*Beta vulgaris L.*)". *Plant Cell Reports*. 18:6. 514-519.

KIM, D.-I., PEDERSEN, H., CHIN, C.-K. 1990. "Two stage cultures for the production of berberine in cell suspension cultures of *Thalictrum rugosum*". *Journal of Biotechnology*. 16:3-4. 297-304.

KIM, T.G., LANGRIDGE, W.H.R. 2004. "Synthesis of an HIV-1 Tat Transduction Domain-Rotavirus Enterotoxin Fusion Protein in Transgenic Potato". *Plant Cell Reports*. 22:6. 382-387.

KLVANA, M., LEGROS, R., JOLICOEUR, M. In press. " *In situ* extraction strategy affects benzophenanthridine alkaloid production fluxes in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*". *Biotechnology Bioengineering*. In press.

KNIGHT, M.R., CAMPBELL, A.K., SMITH, S.M., TREWAVAS, A.J. 1991. "Transgenic Plant Aequorin Reports the Effects of Touch and Cold-Shock and Elicitors on Cytoplasmic Calcium". *Nature*. 352:6335. 524-526.

KNOBLOCH, K.H., BERLIN, J. 1980. "Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension culture of *Catharantus roseus* L.G. Don.". *Zeitung Naturforschung*. 35C:551-556.

LAEMMLI, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. 227:680-685.

LAL, S.K., TULASIRAM, P., JAMEEL, S. 1997. "Expression and Characterization of the Hepatitis E Virus ORF3 Protein in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*". *Gene*. 190:1. 63-67.

LAMB, C., DIXON, R.A. 1997. "The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48:251-275.

LEDUC, M. 2004. *Développement d'un modčle biocinétique du métabolisme primaire de Catharanthus roseus.* Ecole Polytechnique de Montréal. Département de Génie Chimique.

LEE, C.W.T., SHULER, M.L. 1991. "Different Shake Flask Closures Alter Gas-Phase Composition and Ajmalicine Production in *Catharanthus roseus* Cell-Suspensions". *Biotechnology Techniques*. 5:3. 173-178.

LEE-PARSONS, C.W.T., SHULER, M.L. 2002. "The Effect of Ajmalicine Spiking and Resin Addition Timing on the Production of Indole Alkaloids From *Catharanthus roseus* Cell Cultures". *Biotechnology and Bioengineering*. 79:4. 408-415.

LEE, Y.J., CHUNG, E., LEE, K.Y., LEE, Y.H., HUH, B., LEE, S.K. 1997. "Ginsenoside-RG1, One of the Major Active Molecules From *Panax ginseng*, Is a Functional Ligand of Glucocorticoid Receptor". *Molecular and Cellular Endocrinology*. 133:2. 135-140.

LESSARD, P.A., KULAVEERASINGAM, H., YORK, G.M., STRONG, A., SINSKEY, A.J. 2002. "Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants". *Metabolic Engineering*. 4:1. 67-79.

LI, J.C., WANG, S., VANDUSEN, W.J., SCHULTZ, L.D., GEORGE, H.A., HERBER, W.K. et al. 2000. "Green Fluorescent Protein in *Saccharomyces cerevisiae*: Real-Time Studies of the Gal1 Promoter". *Biotechnology and Bioengineering*. 70:2. 187-196.

LI, J.K., ASALI, E.C., HUMPHREY, A.E. 1991. "Monitoring Cell Concentration and Activity by Multiple Excitation Fluorometry". *Biotechnology Progress*. 7:1. 21-27.

LI, J.K., HUMPHREY, A.E. 1991. "Use of Fluorometry for Monitoring and Control of a Bioreactor". *Biotechnology and Bioengineering*. 37:11. 1043-1049.

LI, J.Y., OULEE, T.M., RABA, R., AMUNDSON, R.G., LAST, R.L. 1993. "Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation". *Plant Cell*. 5:2. 171-179.

LI, X.Q., ZHAO, X.N., FANG, Y., JIANG, X., DUONG, T., FAN, C. et al. 1998. "Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein Transcription Reporter". *Journal of Biological Chemistry*. 273:52. 34970-34975.

LINDEMANN, C., MAROSE, S., NIELSEN, H.O., SCHEPER, T. 1998. "2-Dimensional Fluorescence Spectroscopy for on-Line Bioprocess Monitoring". *Sensors and Actuators B-Chemical*. 51:1-3. 273-277.

LIU, S., BUGOS, R.C., DHARMASIRI, N., SU, W.W. 2001. "Green Fluorescent Protein as a Secretory Reporter and a Tool for Process Optimization in Transgenic Plant Cell Cultures". *Journal of Biotechnology*. 87:1. 1-16.

LU, C.H., ALBANO, C.R., BENTLEY, W.E., RAO, G. 2001. "Differential Rates of Gene Expression Monitored by Green Fluorescent Protein.". *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. 221:U115.

LU, C.H., ALBANO, C.R., BENTLEY, W.E., RAO, G. 2002. "Differential Rates of Gene Expression Monitored by Green Fluorescent Protein". *Biotechnology and Bioengineering*. 79:4. 429-437.

LUIJENDIJK, T.J.C., STEVENS, L.H., VERPOORTE, R. 1998. "Purification and Characterisation of Strictosidine Beta-D-Glucosidase From *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures". *Plant Physiology and Biochemistry*. 36:6. 419-425.

MAROSE, S., LINDEMANN, C., SCHEPER, T. 1998. "Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy: a New Tool for on-Line Bioprocess Monitoring". *Biotechnology Progress*. 14:1. 63-74.

MASSIE, B., COUTURE, F., LAMOUREUX, L., MOSSER, D.D., GUILBAULT, C., JOLICOEUR, P. et al. 1998. "Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette". *Journal of Virology*. 72:3. 2289-96.

MASSOT, B., MILESI, S., GONTIER, E., BOURGAUD, F., GUCKERT, A. 2000. "Optimized Culture Conditions for the Production of Furanocoumarins by Micropropagated Shoots of *Ruta graveolens*". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 62:1. 11-19.

MATHIEU, Y., KURKDJIAN, A., XIA, H., GUERN, J., KOLLER, A., SPIRO, M.D. et al. 1991. "Membrane Responses Induced by Oligogalacturonides in Suspension-Cultured Tobacco Cells". *Plant Journal*. 1:3. 333-343.

MATSUBAYASHI, Y., SAKAGAMI, Y. 1996. "Phytosulfokine, sulfated peptides that induces the proliferation of single mesophyll cells of Asparagus officinalis L." . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:19 7623-7627.

MEIJER, A.H., CARDOSO, M.I.L., VOSKUILEN, J.T., DEWAAL, A., VERPOORTE, R., HOGE, J.H.C. 1993b. "Isolation and Characterization of a cDNA Clone From *Catharanthus roseus* Encoding NADPH - Cytochrome-P-450 Reductase, an Enzyme Essential for Reactions Catalyzed by Cytochrome-P-450 Mono-Oxygenases in Plants". *Plant Journal*. 4:1. 47-60.

MEIJER, A.H., DEWAAL, A., VERPOORTE, R. 1993a. "Purification of the Cytochrome-P-450 Enzyme Geraniol 10-Hydroxylase From Cell-Cultures of *Catharanthus roseus*". *Journal of Chromatography*. 635:2. 237-249.

MEIJER, A.H., VERPOORTE, R., HOGE, J.H.C. 1993c. "Regulation of Enzymes and Genes Involved in Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*". *Journal of Plant Research*. 145-164.

MENKE, F.L.H., PARCHMANN, S., MUELLER, M.J., KIJNE, J.W., MEMELINK, J. 1999. "Involvement of the Octadecanoid Pathway and Protein Phosphorylation in Fungal Elicitor-Induced Expression of Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthetic Genes in *Catharanthus roseus*". *Plant Physiology*. 119:4. 1289-1296.

MERILLON, J.M., RIDEAU, M., CHENIEUX, J.C. 1984. "Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells *in vitro*". *Planta Medecine*. 50:497-501.

MERRITT, C.D., RAINA, S., FEDOROFF, N., CURTIS, W.R. 1999. "Direct *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Hyoscyamus muticus* Hairy Roots Using Green Fluorescent Protein". *Biotechnology Progress*. 15:2. 278-282.

MEYER, A.D., TEMPÉ, J., COSTANTINO, P. 2000. "Hairy root: a molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes". *Plant-Microbe Interactions*. 5:93-139.

MEYER, V.R. 1994. *Practical High-performance Liquid Chromatography*. New-York : Wiley and Sons.

MICHAL, M. 1999. *Biochemical pathways, an atlas of biochemistry and molecular biology*. New York, NY : Spektrum Akademischer verlang and John Wiley and sons, inc.

MIURA, Y., HIRATA, K., KURANO, N., MIYAMOTO, K., UCHIDA, K. 1988. "Formation of vinblastine in multuple shoot culture of *Catharantus roseus*". *Planta Medecine*. 54:18-20.

MORENO, P.R.H., VANDERHEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1995. "Cell and Tissue-Cultures of *Catharanthus roseus* - a Literature Survey .2. Updating From 1988 to 1993". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 42:1. 1-25.

MORENO-VALENZUELA, O.A., GALAZ-AVALOS, R.M., MINERO-GARCIA, Y., LOYOLA-VARGAS, V.M. 1998. "Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots". *Plant Cell Reports.* 18:99-104.

MORGAN, J.A., SHANKS, J.V. 1999 "Inhibitor Studies of Tabersonine Metabolism in *Catharanthus roseus* hairy roots". *Phytochemistry.* 51:1. 61-68.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture". *Plant Physiology.* 15:473-497.

NAGATOME, H., YAMAMOTO, T., TAYA, M., TANAKA, N. 2000. "Viability of plant hairy roots is sustained without propagation in low sugar medium kept at ambient temperature". *Biochemical Engineering Journal.* 6:1. 75-80.

NAKAGAWA, K., KONAGAI, A., FUKUI, H., TABATA, H. 1984. "Release and Crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension culture". *Plant cell report.* 3:254-257.

NGUYEN, T., ESHRAGHI, J., GONYEA, G., REAM, R., SMITH, R. 2001. "Studies on Factors Influencing Stability and Recovery of Paclitaxel From Suspension Media and Cultures of T*axus cuspidata Cv densiformis* by High-Performance Liquid Chromatography". *Journal of Chromatography A.* 911:1. 55-61.

NUUTILA, A.M., TOIVONEN, L., KAUPPINEN, V. 1994. "Bioreactor Studies on Hairy Root Cultures of *Catharanthus roseus* - Comparison of 3 Bioreactor Types". *Biotechnology Techniques.* 8:1. 61-66.

O'DOWD, N.A., MCCAULEY, P.G., RICHARDSON, D.H.S. , WILSON, G. 1993. "Callus Production, Suspension-Culture and in-Vitro Alkaloid Yields of Ephedra". *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 34:2. 149-155.

O'KEEFE, B.R., MAHADY, G.B., GILLS, J.J., BEECHER, C.W.W., SCHILLING, A.B. 1997. "Stable Vindoline Production in Transformed Cell Cultures of *Catharanthus roseus*". *Journal of Natural Products.* 60:3. 261-264.

OUWERKERK, P.B.F., HALLARD, D., VERPOORTE, R., MEMELINK, J. 1999. "Identification of UV-B Light-Responsive Regions in the Promoter of the Tryptophan Decarboxylase Gene From *Catharanthus roseus*". *Plant Molecular Biology*. 41:4. 491-503.

PALAZON, J., CUSIDO, R.M., GONZALO, J., BONFILL, M., MORALES, C., PINOL, M.T. 1998. "Relation between the amount of rolC gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharantus roseus* transformed root culture". *Journal of Plant Physiology*. 153:712-718.

PAPADOPOULOS, A.J., ZHADIN, N.N., STEINBERG, M.L., ALFANO, R.R. 1999. "Fluorescence spectroscopy of normal, SV40-transformed human keratinocytes, and carcinoma cells". *Cancer Biochemistry Biophysics*. 17:1-2. 13-23.

PASQUALI, G., ERVEN, A.S.W., OUWERKERK, P.B.F., MENKE, F.L.H., MEMELINK, J. 1999. "The Promoter of the Strictosidine Synthase Gene From Periwinkle Confers Elicitor-Inducible Expression in Transgenic Tobacco and Binds Nuclear Factors Gt-1 and Gbf". *Plant Molecular Biology*. 39:6. 1299-1310.

PASQUALI, G., GODDIJN, O.J.M., DEWAAL, A., VERPOORTE, R., SCHILPEROORT, R.A., HOGE, J.H.C. et al. 1992. "Coordinated Regulation of 2 Indole Alkaloid Biosynthetic Genes From *Catharanthus roseus* by Auxin and Elicitors". *Plant Molecular Biology*. 18:6. 1121-1131.

PAYNE, G. F., BRINGI, V., PRINCE, C., SHULER, M.L. 1991. "The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture". *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Sous la direction de G.F. Payne, V. Bringi, C. Prince et M.L. ShulerHanser. 1-10.

PECK, M.W., CHYNOWETH, D.P. 1992. "Online Fluorescence-Monitoring of the Methanogenic Fermentation". *Biotechnology and Bioengineering*. 39:11. 1151-1160.

PHUNCHINDAWAN, M., HIRATA, K., SAKAI, A., MIYAMOTO, K. 1997. "Cryopreservation of encapsulated shoot primordia induced in horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy root cultures". *Plant Cell Reports*. 16:7. 469-473.

POWER, R., KURZ, W.G.W., DELUCA, V. 1990. "Purification and Characterization of Acetylcoenzyme-□ - Deacetylvindoline 4-O-Acetyltransferase From *Catharanthus roseus*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 279:2. 370-376.

PRADHAN, A., PAL, P., DUROCHER, G., VILLENEUVE, L., BALASSY, A., BABAI, F. et al. 1995. "Steady State and Time-Resolved Fluorescence Properties of Metastatic and Non-Metastatic Malignant Cells From Different Species". *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 31:3. 101-112.

QIAN, Z.G., ZHAO, Z.J., TIAN, W.H., XU, Y.F., ZHONG, J.J., QIAN, X.H. 2004. "Novel Synthetic Jasmonates as Highly Efficient Elicitors for Taxoid Production by Suspension Cultures of *Taxus chinensis*". *Biotechnology and Bioengineering*. 86:5. 595-599.

RADMAN, R. SAEZ, T., BUCKE, C., KESAHAVRZ, T. 2003. "Elicitation of plant and microbial cell system". *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 37 : 91-102.

RAJASEKARAN, T., RAJENDRAN, L., RAVISHANKAR, G.A., VENKATARAMAN, L.V. 1991. "Influence of Nutrient Stress on Pyrethrin Production by Cultured-Cells of *Pyrethrum (chrysanthemum-cinerariaefolium)*". *Current Science*. 60:12. 705-707.

RANDERSEICHHORN, L., ALBANO, C.R., SIPIOR, J., BENTLEY, W.E., RAO, G. 1997. "On-Line Green Fluorescent Protein Sensor With Led Excitation". *Biotechnology and Bioengineering*. 55:6. 921-926.

RAO, S.R., RAVISHANKAR, G.A. 2000. "Biotransformation of Protocatechuic Aldehyde and Caffeic Acid to Vanillin and Capsaicin in Freely Suspended and Immobilized Cell Cultures of *Capsicum frutescens*". *Journal of Biotechnology*. 76:2-3. 137-146.

RAO, S.R., RAVISHANKAR, G.A. 2002. "Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites". *Biotechnology Advances*. 20:2. 101-153.

RASCHKE, W.C., NEIDITCH, B.R., HENDRICKS, M., CREGG, J.M. 1996. "Inducible Expression of a Heterologous Protein in Hansenula polymorpha Using the Alcohol Oxidase 1 Promoter of *Pichia pastoris*". *Gene*. 177:1-2. 163-167.

RAVAL, K.N., HELLWIG, S., PRAKASH, G., RAMOS-PLASENCIA, A., SRIVASTAVA, A., BUCHS, J. 2003. "Necessity of a Two-Stage Process for the Production of Azadirachtin-Related Limonoids in Suspension Cultures of *Azadirachta indica*". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96:1. 16-22.

REISCHER, H., SCHOTOLA, I., STRIEDNER, G., POTSCHACHER, F., BAYER, K. 2004. "Evaluation of the GFP Signal and Its Aptitude for Novel on-Line Monitoring Strategies of Recombinant Fermentation Processes". *Journal of Biotechnology*. 108:2. 115-125.

REN, H.T., YUAN, J.Q., BELLGARDT, K.H. 2003. "Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance". *Journal of Biotechnology*. 106:1. 53-68.

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

RODDIE, P.H., LUDLAM, C.A. 1997. "Recombinant Coagulation Factors". *Blood Reviews*. 11:4 . 169-177.

RODRIGUEZ, S., COMPAGNON, V., CROUCH, N.P., ST-PIERRE, B., DE LUCA, V. 2003. "Jasmonate-Induced Epoxidation of Tabersonine by a Cytochrome P-450 in Hairy Root Cultures of *Catharanthus roseus*". *Phytochemistry*. 64:2. 401-409.

ROOS, W., DORSCHBAL, B., STEIGHARDT, J., HIEKE, M., WEISS, D., SAALBACH, G. 1999. "A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*". *Biochimica et Biophysica Acta.* 1448:390-402.

ROOS, W., EVERS, S., HIEKE, M., TSCHOPE, M., SCHUMANN, B. 1998. "Shifts of Intracellular pH Distribution as a Part of the Signal Mechanism Leading to the Elicitation of Benzophenanthridine Alkaloids - Phytoalexin Biosynthesis in Cultured Cells of *Eschscholtzia californica*". *Plant Physiology.* 118:2. 349-364.

RUIZ-LOZANO, J.M., ROUSSEL, H., GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. 1999. "Defense Genes Are Differentially Induced by a Mycorrhizal Fungus and Rhizobium Sp in Wild-Type and Symbiosis-Defective Pea Genotypes". *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 12:11. 976-984.

SAITO, K., MURAKOSHI, I., INZE, D., VAN MONTAGU, M. 1985. "Biotransformation of nicotine alkaloids by tobacco shooty teratomas induced by a Ti plasmid mutant". *Plant Cell Report.* 7:607-610.

SAKANO, K., YAZAKI, Y., OKIHARA, K., MIMURA, T., KIYOTA, S. 1995. "Lack of Control in Inorganic-Phosphate Uptake by *Catharanthus roseus (L) G-Don* Cells - Cytoplasmic Inorganic-Phosphate Homeostasis Depends on the Tonoplast Inorganic-Phosphate Transport-System". *Plant Physiology.* 108:1. 295-302.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAMPAIO-SANTOS, I., KAPLAN, M.A.C. 2001. "Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics". *Soc. Bras. Quimica.* 12:2. 144-153.

SCHEIBE, R., BAALMANN, E., BACKHAUSEN, J.E., RAK, C., VETTER, S. 1996. "C-Terminal Truncation of Spinach Chloroplast NAD(P)-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Prevents Inactivation and Reaggregation". *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1296:2. 228-234.

SCHEPER, T., LORENZ, T., SCHMIDT, W., SCHUGERL, K. 1987. "On-line measurement of culture fluorescence for process monitoring and control of biotechnological processes". *Proceeding of the National Academu of Science Of the United States of America* . 506:431-45.

SCHLATMANN, J.E., MORENO, P.R.H., VINKE, J.L., HOOPEN, H.J.G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J.J. 1997. "Gaseous metabolites and the ajmalicine production rate in high density cell cultures of *Catharanthus roseus* ". *Enzyme and Microbial Technology*. 20:2. 107-116.

SCHRODER, G., UNTERBUSCH, E., KALTENBACH, M., SCHMIDT, J., STRACK, D., DE LUCA, V. et al. 1999. "Light-Induced Cytochrome P450-Dependent Enzyme in Indole Alkaloid Biosynthesis: Tabersonine 16-Hydroxylase ". *FEBS Letters*. 458:2. 97-102.

SCHULTE, A.E., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 2000. "Purification and Characterization of Mevalonate Kinase From Suspension-Cultured Cells of *Catharanthus roseus (L.) G. Don*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 378:2. 287-298.

SCRAGG, A.H., CRESSWELL, R.C., ASHTON, S., YORK, A., BOND, P.A., FOWLER, M.W. 1989. "Growth and Alkaloid Production in Bioreactors by a Selected *Catharanthus roseus* Cell-Line". *Enzyme and Microbial Technology*. 11:6. 329-333.

SHANKS, J.V., BHADRA, R., MORGAN, J., RIJHWANI, S., VANI, S. 1998. "Quantification of Metabolites in the Indole Alkaloid Pathways of *Catharanthus roseus*: Implications for Metabolic Engineering". *Biotechnology and Bioengineering*. 58:2-3. 333-338.

SHANKS, J.V., MORGAN, J. 1999. "Plant 'hairy Root' Culture". *Current Opinion in Biotechnology*. 10:2. 151-155.

SHIAO, T.L., DORAN, P.M. 2000. "Root Hairiness: Effect on Fluid Flow and Oxygen Transfer in Hairy Root Cultures". *Journal of Biotechnology*. 83:3. 199-210.

SHULER, M.L., KARGI, F. 2002. *Bioprocess engineering, Basic concepts*. Upper Saddle River, NJ : Prentice-Hall, Inc.

SIANO, S.A., MUTHARASAN, R. 1989. "NADH and Flavin Fluorescence Responses of Starved Yeast Cultures to Substrate Additions". *Biotechnology and Bioengineering*. 34:5. 660-670.

SIANO, S.A., MUTHARASAN, R. 1991. "NADH Fluorescence and Oxygen-Uptake Responses of Hybridoma Cultures to Substrate Pulse and Step Changes". *Biotechnology and Bioengineering*. 37:2. 141-159.

SKIBSTED, E., LINDEMANN, C., ROCA, C., OLSSON, L. 2001. "On-Line Bioprocess Monitoring With a Multi-Wavelength Fluorescence Sensor Using Multivariate Calibration". *Journal of Biotechnology*. 88:1. 47-57.

SOTTOMAYOR, M., LOPEZ-SERRANO, M., DICOSMO, F., BARCELO, A.R. 1998. "Purification and Characterization of Alpha-3 ',4 '-Anhydrovinblastine Synthase (Peroxidase-Like) From *Catharanthus roseus (L) G. Don*". *FEBS Letters*. 428:3. 299-303.

SPENA, A., SCHMULLING, T., KONCZ, C., SCHELL, J. 1987. "Independent and synergistic activity of *rolA, B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants.". *EMBO Journal*. 6:3891-3899.

SRINIVASAN, V., PESTCHANKER, L., MOSER, S., HIRASUNA, T.J., TATICEK, R.A., SHULER, M.L. 1995. "Taxol Production in Bioreactors - Kinetics of Biomass Accumulation, Nutrient-Uptake, and Taxol Production by Cell Suspensions of *Taxus baccata*". *Biotechnology and Bioengineering*. 47:6. 666-676.

ST-PIERRE, B., DELUCA, V. 1995. "A Cytochrome-P-450 Monooxygenase Catalyzes the First Step in the Conversion of Tabersonine to Vindoline in *Catharanthus roseus*". *Plant Physiology*. 109:1. 131-139.

ST-PIERRE, B., LAFLAMME, P., ALARCO, A.M., DE LUCA, V. 1998. "The Terminal O-Acetyltransferase Involved in Vindoline Biosynthesis Defines a New Class of Proteins Responsible for Coenzyme A-Dependent Acyl Transfer". *Plant Journal*. 14:6. 703-713.

ST-PIERRE, B., VAZQUEZ-FLOTA, F.A., DE LUCA, V. 1999. "Multicellular Compartmentation of *Catharanthus roseus* Alkaloid Biosynthesis Predicts Intercellular Translocation of a Pathway Intermediate". *Plant Cell*. 11:5. 887-900.

SU, W.W., GUAN, P.Z., BUGOS, R.C. 2004. "High-Level Secretion of Functional Green Fluorescent Protein From Transgenic Tobacco Cell Cultures: Characterization and Sensing". *Biotechnology and Bioengineering*. 85:6. 610-619.

SUBROTO, T., VAN KONINGSVELD, G.A., SCHREUDER, H.A., SOEDJANAATMADJA, U.M., BEINTEMA, J.J. 1996. "Chitinase and beta-1,3-glucanase in the lutoid-body fraction of *Hevea latex*". *Phytochemistry*. 43:1. 29-37.

TANAKA, H., DEMBA, H., JITSUFUCHI, Y., HARADA, H. 1988. "The effect of physical stress on plant cells in suspension cultures". *Biotechnology letters*. 10:485-490.

TARTAKOVSKY, B., SHEINTUCH, M., HILMER, J.M., SCHEPER, T. 1996. "Application of scanning fluorometry for monitoring of a fermentation process". *Biotechnology Progress*. 12:1. 126-31.

TIKHOMIROFF, C. 2001. *Étude des métabolismes primaire et secondaire de racines transformées de Catharanthus roseus en vue du développement d'un modèle cinétique.* École Polytechnique de Montréal. Département de Génie Chimique.

TIKHOMIROFF, C., ALLAIS, S., KLVANA, M., HISIGER, S., JOLICOEUR, M. 2002. "Continuous selective extraction of secondary metabolites from *Catharanthus roseus* hairy roots with silicon oil in a two-liquid-phase bioreactor". *Biotechnology Progress*. 18:5. 1003-9.

TIKHOMIROFF, C., JOLICOEUR, M. 2002. "Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolites by high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*. 955:1. 87-93.

TOIVONEN, L. 1993. "Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites". *Biotechology Progress*. 9:12-20.

TOIVONEN, L., BALSEVICH, J., KURZ, W.G.W. 1989. "Indole Alkaloid Production by Hairy Root Cultures of *Catharanthus roseus*". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 18:1. 79-93.

TOM, R., JARDIN, B., CHAVARIE, C., ARCHAMBAULT, J. 1991. "Effect of Culture Process on Alkaloid Production by *Catharanthus roseus* Cells .1. Suspension-Cultures". *Journal of Biotechnology*. 21:1-2. 1-20.

TORREGROSA, L., BOUQUET, A. 1997. "*Agrobacterium rhizogenes* and A-tumefaciens Co-Transformation to Obtain Grapevine Hairy Roots Producing the Coat Protein of Grapevine Chrome Mosaic Nepovirus". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 49:1. 53-62.

UPPAL, A., GUPTA, P.K. 2003 . "Measurement of NADH Concentration in Normal and Malignant Human Tissues From Breast and Oral Cavity". *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 37:45-50.

VAN-DEEMTER, J.J., ZUIDERWEG, F.J., KINKENBERG, A. "Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography ". *Chemical Engineering Science*. 5:6. 271-289.

VANDERFITS, L., MEMELINK, J. 1997. "Comparison of the Activities of CAMV 35s and FMVv 34s Promoter Derivatives in *Catharanthus roseus* Cells Transiently and Stably Transformed by Particle Bombardment". *Plant Molecular Biology*. 33:5. 943-946.

VANISREE, M., LEE, C.Y., LO, S.F., NALAWADE, S.M., LIN, C.Y., TSAY, H.S. 2004. "Studies on the Production of Some Important Secondary Metabolites From Medicinal Plants by Plant Tissue Cultures". *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 45:1. 1-22.

VAZQUEZ-FLOTA, F., DECAROLIS, E., ALARCO, A.M., DELUCA, V. 1997. "Molecular Cloning and Characterization of Desacetoxyvindoline-4-Hydroxylase, a 2-Oxoglutarate Dependent Dioxygenase Involved in the Biosynthesis of Vindoline in *Catharanthus roseus (L) G. Don*". *Plant Molecular Biology*. 34:6. 935-948.

VAZQUEZ-FLOTA, F., MORENOVALENZUELA, O., MIRANDAHAM, M.L., COELLOCOELLO, J., LOYOLAVARGAS, V.M. 1994. "Catharanthine and Ajmalicine Synthesis in *Catharanthus roseus* Hairy Root Cultures - Medium Optimization and Elicitation". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 38:2-3. 273-279.

VAZQUEZ-FLOTA, F.A., DE LUCA, V. 1998. "Jasmonate Modulates Development- and Light-Regulated Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*". *Phytochemistry*. 49:2. 395-402.

VERPOORTE, R., CONTIN, A., MEMELINK, J. 2002. "Biotechnology for the production of plant secondary metabolites". *Phytochemistry reviews*. 1:13-25.

VERPOORTE, R., MEMELINK, J. 2002. "Engineering Secondary Metabolite Production in Plants". *Current Opinion in Biotechnology*. 13:2. 181-187.

VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., MEMELINK, J. 2000. "Engineering the Plant Cell Factory for Secondary Metabolite Production". *Transgenic Research*. 9:4-5. 323-343.

VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., TEN HOOPEN, H.J.G., MEMELINK, J. 1999. "Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolite Pathways for the Production of Fine Chemicals". *Biotechnology Letters*. 21:6. 467-479.

VILLEGAS, M., SOMMARIN, M., BRODELIUS, P.E. 2000. "Effects of Sodium Orthovanadate on Benzophenanthridine Alkaloid Formation and Distribution in Cell Suspension Cultures of *Eschscholtzia californica*". *Plant Physiology and Biochemistry*. 38:3. 233-241.

VOLPIN, H., ELKIND, Y., OKON, Y., KAPULNIK, Y. 1994. "A Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*Glomus intraradix*) Induces a Defense Response in Alfalfa Roots". *Plant Physiology*. 104:2. 683-689.

WANG, H.M., TO, K.Y. 2004. "Agrobacterium-Mediated Transformation in the High-Value Medicinal Plant *Echinacea purpurea*". *Plant Science*. 166:4. 1087-1096.

WASTERNACK, C., PARTHIER, B. 1997. "Jasmonate Signalled Plant Gene Expression". *Trends in Plant Science*. 2:8. 302-307.

WEERASINGHE, P., HALLOCK, S., TANG, S.C., LIEPINS, A. 2001. "Role of Bcl-2 Family Proteins and Caspase-3 in Sanguinarine-Induced Bimodal Cell Death". *Cell Biology and Toxicology*. 17:6. 371-381.

WHITE, F.P., TAYLOR, B.H., HUFFAMN, G.A., GORDON, M.P., NESTER, E.W. 1985. "Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*". *Journal of Bacteriology*. 164:1. 33-44.

WHITMER, S., CANEL, C., HALLARD, D., GONCALVES, C., VERPOORTE, R. 1998a. "Influence of Precursor Availability on Alkaloid Accumulation by Transgenic Cell Line of *Catharanthus roseus*". *Plant Physiology*. 116:2. 853-857.

WHITMER, S., VERPOORTE, R., CANEL, C. 1998b. "Influence of Auxins on Alkaloid Accumulation by a Transgenic Cell Line of *Catharanthus roseus*". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 53:2. 135-141.

WICHERS, H.J., VISSER, J.F., HUIZING, H.J., PRAS, N. 1993. "Occurrence of L-Dopa and Dopamine in Plants and Cell-Cultures of *Mucuna pruriens* and Effects of 2,4-D and NaCl on These Compounds". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 33:3. 259-264.

WILLIAMS, G.R.C., DORAN, P.M. 2000. "Hairy Root Culture in a Liquid-Dispersed Bioreactor: Characterization of Spatial Heterogeneity". *Biotechnology Progress*. 16:3. 391-401.

WINK, M. 1999. "Introduction : biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites". *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Sous la direction de M. Wink. Boca Raton, FL : CRC Press. 1-15.

WONGSAMUTH, R., DORAN, P.M. 1997. "Production of Monoclonal Antibodies by Tobacco Hairy Roots". *Biotechnology and Bioengineering*. 54:5. 401-415.

WU, J.Y., GE, X.C. 2004. "Oxidative Burst, Jasmonic Acid Biosynthesis, and Taxol Production Induced by Low-Energy Ultrasound in *Taxus chinensis* Cell Suspension Cultures". *Biotechnology and Bioengineering*. 85:7. 714-721.

WU, J.Y., WANG, C.G., MEI, X.G. 2001. "Stimulation of Taxol Production and Excretion in Taxus Spp Cell Cultures by Rare Earth Chemical Lanthanum". *Journal of Biotechnology*. 85:1. 67-73.

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

YOKOI, H., KOGA, J., YAMAMURA, K., SEIKE, Y., TANAKA, H. 1993. "High-Density Cultivation of Plant-Cells in a New Aeration-Agitation Type Fermenter, Maxblend Fermentor(R)". *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75:1. 48-52.

YOSHIMATSU, K., YAMAGUCHI, H., SHIMOMURA, K. 1996. "Traits of *Panax ginseng* Hairy Roots After Cold Storage and Cryopreservation". *Plant Cell Reports*. 15:8. 555-560.

YUKIMUNE, Y., TABATA, H., HIGASHI, Y., HARA, Y. 1996. "Methyl Jasmonate-Induced Overproduction of Paclitaxel and Baccatin Iii in Taxus Cell Suspension Cultures". *Nature Biotechnology*. 14:9. 1129-1132.

YUN, D.J., HASHIMOTO, T., YAMADA, Y. 1992. "Metabolic Engineering of Medicinal-Plants - Transgenic *Atropa belladonna* With an Improved Alkaloid Composition". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:24. 11799-11803.

ZARATE, R., MEMELINK, J., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1999. "Genetic Transformation Via Particle Bombardment of *Catharanthus roseus* Plants Through Adventitious Organogenesis of Buds". *Biotechnology Letters*. 21:11. 997-1002.

ZENK, M.H. 1991. "Chasing the Enzymes of Secondary Metabolism - Plant-Cell Cultures as a Pot of Gold". *Phytochemistry*. 30:12. 3861-3863.

ZHANG, J.N., SU, W.S. 2002. "Estimation of Intracellular Phosphate Content in Plant Cell Cultures Using an Extended Kalman Filter". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94:1. 8-14.

ZHANG, W., CURTIN, C., KIKUCHI, M., FRANCO, C. 2002. "Integration of Jasmonic Acid and Light Irradiation for Enhancement of Anthocyanin Biosynthesis in *Vitis vinifera* Suspension Cultures". *Plant Science*. 162:3. 459-468.

ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q. 2000. "Promotion of Indole Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* Cell Cultures by Rare Earth Elements". *Biotechnology Letters*. 22:10. 825-828.

ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q., HE, X.W. 2001a. "Enhanced Indole Alkaloid Production in Suspension Compact Callus Clusters of *Catharanthus roseus*: Impacts of Plant Growth Regulators and Sucrose". *Plant Growth Regulation*. 33:1. 33-41.

ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q. 2001b. "Enhanced Catharanthine Production in *Catharanthus roseus* Cell Cultures by Combined Elicitor Treatment in Shake Flasks and Bioreactors". *Enzyme and Microbial Technology*. 28:7-8. 673-681.

ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q. 2001c. "Selection of Fungal Elicitors to Increase Indole Alkaloid Accumulation in *Catharanthus roseus* Suspension Cell Culture". *Enzyme and Microbial Technology*. 28:7-8. 666-672.

ZHAO, J., ZHU, W.-H., HU, Q. 2001d. "Effect of Light and Plant Growth Regulators on the Biosynthesis of Vindoline and other Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Calluls Culture". *Plant Growth Regulation*. 33:43-49.

ZUPAN, J., MUTH, T.R., DRAPER, O., ZAMBRYSKI, P. 2000. "The Transfer of DNA From *Agrobacterium tumefaciens* Into Plants: a Feast of Fundamental Insights". *Plant Journal*. 23:1. 11-28.

Annexes

Annexe A. Adaptation d'une méthode HPLC pour l'identification de composés inconnus synthétisés par des racines transformées de *Catharanthus roseus*

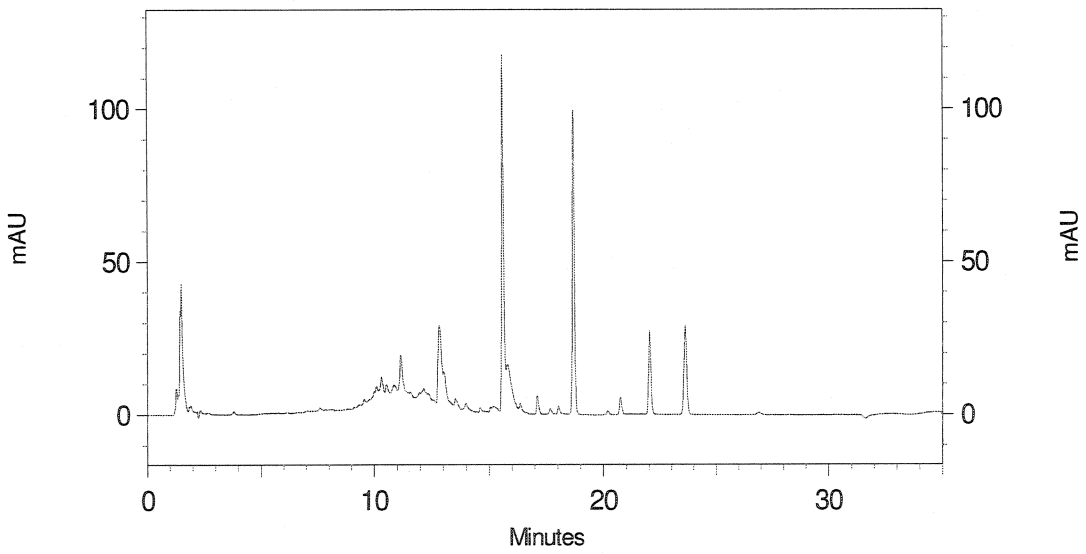


Figure A.1 Analyse HPLC d'un extrait racinaire de Catharanthus roseus.
Élution à 2 mL/min avec un mélange Acétonitrile / Tampon Phosphate 50 mM pH=6.
Détection UV à 330 nm

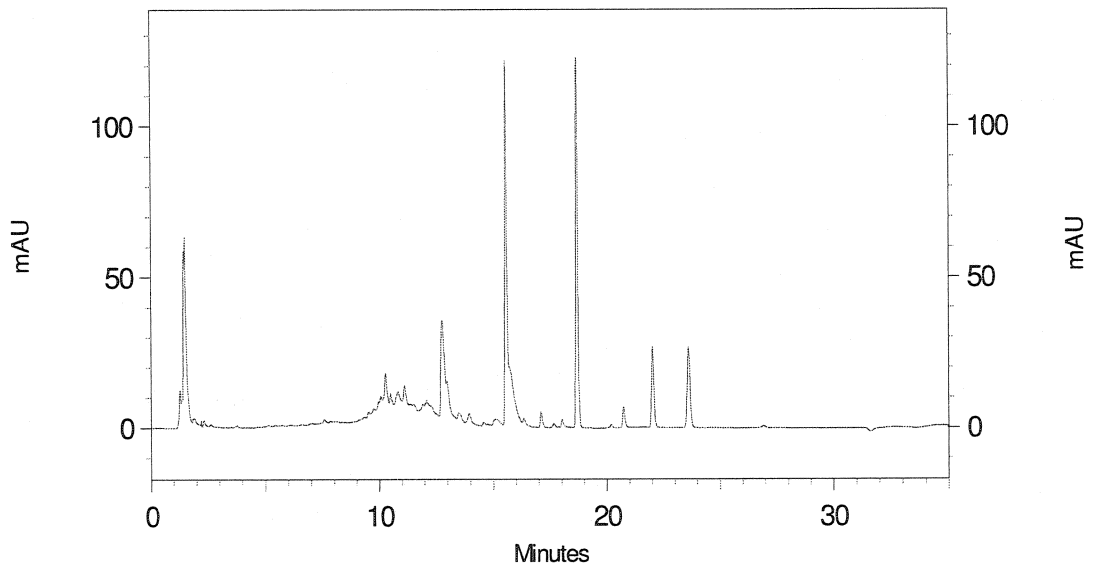


Figure A2 Analyse HPLC d'un extrait racinaire de Catharanthus roseus.
Élution à 2 mL/min avec un mélange Acétonitrile / Tampon Acétate 25 mM pH=6.
Détection UV à 330 nm.

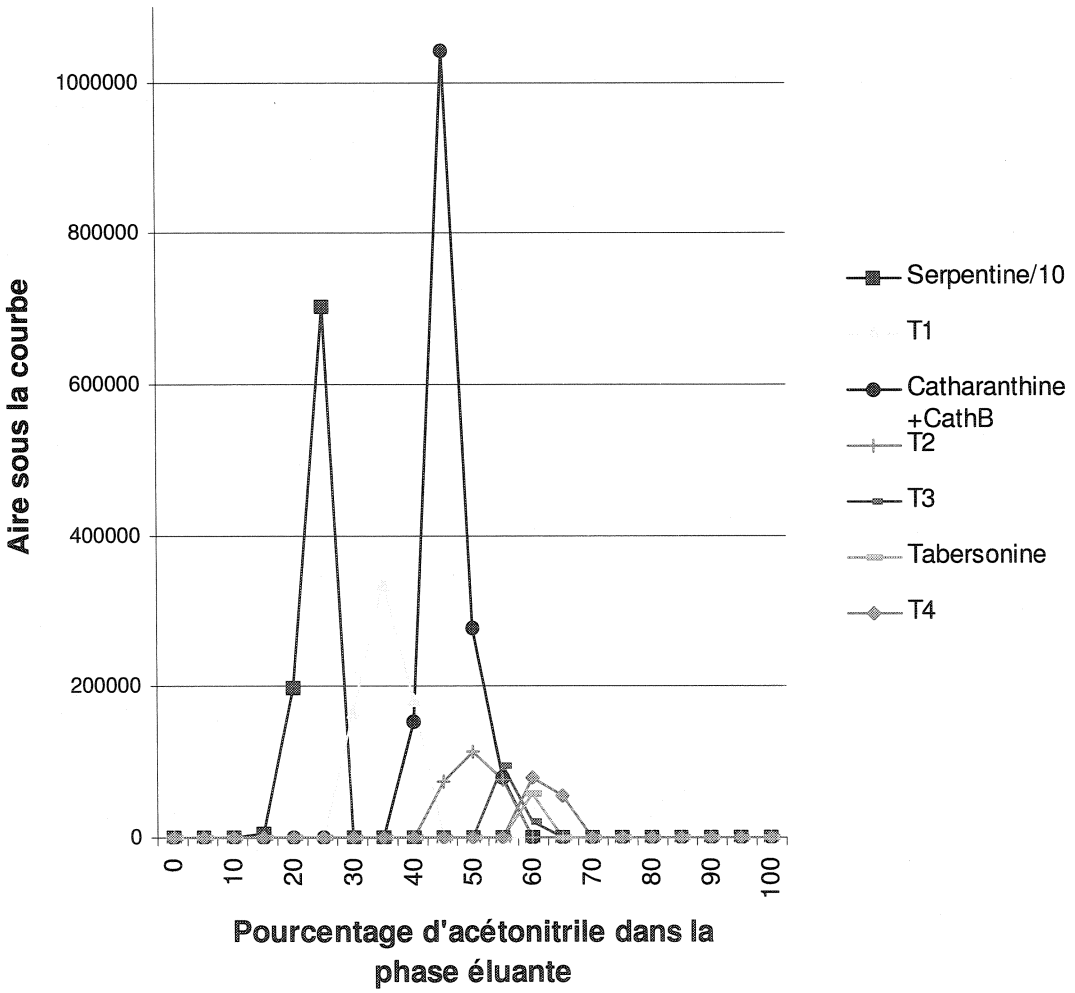
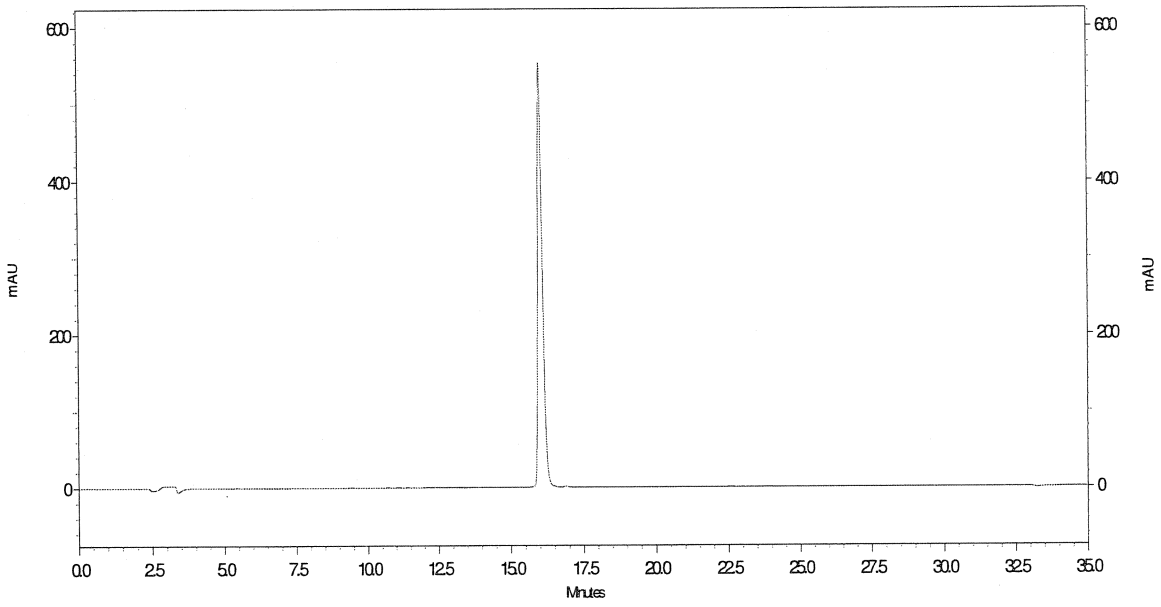


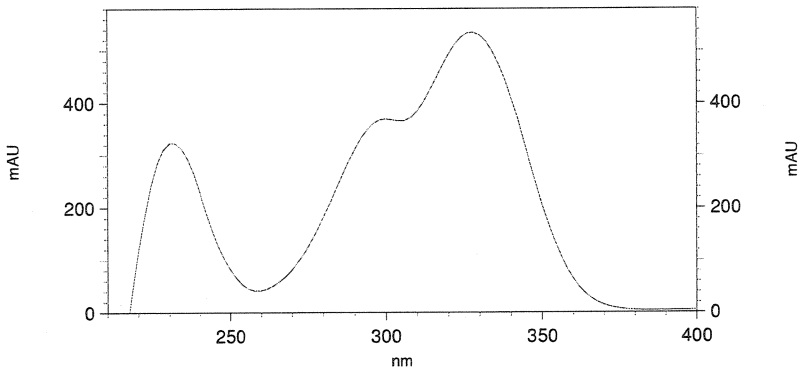
Figure A.3 Élution séquentielle des composés présents dans un extrait racinaire de *C. roseus* après séparation sur colonne extractive SPE C18.
Chaque élution a été analysée par HPLC afin d'en déterminer la composition.

Annexe A.1 Protocole de séparation d'alcaloides d'un extrait racinaire de *C. roseus* par élution séquentielle sur colonne d'extraction en phase solide C18E

1. Extraire au méthanol les alcaloides des racines lyophilisées à raison de 1 mL/100mg poids sec de tissus.
2. Évaporer l'extrait sous vide
3. Dissoudre le résidu dans le plus petit volume de méthnaol possible. Soniquer pour améliorer la dissolution
4. Quantifier le volume de liquide dans un cylindre gradué en verre
5. Diluer avec de l'eau déionisée pour obtenir une concentration finale en méthanol de 5% (v/v)
6. Filtrer sur un filtre nylon 0,45 µm (Fisher Scientific, Nepean, Canada)
7. Installer une colonne SPE C18E 300 mg (Phenomenex, Torrance, Ca, USA)
8. Conditionner la colonne avec 3mL d'acétonitrile
9. Rincer avec 3 mL d'eau déionisée
10. Charger l'échantillon à séparer sur la colonne
11. Réaliser un lavage de la colonne avec un mélange Acétonitrile : Tampon Acétate pH 6 (15 : 85). Ce rinçage va éliminer les sucres et les protéines ainsi que les composés les plus polaires présents dans l'échantillon
12. Élution N# 1 : Éluer avec 1,5 mL d'un mélange Acétonitrile : Tampon acétate pH 6 (25 : 75). Cette 1ère élution permet de récupérer la serpentine et les composés associés
13. Élution N# 2: Éluer avec 1.5 mL d'un mélange Acétonitrile : Tampon acétate pH 6 (40 : 60).
14. Élution N# 3: Éluer avec 1.5 mL d'acétonitrile 100%. Cette élution permet de récupérer le composé T1 ainsi que les autres alcaloïdes moins polaires.
15. Les élutions sont ensuite filtrées sur filtre PTFE 0,45 µm dans des vials HPLC.
16. Les élutions sont séparées par HPLC semi-préparative en utilisant la méthode SemiPrep_Indoles_steveacétate.met

Analyse de pureté aprés purification
Méthode d'analyse : Indoles_steve_acetate
Nom du composé : T1
PDA 332 nm

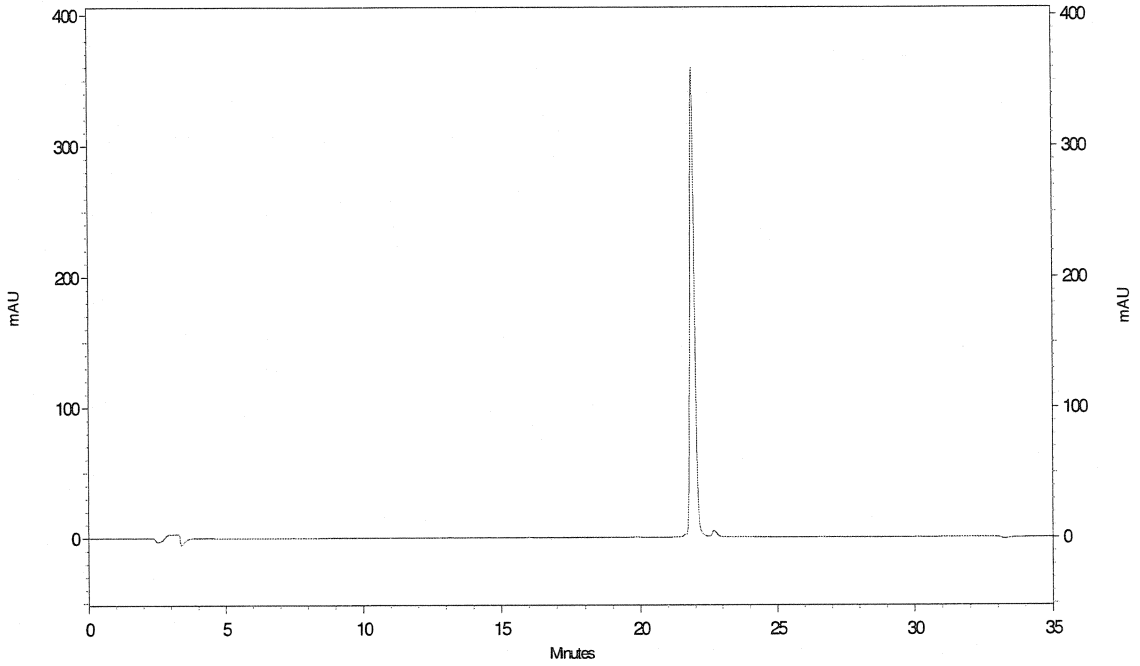


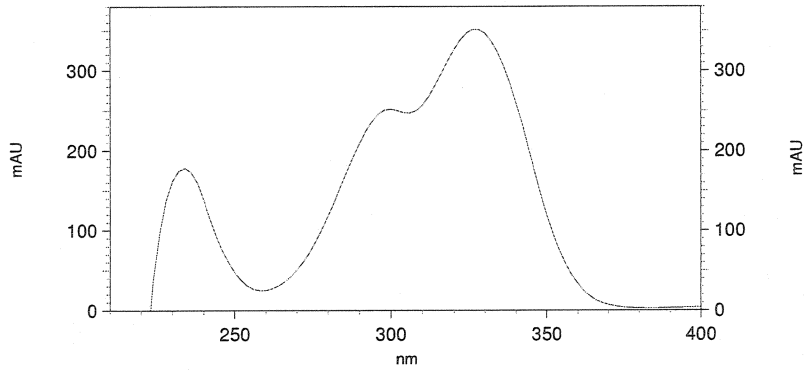


Spectre UV à 15.98 min

Figure A.4 Analyse de pureté du composé T1 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*.

Analyse de pureté aprés purification
Méthode d'analyse : Indoles_steve_acetate
Nom du composé : T2
PDA 332 nm

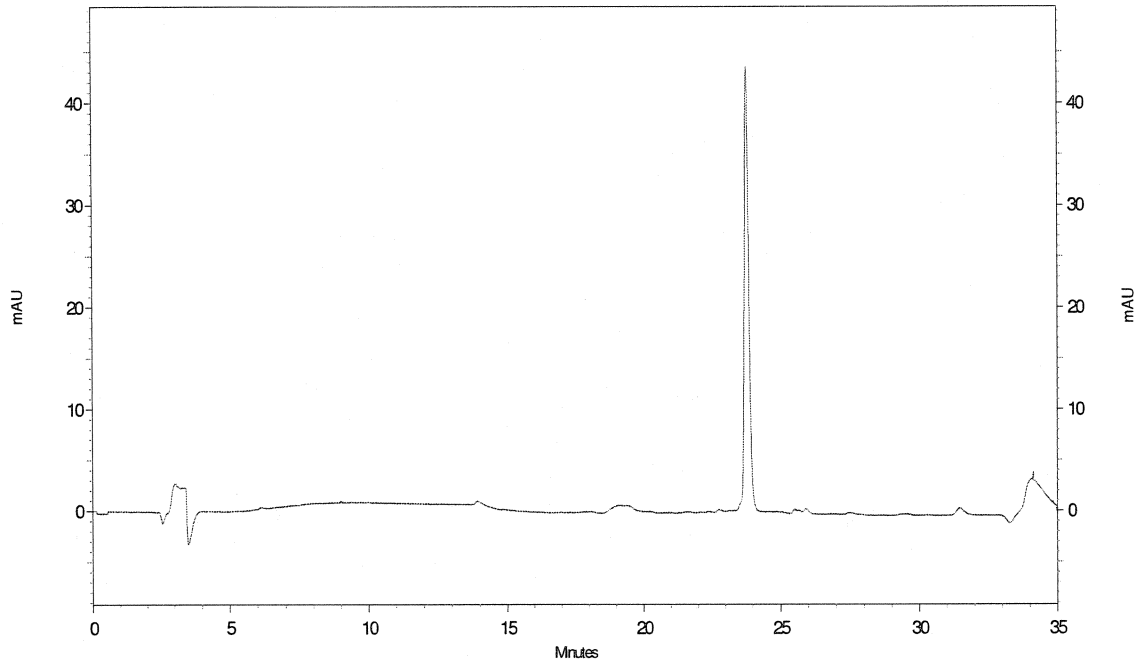


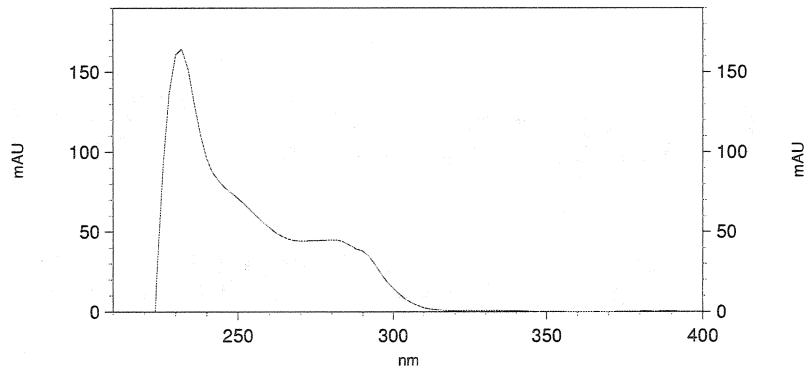


Spectre UV à 21.91 min

Figure A.5 Analyse de pureté du composé T2 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*

Analyse de pureté aprés purification
Méthode d'analyse : Indoles_steve_acetate
Nom du composé : R1
PDA 285 nm

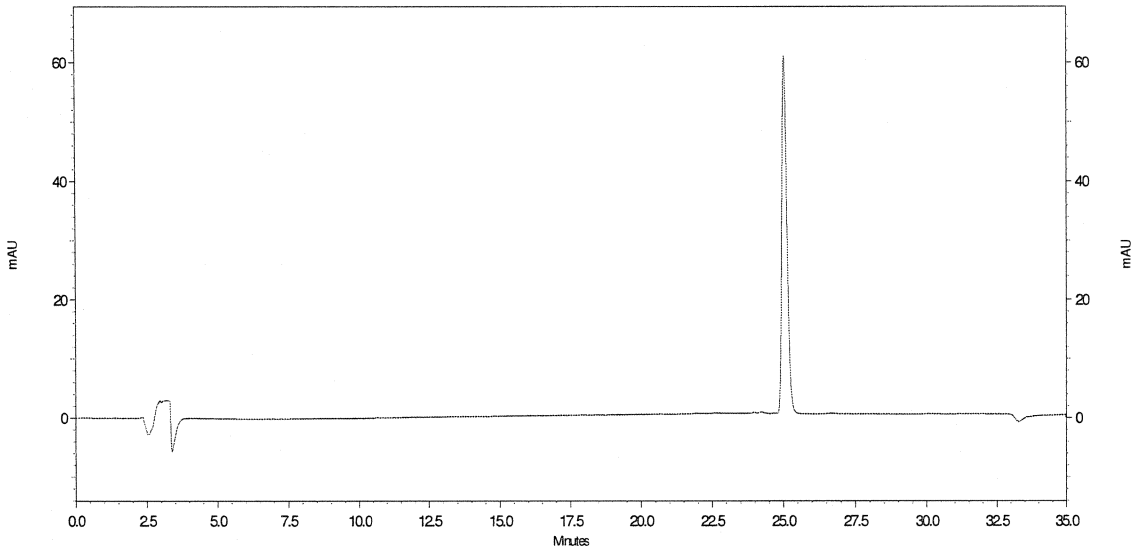


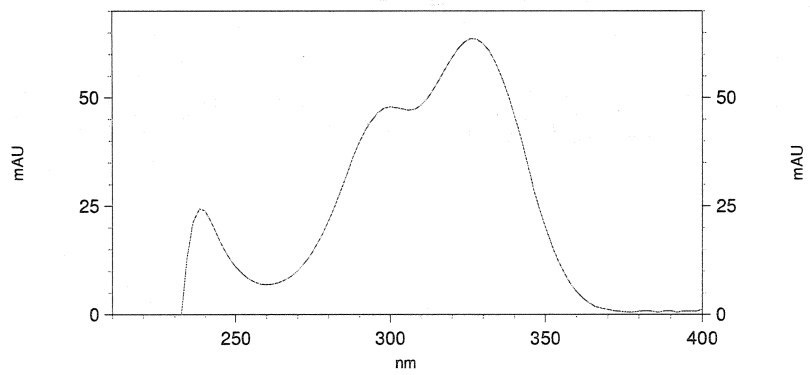


Spectre UV à 23.77 min

Figure A.6 Analyse de pureté du composé R1 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*.

Analyse de pureté après purification
Méthode d'analyse : Indoles_steve_acetate
Nom du composé : T3
PDA 332 nm

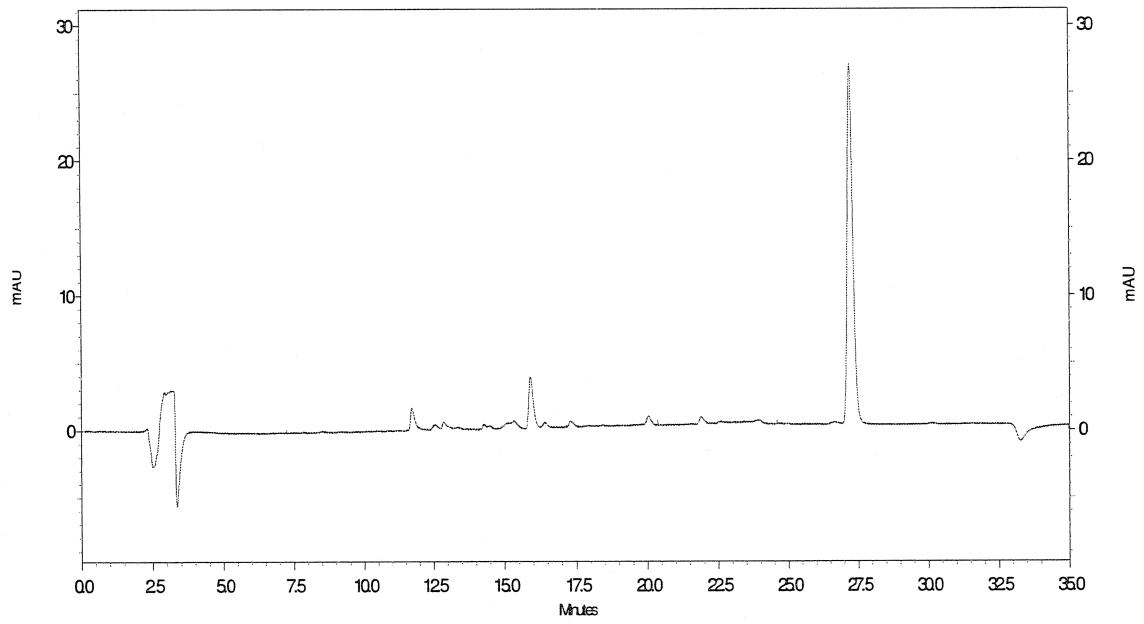


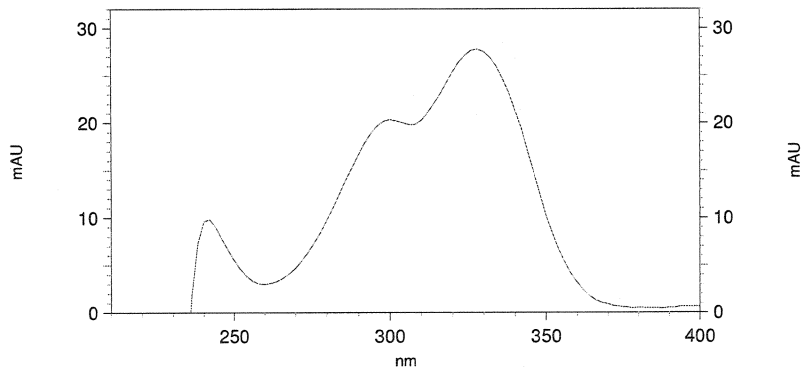


Spectre UV à 25.03 min

Figure A.7 Analyse de pureté du composé T3 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*.

Analyse de pureté aprés purification
Méthode d'analyse : Indoles_steve_acetate
Nom du composé : Tabersonine
PDA 332 nm

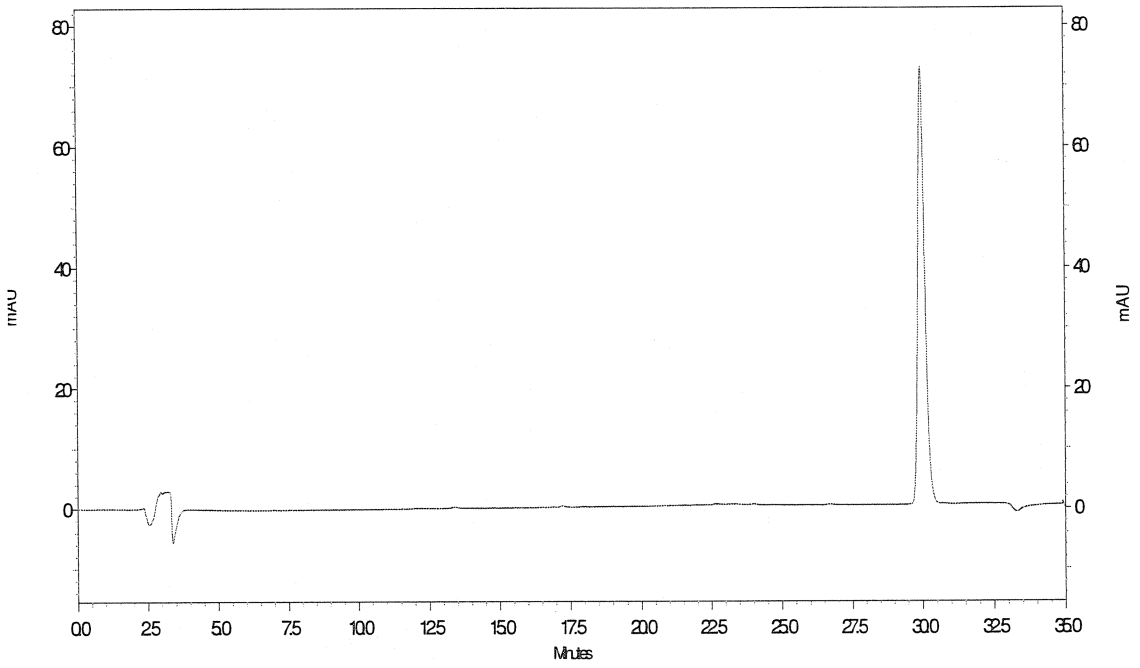


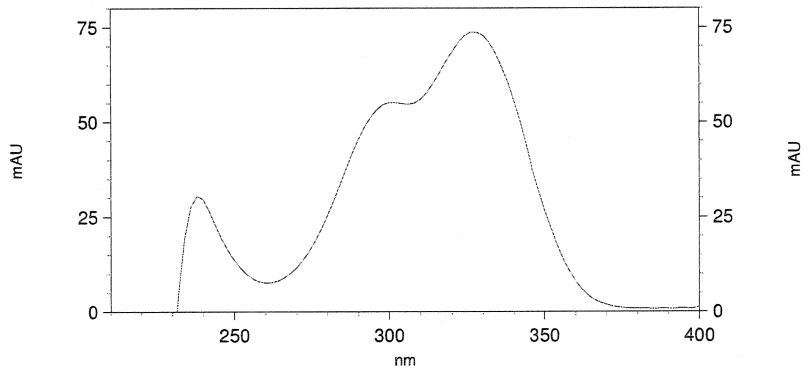


Spectre UV à 27.22 min

Figure A.8 Analyse de pureté du composé Tabersonine après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*.

Analyse de pureté aprés purification
Méthode d'analyse : Indoles_steve_acetate
Nom du composé : T4
PDA 332 nm





Spectre UV à 29.99 min

Figure A.9 Analyse de pureté du composé T4 après séparation par HPLC semi-préparative d'un extrait racinaire de *C. roseus*.

Annexe B. Modification du métabolisme secondaire de *C. roseus* par génie génétique

Séquence de la protéine D4H

MPKSWPIVISSHSFCFLPNSEQERKMKDLNFHAATLSEEESLRE

LKAFDETKAGVKGIVDTGITKIPRIFIDQPKNLDRISVCRGKSDIKIPVINLNGLSSN

SEIRREIVEKIGEASEKYGFFQIVNHGIPQDVMDKMVDGVRKFHEQDDQIKRQYYSRD

RFNKNFLYSSNYVLIPGIACNWRDTMECIMNSNQPDPQEFPDVCRDILMKYSNYVRNL

GLILFELLSEALGLKPNHLEEMDCAEGLILLGHYYPACPQPELTFGTSKHSDSGFLTI

LMQDQIGGLQILLENQWIDVPFIPGALVINIADLLQLITNDKFKSVEHRVLANKVGPR

ISVAVAFGIKTQTQEGVSPRLYGPIKELISEENPPIYKEVTVKDFITIRFAKRFDDSS

SLSPFRLNN

Séquence de la partie codante du gène *D4H*

```
 1   atgcctaagt cttggccaat tgtgatatca tctcatagtt tctgttttct tccaaattct
61   gagcaagaaa gaaaaatgaa ggacttgaac tttcatgctg ctacactctc agaagaagaa
121  tctttaaggg aattgaaggc ttttgatgag acaaaggctg gtgtaaaagg gattgtagat
181  actgggataa ccaaaattcc acgtatcttt atcgatcaac caaaaaatct tgaccggatt
241  tcagtgtgta gaggaaaatc cgatatcaag attccagtta taaacttgaa tggcctcagt
301  agcaattcag aaatacggcg tgagattgtg gagaaaattg gagaagcgag tgagaaatat
361  ggattcttcc agatagttaa tcatgggatt ccacaagatg ttatggataa aatggtagat
421  ggagttcgta agtttcatga acaagatgat caaatcaaga gacaatatta ctcccgtgac
481  cgcttcaaca aaaattttct atatagcagt aattacgttt tgattccagg aattgcttgc
541  aattggaggg atactatgga atgcattatg aattctaatc aacctgatcc tcaggaattc
601  ccagatgtat gcagagacat attgatgaag tactcaaatt atgtaagaaa tttggggctt
661  attctctttg aattactatc agaagctttg gggctcaaac caaatcatct tgaagaaatg
721  gattgtgctg aaggacttat acttcttggt cattactacc ctgcatgccc tcaaccagag
781  ttgacatttg ggacaagcaa gcactcagac agtggtttct taaccatact tatgcaggat
841  caaattggcg gccttcaaat tcttcttgag aatcaatgga ttgatgtccc cttcattcct
901  ggagctctag ttattaacat tgcagatctt ttacagctga tcacgaacga caagttcaag
961  agtgtcgaac atagagtact ggcaaacaaa gttggtccga ggatttctgt tgctgttgct
1021 tttggtataa aaacacaaac tcaagaaggg gtttcgccaa gattgtacgg accaattaaa
1081 gagttaatat cagaggaaaa tccacccatt tacaaggagg tcactgttaa agattttata
1141 acaattcgat ttgccaaacg ctttgacgat agctcttcct tatctccttt caggttaaac
1201 aattag
```

Figure B.1. Séquence protéique et séquence codante du gène de la D4H de *C. roseus*.

Séquence de la protéine DAT

MESGKISVETETLSKTLIKPSSPTPQSLSRYNLSYNDQNIYQTC

VSVGFFYENPDGIEISTIREQLQNSLSKTLVSYYPFAGKVVKNDYIHCNDDGIEFVEV

RIRCRMNDILKYELRSYARDLVLPKRVTVGSEDTTAIVQLSHFDCGGLAVAFGISHKV

ADGGTIASFMKDWAASACYLSSSHHVPTPLLVSDSIFPRQDNIICEQFPTSKNCVEKT

FIFPPEAIEKLKSKAVEFGIEKPTRVEVLTAFLSRCATVAGKSAAKNNNCGQSLPFPV

LQAINLRPILELPQNSVGNLVSIYFSRTIKENDYLNEKEYTKLVINELRKEKQKIKNL

SREKLTYVAQMEEFVKSLKEFDISNFLDIDAYLSDSWCRFPFYDVDFGWGKPIWVCLF

QPYIKNCVVMMDYPFGDDYGIEAIVSFEQEKMSAFEKNEQLLQFVSN

Séquence de la partie codante du gène *DAT*

```
   1 atggagtcag gaaaaatatc ggttgagaca gagacactct ccaaaacgtt gatcaaaccc
  61 tcttctccaa ccctcaatc cctcagccgc tataacctct cctacaatga tcaaaacata
 121 taccaaacgt gcgtatccgt tggtttcttt tacgaaaatc ccgacggcat tgaaatttct
 181 acaattcgtg agcagctaca aaattcgctc tcaaaaactc ttgtttctta ttatccattt
 241 gctggaaaag ttgttaaaaa tgactatatc cattgcaatg acgatggaat tgagttcgtg
 301 gaagttcgaa ttcgttgccg catgaatgat attctaaagt atgaattaag atcatatgcc
 361 agagacctag tccttcccaa acgggtaact gttggcagtg aagatactac agctattgtt
 421 caactaagtc attttgattg cggaggtttg gcggttgctt ttggcatatc tcacaaagtt
 481 gctgatggag gtacaattgc ttcgtttatg aaggattggg ctgcttctgc atgctattta
 541 tcttcttctc atcacgtacc aactccgtta ttggtttctg attccatatt tccacgtcaa
 601 gataatataa tttgtgaaca atttcctacc tccaaaaatt gtgtggaaaa gacatttatc
 661 ttccctccgg aagccataga aaagttaaaa tctaaggccg ttgagtttgg tattgagaaa
 721 cctactcgag tagaggtttt gactgctttt ctcagtcgat gtgccacggt agcagggaaa
 781 tcagcagcca agaataataa ttgtggccaa tctttgccat ttccagtact ccaagctatt
 841 aatttacgtc caattttgga actcccacaa aattctgtgg gaaatttggt ttcaatttat
 901 ttctcacgta caattaaaga aaatgattat ctcaatgaaa aggaatatac aaaactagtg
 961 attaatgagc taaggaaaga aaaacaaaag ataaagaatc tttcccgaga aaagcttact
1021 tatgtagcac aaatggaaga gttcgtaaaa agcttgaaag agtttgacat tagcaacttt
1081 ttggatatcg atgcttacct ttctgatagt tggtgtagat ttccctttta cgacgttgat
1141 tttggatggg gaaagccgat atgggtatgc ttgtttcaac cctatataaa aaattgtgtt
1201 gttatgatgg attatccatt tggagatgat tatggaatcg aagcaatagt ttcctttgaa
1261 caagaaaaga tgtctgcctt tgagaagaac gaacagctac ttcaatttgt ttctaattaa
```

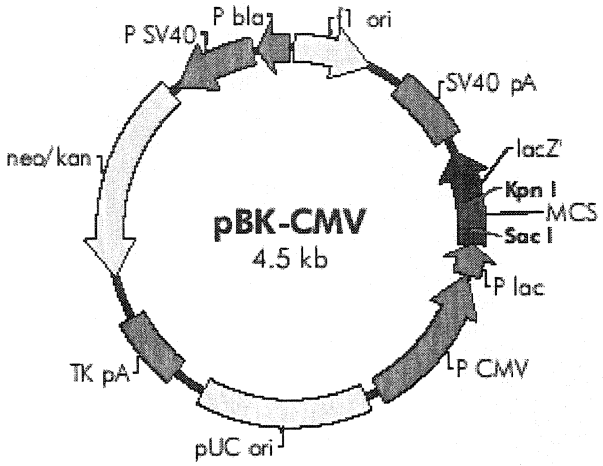
Figure B.2. Séquence protéique et séquence codante du gène de la DAT de *C. roseus*.

Séquence du promoteur *STR 1*

```
1   gatctttatt gtttgtattt tcataattaa ttaatcccta caactgattt caaaaaaaaa
61  tctatttgaa aaaaataatt ctgctactaa aaattttaaa atcttcctat aatatcattt
121 tacgagttta atttatttat tatcatatta aaacaataat attattcatt acagaaattg
181 gacaaacaaa aagatctagc aaaagtatta tgattttaat atatagtcga aaatacgaat
241 tagacaagcg aaacattttg taattaaatc gctatttatc atataattat tttacaataa
301 ttagtattag gaattataat tattaattga tgtataaacc gataaaaata tatttatgat
361 atatacaaaa taaaggaata aaagaatgca taagtatatt ggataagcct ataaatatta
421 ctccacgtgg tacatcactc ttagaccgcc ttctttgaaa gtgatttccc ttggaccttg
481 tttggtgagt ttgtgggctt attatattcc ttcactgtcc ctctaagtat caaaccatac
541 cccatagctg cccctctctg cttcactccc atcatttaca gtcaacaatg
```

Figure B.3 Séquence nucléotidique du promoteur *STR 1* de la strictosidine synthase de *C. roseus*.

f1 origin 24–330
SV40 polyA 469–750
β-galactosidase α-fragment 812–1183
multiple cloning site 1015–1122
***lac* promoter** 1184–1305
CMV promoter 1306–1895
pUC origin 1954–2621
HSV-TK polyA 2760–3031
neomycin/kanamycin resistance ORF 3209–4000
SV40 promoter 4035–4373
***bla* promoter** 4392–4518



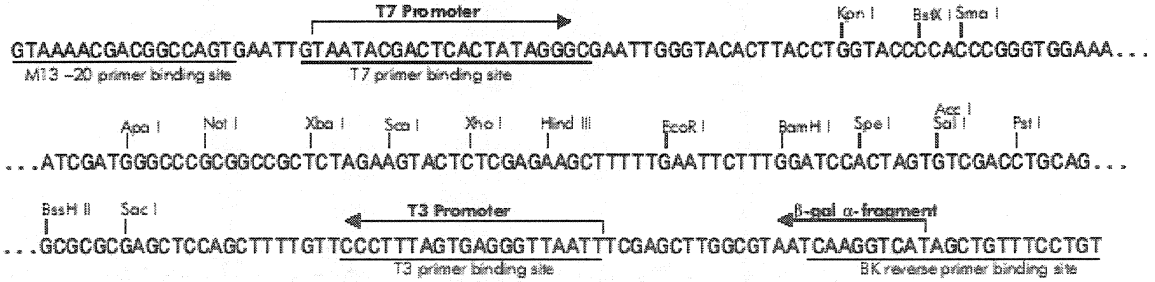


Figure B.4. Carte de restriction du plasmide pBK-CMV

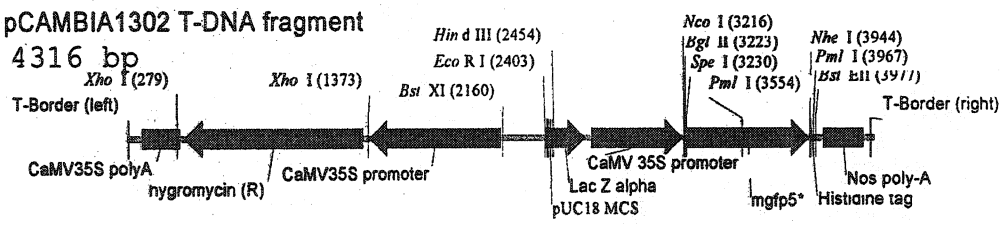


Figure B.5. Carte de restriction du T-DNA du plasmide pCambia-1302

AANAAAATCTATTTGAAAAAATAATTCTGCTACTAAAAATTTTAAAATCTTCC
TATNATATCATTTTACGAGTTTAATTTATTTATTATCATATTAAANCAATAATA
TTATTCATTACAGAAATTGGACAAACAAAAAGATCTAGCAAAAGTATTATG
ATTTTAATATATAGTCGAAAATACGAATTAGACAAGCGAAACATTTTGTAATT
AAATCGCTATTTATCATATAATTATTTTACAATAATTAGTATTAGGAATTATA
ATTATTAATTGATGTATAAACCGATAAAAATATATTTATGATATATACAAAA
TAAAGGAATAAAAGAATGCATAAGTATATTGGATAAGCCTATAAATATTACT
CCACGTGGTACATCACTCTTAGACCGCCTTCTTTGAAAGTGATTTCCCTTGGA
CCTTGTTTGGTGAGTTTGTGGGCTTATTATATTCCTTCACTGTCCCTCTAAGT
ATCAAACCATACCCCATAGCTGCCCCTCTCTGCTTCACTCCCATCATTTACAG
TCAACA**CCATGG**TAGATCTGACTAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGT
TGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTG
TCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACTTACCCTTAAATT
TATTTGCNCTACTGGAAAACTACCTGTTCCGNGGCCNACACTTGTCNCTACTT
TCNCTTANGGGGGTCNANGCNTTTCAGATACCCNGATCNTNTGAG

Figure B.6. Séquençage de la construction p1302-Str1 avec l'amorce sens du promoteur *STR1*

Le codon initiateur est indiquée en gras. Le site de restriction NcoI est souligné. La partie en noir appartient au promoteur *STR1*. La partie en vert constitue la partie 5' du gène de la mGFP5.

Annexe C. Mesures de fluorescence 2D de racines transformées de *C. roseus*

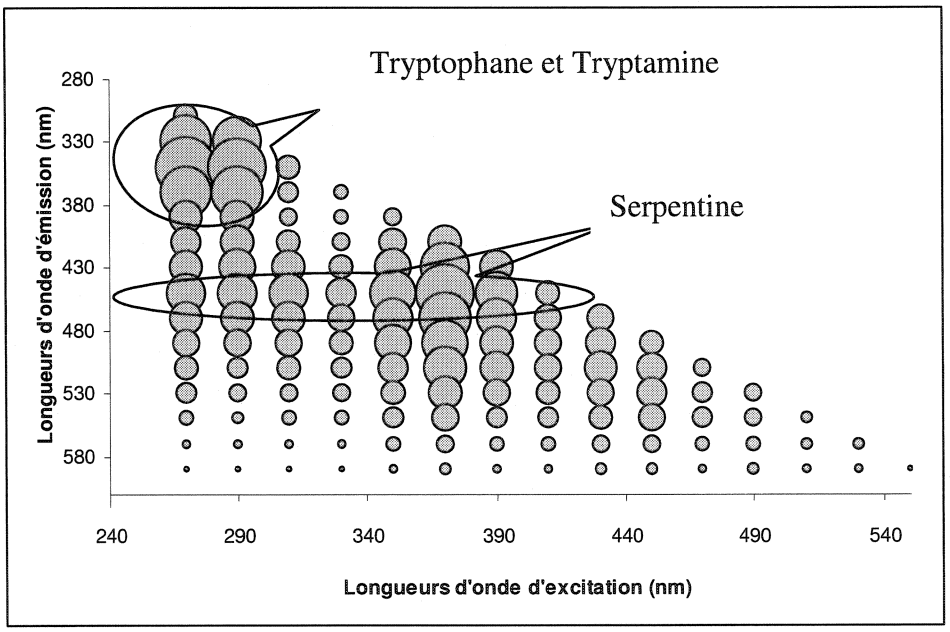


Figure D1. Spectre de fluorescence 2-dimensions (excitation / emission) de racines transformées de C. roseus après 72 h d'élicitation à l'acide jasmonique à 25 mg/L
Les zones de fluorescence du tryptophane et de la tryptamine, ainsi que celles de la serpentine, sont indiquées (obtenu par la sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde).

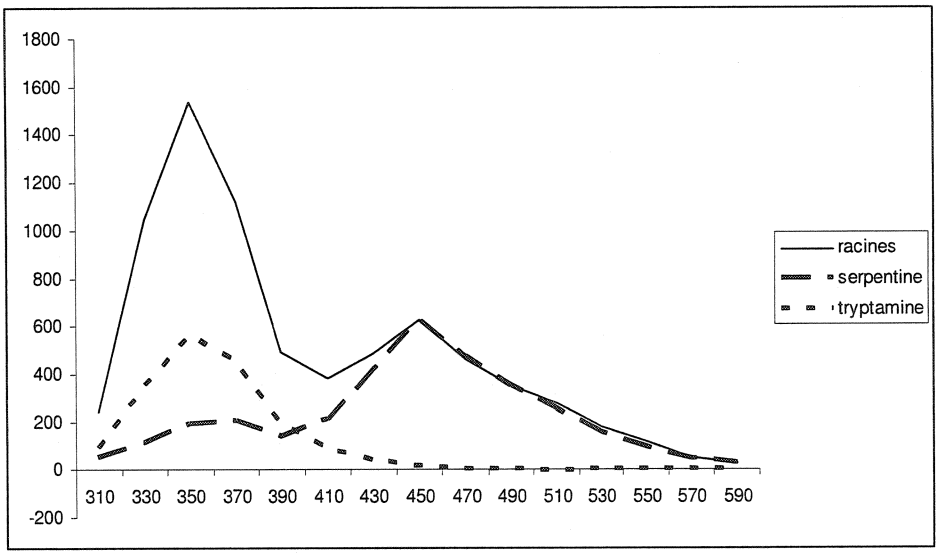


Figure D2. Spectre d'émission de fluorescence des racines, de la tryptamine pure et de la serpentine pure pour une excitation à 270 nm
(obtenu par la sonde à fluorescence multi-longueurs d'onde)