

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'ÉLICATION D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE DE *CATHARANTHUS*
ROSEUS POUR LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES INDOLES TERPÉNOÏDES

SÉBASTIEN SARRAILH
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

©Sébastien Sarrailh, 2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-47686-4
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-47686-4

NOTICE:

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

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

AVIS:

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

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

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

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

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

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


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DE L'ÉLICITATION D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE DE *CATHARANTHUS*
ROSEUS POUR LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES INDOLES TERPÉNOÏDES

présenté par : SÉBASTIEN SARRAILH
en vue de l'obtention du diplôme de : MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LEGROS, Robert, Ph.D., président
M. PERRIER, Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche
M. SIROIS, Joël, Ph.D., membre et codirecteur de recherche
M. BUSCHMANN, Michael, Ph.D., membre

*Une vie de flash en flash
Clip et club et clop et fast food
Fastoche speed ou calmant
Mais fast, tout le temps zaf le vide
Et l'angoisse*

Les choses
J.-J. Goldman

REMERCIEMENTS

Je veux remercier tout particulièrement Philippe (« Gilles ») Lessard et Sarah Galipeau pour leur aide remarquable et leur complicité au laboratoire tout au long de ma maîtrise. Vous avez vraiment rendu ces deux années chez Phytobiotech amusantes et enrichissantes! Je tiens aussi à remercier profusément mes collègues de laboratoire Stephane (« Ti-Cœur»), Annie, Martin (« Neo »), Steve (« Fezz »), David (« Badaboum »), Matthieu, Dominic (« Monroe »), Danny et Martin pour avoir rendu toutes ces heures de laboratoire aussi agréables. Félicitations à tous d'avoir enduré mes « Marathons de Musique Médiocre»!

Je veux également remercier grandement tous les employés et stagiaires des différents départements de Phytobiotech m'ayant aidé, de près ou de loin, par leur soutien technique ou moral durant ma maîtrise. En particulier, je veux souligner l'aide précieuse de Stephane, Francis, Serge, Benoit, Julie et Julie-Andrée pour toutes les analyses HPLC effectuées durant ma maîtrise. Votre aide m'a sauvé un temps inestimable et je vous en remercie grandement. Un merci spécial aussi à M. Robert Williams pour sa sagesse et son attitude rafraîchissante.

Je m'en voudrais de ne pas exprimer ma reconnaissance à mon superviseur de maîtrise, M. Joël Sirois, pour son dévouement à mon projet. Parallèlement, je désire remercier mon directeur de maîtrise, M. Michel Perrier, pour son support inconditionnel dans les moments importants.

Merci au Fond Canadien d'aide à la Recherche (FCAR) et M. Jean Archambault de chez Phytobiotech pour leur soutien financier durant ma maîtrise.

Enfin, je réserve mes plus grands remerciements à mes parents et ami(e)s qui m'ont appuyé tout au long de mes études.

RÉSUMÉ

La culture de cellules de *Catharanthus roseus* est étudiée depuis plusieurs années comme moyen alternatif pour produire des molécules anticancéreuses importantes telles la vinblastine et la vincristine, puisque leur extraction à partir de la plante nécessite environ 20 tonnes de feuilles fraîches pour obtenir un kilo de principe actif. Malheureusement, aucun bioprocédé industriel rentable n'a été réalisé à ce jour principalement à cause de l'incapacité des cultures de suspension cellulaire de *C. roseus* à produire les composés d'intérêt à des rendements suffisamment élevés.

Une stratégie reconnue pour l'augmentation des rendements de production d'une suspension cellulaire végétale est l'utilisation d'éliciteurs pour induire la biosynthèse de métabolites secondaires. L'objectif principal de ce projet de recherche est d'étudier la phase d'élicitation d'une suspension cellulaire de *C. roseus*. L'approche privilégiée dans cette étude est l'analyse des effets de certains paramètres de culture sur les rendements en alcaloïdes indoles terpénoïdes (TIA) obtenus par l'élicitation d'une suspension cellulaire de *C. roseus*.

D'abord, une lignée cellulaire productive (LCR02) a été sélectionnée afin de poursuivre les travaux avec les cellules possédant le meilleur potentiel de production de TIA.

Puis, des expériences réalisées sur l'effet du volume de suspension cellulaire en flacons ont mené à l'adoption du format de flacons de 250 mL pour favoriser les rendements lors d'une phase de production en flacons. Des essais portant sur l'effet de trois différentes concentrations de biomasse à l'élicitation (20, 40 et 60 gWW/L) ont révélé une augmentation significative des rendements de TIA ($Y_{\max}/Y_{\min} = 18$) parallèlement à l'accroissement de la concentration. Les résultats observés suggèrent fortement d'éliciter les cultures de *C. roseus* à des concentrations au-dessus d'un seuil de 40 gWW/L afin d'éviter un effet toxique de l'éliciteur et favoriser les rendements. D'autre part, à une concentration équivalente de biomasse, la méthode d'inoculation des flacons par

transfert de la suspension cellulaire semble plus efficace (meilleur rendement) que la méthode par transfert de cellules filtrées stérilement.

L'étape culminante du choix d'un éliciteur par tamisage en flacons de cinq différents éliciteurs (MeJa, chitine, acide malique, TAB, CeCl_3) à trois niveaux de concentration a permis de distinguer le méthyle jasmonate (50 à 100 μM) comme le meilleur éliciteur du groupe. Une étude de la production de TIA en fonction du temps a par la suite été entreprise en bioréacteurs afin de comparer à nouveau les rendements entre une élicitation au MeJa, à l'acide malique et un contrôle sans éliciteur (milieu de production et résine XAD-7). Cette expérience a confirmé les résultats de Galipeau (Galipeau, 2004) quant à la période maximale de production en bioréacteur de 4 à 6 jours induite par l'élicitation d'une culture au MeJa. Cependant, le fait saillant de ce mémoire a été obtenu alors que la culture sans éliciteur a continué de produire jusqu'à la fin de l'expérience (11 jours) et a résulté au rendement maximum du groupe de recherche (35.7 $\text{mgTIA}_{\text{totaux}}/\text{gDW}$).

Enfin, l'étude de l'état de la suspension cellulaire à l'élicitation a permis d'observer deux phénomènes déjà connus dans le groupe de recherche. D'une part, la production de métabolites secondaires est parfois supérieure après l'absorption complète du phosphate extracellulaire par les cellules. D'autre part, il est souvent avantageux d'éliciter des cellules alors qu'elles sont en pleine phase exponentielle de croissance pour obtenir des meilleurs rendements.

Cependant, la difficulté à reproduire l'état de la suspension cellulaire d'une expérience à l'autre dans le temps a comme conséquence d'empêcher une comparaison légitime des rendements de production de TIA entre elle. Toutefois, pour chaque série d'expériences présentées dans ce mémoire, il est correct de dire que la variabilité des rendements observés est due aux différents paramètres testés. Une meilleure compréhension des effets de l'état de la suspension cellulaire est critique quant à la question de la répétabilité des résultats. Il est primordial de pouvoir recréer les conditions de l'état de la

suspension cellulaire favorables à la production de TIA découvertes à ce jour pour répéter et éventuellement surpasser les meilleurs rendements obtenus.

ABSTRACT

Cell cultures of *Catharanthus roseus* have been studied for several years as an alternative source for the production of key anti-cancer molecules such as vinblastine and vincristine whose extraction from the plant requires up to 20 tons of fresh leaves to obtain one kilo of active ingredient. Unfortunately, to this day, no cost effective industrial bioprocess has been developed successfully due to the fact that *C. roseus* cell cultures are unable to produce the compounds of interest in sufficiently high yields.

A common strategy used to increase the production yields of plant cell cultures is the addition of elicitors to induce the biosynthesis of secondary metabolites. The principal objective of the present research project is to study the elicitation phase of a *C. roseus* suspended cell culture by analyzing the effects of several cell culture parameters on the resulting yields of terpene indole alkaloids (TIA) produced by *C. roseus* cells after elicitation.

First, a *C. roseus* cell line (LCR02) was selected from three possible candidates in order to conduct further testing on the cell line with the highest potential for TIA production.

Next, out of three flask formats (125, 250, 500 mL), the 250 mL flask gave the highest yields and was thus chosen as the best format for conducting flask production experiments. In addition, the effect of three different biomass concentrations (20, 40, 60 gWW/L) at elicitation time were tested and revealed a significant enhancement in TIA outputs ($Y_{\max}/Y_{\min} = 18$) as the concentration increment increased. The results suggested that *C. roseus* cell cultures should be elicited above a 40 gWW/L threshold in order to avoid any toxic effect of the elicitor and achieve higher TIA yields. Concurrently, another experiment showed the benefits of using the cell transfer inoculation method instead of the filtering method on resulting TIA yields after elicitation.

One of the highlights of this study was the discovery that methyl jasmonate (50-100 μM) was the best elicitor following a screening experiment where five different elicitors

(MeJa, chitin, malic acid, TAB, CeCl_3) were tested at three different concentration levels in shake flasks. A subsequent experiment was conducted in bioreactors based on the three best results from the elicitor screening. Hence, the TIA yields through time were studied for MeJa, malic acid and no elicitors (only production medium and XAD-7 resin). This experiment confirmed Galipeau's (Galipeau, 2004) bioreactor results indicating that MeJa elicitation induces a production period of no more than 4 to 6 days. However, the definite highpoint of this study was the achievement of an 11 day bioreactor production phase with no elicitor added leading to the highest TIA yield ever obtained by the research group (35.7 mg/gDW).

Lastly, the study of the suspended cell state at elicitation time made it possible to confirm two phenomena previously observed by the Phytobiotech research group. On one hand, the production of secondary metabolites is sometimes higher after the complete absorption of extracellular phosphate by the cells. On the other hand, better yields are often obtained when plant cells are elicited during their exponential growth phase.

However, the difficulty of reproducing the suspended cell state at elicitation from one experiment to another prevented a legitimate comparison of the TIA production yields among different experiments. Nevertheless, for each series of experiments presented in this research project, the suspended cell state at elicitation was equivalent thus making it possible to draw conclusions about the effects of the culture parameters tested and the related TIA yield results. A better understanding of the effects of suspended cell state on secondary metabolite biosynthesis is critical to the reproducibility of the experiments. Only then will we be able to recreate the most favorable suspended cell state conditions discovered up until now in order to replicate high production yields and eventually exceed them. This will certainly be a giant leap towards the development of an efficient bioprocess.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	IV
REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES ANNEXES	XVII
NOMENCLATURE	XVIII
1 CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 Pervenche de Madagascar.....	1
1.2 Cellules de plantes et biotechnologies	2
1.3 Problématique	3
1.4 Objectifs de recherche.....	4
1.5 Méthodologie	5
2 CHAPITRE 2: REVUE DE LITTÉRATURE.....	6
2.1 Introduction à la culture de cellules végétales	6
2.1.1 Principales caractéristiques des cellules végétales.....	6
2.1.2 Technique de cultures de cellules végétales.....	8
2.2 Métabolisme des cellules végétales	9
2.2.1 Métabolisme primaire	9
2.2.2 Métabolisme secondaire.....	12
2.3 Élicitation	20
2.3.1 Classification des éliciteurs.....	20

2.3.2	Mécanisme général d'éllicitation chez les plantes	27
2.3.3	Mécanisme d'éllicitation spécifique aux TIA	31
3	CHAPITRE 3: MATÉRIELS ET MÉTHODES	34
3.1	Développement et maintien des lignées cellulaires	34
3.2	Milieu de culture	35
3.2.1	Milieu de croissance.....	35
3.2.2	Milieu de production	36
3.3	Préparation des éliciteurs	36
3.4	Préparation de la résine adsorbante.....	37
3.5	Culture en flacons	37
3.5.1	Inoculation.....	38
3.5.2	Élicitation	38
3.6	Culture en bioréacteur	39
3.6.1	Bioréacteur 4 L.....	39
3.6.2	Bioréacteur 7 L.....	41
3.6.3	Contrôle des bioréacteurs	42
3.6.4	Inoculation.....	42
3.6.5	Élicitation	43
3.6.6	Culture en cuvée alimentée	43
3.7	Échantillonnage et mesure	44
3.7.1	Technique d'échantillonnage homogène et stérile.....	44
3.7.2	Concentration de la biomasse humide et sèche.....	44
3.7.3	pH extracellulaire	45
3.7.4	Concentrations des nutriments	45
3.7.4.1	Extracellulaires.....	45
3.7.4.2	Intracellulaires.....	45
3.7.5	Concentrations de métabolites secondaires.....	46
3.8	Analyse HPLC	46
3.8.1	Ions.....	46

3.8.2	Glucides.....	47
3.8.3	Alcaloïdes.....	47
4	CHAPITRE 4: RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	48
4.1	Sélection d'une lignée cellulaire productive de <i>C. roseus</i>	48
4.2	Expérimentation en flacons.....	50
4.2.1	Effet du volume de suspension cellulaire.....	51
4.2.2	Effet de la concentration de biomasse.....	53
4.2.2.1	Effet de la concentration de biomasse en fonction du type d'éliciteur	54
4.2.2.2	Effet de la concentration de biomasse en fonction de la méthode d'inoculation.....	56
4.3	Sélection d'un éliciteur	59
4.3.1	Tamissage d'éliciteurs en flacons.....	59
4.3.2	Validation d'éliciteurs en bioréacteurs.....	64
4.4	État de la suspension cellulaire à l'élicitation.....	71
4.4.1	Effet du temps après la sous-culture	71
4.4.2	Effet du temps après l'inoculation en bioréacteur.....	79
4.5	Étude comparative des rendements.....	87
5	CHAPITRE 5: CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	91
	BIBLIOGRAPHIE	94
	ANNEXES	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 – Classes de métabolites secondaires	14
Tableau 2.2 - Éliciteurs de plantes et de cultures de cellules de plantes	21
Tableau 2.3 – Résumé de résultats de production de TIA par des cellules de C. roseus pour différents éliciteur	23
Tableau 2.4 – Exemples de glucides-éliciteurs et la production de métabolites secondaires	24
Tableau 2.5 – Exemples de métabolites secondaires de plantes induits par des jasmonates	25
Tableau 4.1 – Détail du dosage de la légende de la Figure 4.5.....	61
Tableau 4.2 – Sommaire des minima et maxima de rendements en TIA et principales conclusions pour chaque section	87

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 – Schéma d’une cellule végétale.....	7
Figure 2.2 – Principales voies métaboliques menant à la biosynthèse de 3 grandes classes de métabolites secondaires.....	15
Figure 2.3 – Voies métaboliques des TIA de <i>C. roseus</i>	19
Figure 2.4 – Voies métaboliques des jasmonates.....	30
Figure 2.5 – Modèle pour la transduction de signaux.....	33
Figure 3.1 – Bioréacteur 4 L	40
Figure 3.2 – Bioréacteur 7 L	41
Figure 4.1 – Rendements spécifiques de TIA en fonction de la lignée cellulaire.....	49
Figure 4.2 – Rendements spécifiques de TIA en fonction du volume du flacon.	52
Figure 4.3 – Rendements spécifiques de TIA en fonction de la concentration de biomasse et du type d’éléciteur.....	55
Figure 4.4 – Rendements spécifiques de TIA en fonction de la méthode d’inoculation et de deux éléciteurs différents	58
Figure 4.5 – Rendements spécifiques en fonction de différents agents éléciteurs et leur concentration.....	62
Figure 4.6 – Rendements spécifiques de TIA en fonction du temps et de l’éléciteur pour trois cultures en bioréacteurs	66
Figure 4.7 – Taux de consommation des principaux nutriments en fonction du temps et de l’éléciteur.....	68
Figure 4.8 – Rendements spécifiques en fonction de l’éléciteur et du mode de production.....	70
Figure 4.9 – Rendements en fonction du temps après la sous-culture des flacons-mères et comparaison avec des indicateurs de l’état de la suspension cellulaire au moment de l’élécitation.....	73
Figure 4.10 – Proportion des différents TIA spécifiques pour chaque point de production	73
Figure 4.11 – Suivi de l’état de la suspension cellulaire en fonction du temps.	74

Figure 4.12 – Rendements en fonction du temps après l'inoculation du bioréacteur	81
Figure 4.13 – Proportion des différents TIA spécifiques à chaque point de production.	82
Figure 4.14 – Suivi de l'état de la suspension cellulaire en fonction du temps	83
Figure 4.15 – Comparaison de rendements en TIA totaux en fonction de la concentration de la biomasse	89
Figure D.1 – Données d'échantillonnage des bioréacteurs	112
Figure D.2 – Suite des données d'échantillonnage des bioréacteurs	113
Figure E – État initial de la suspension cellulaire	114

LISTE DES ANNEXES

Annexe A : Composition du milieu B5 (Gamborg et coll., 1968).....	108
Annexe B : Composition du milieu de production MP-LCR	109
Annexe C : Éliciteurs.....	110
Annexe D : Expérience validation d'éliciteurs en bioréacteurs.....	111
Annexe E : Comparaison des paramètres de l'état de la suspension cellulaire à l'inoculation	114

NOMENCLATURE

WW	Concentration de cellules humides	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
DW	Concentration de cellules sèches	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
W/D	Ratio de la concentration de cellules humides sur concentration de cellules sèches (WW/DW)	--
[X]	Concentration de biomasse	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Y	Rendement	$\text{mg}\cdot\text{gDW}^{-1}$
q_{nut}	Taux de consommation d'un nutriment	$\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$
TIA	Alcaloïde indolique terpénoïde	--
MeJa	Méthyle jasmonate	--

CHAPITRE 1

1 INTRODUCTION

De tout temps, l'homme a utilisé les plantes médicinales. Pour le meilleur et pour le pire. De certaines, il a extrait des poisons pour chasser ou guerroyer. Mais il a aussi très tôt observé leurs propriétés et compris les bienfaits qu'il pouvait en tirer. L'art de soigner avec les plantes traverse ainsi les siècles, les cultures et les continents. Comme toutes les ressources naturelles, les plantes médicinales sont devenues un sujet d'étude et de convoitise, de culture et d'exploitation industrielle. Mais le parcours entre la plante et le médicament, entre le chasseur d'espèces inconnues et les robots pharmaceutiques, est long et semé d'embûches, de fausses pistes, d'heureuses surprises aussi (Les Plantes Médicinales, Catherine Monnier, 2002).

1.1 Pervenche de Madagascar

La pervenche de Madagascar est aussi connu sous trois noms d'origines botaniques : *Catharanthus roseus*, *Vinca rosea* et *Lochnera rosea* (Svoboda, 1983). Membre de la famille des Apocynacées, la pervenche du Madagascar est une petite plante rampante buissonnante aux petites fleurs roses ou blanches. Contrairement à ce que laisse entendre son nom, elle ne pousse pas seulement sur cette île africaine de l'Océan Indien dont elle est néanmoins originaire. En fait, elle se développe facilement sous n'importe quel climat tropical. Présentement, son exploitation à grande échelle est réalisée principalement en Inde en plus de Madagascar (Monnier, 2002).

Autrefois nommée « violette de sorcier », par référence à son utilisation dans les sortilèges et philtres d'amours, la pervenche de Madagascar a toujours été reconnue pour ses propriétés biologiques intéressantes. Les Malgaches comme les Polynésiens et les Philippins connaissaient depuis longtemps une vertu de la pervenche : cette plante pouvait servir de coupe-faim (Monnier, 2002). Certains pensaient qu'elle faisait ainsi baisser le taux de sucre sanguin et pourrait aider les diabétiques. De plus, plusieurs espèces *Vinca* étaient reconnues pour leur contenu en alcaloïdes, molécules d'origines végétales contenant de l'azote, et l'expression de propriétés sédatives et antihypertenseurs (Svoboda, 1983).

Dans les années 1950, des travaux de recherche ont tout d'abord porté sur la possibilité d'utiliser des extraits de pervenche de Madagascar pour en faire un médicament contre le diabète. Ces premières expériences n'ont cependant rien révélé dans ce sens. Toutefois, la poursuite de travaux sur les alcaloïdes de la pervenche dans le cadre d'un programme de criblage pour le cancer a permis de découvrir l'activité de deux molécules anticancéreuses, soit la vinblastine et la vincristine (Monnier, 2002). Depuis, ces deux alcaloïdes indoles terpénoïdes sont particulièrement utiles dans la lutte contre la leucémie et le cancer des ganglions (maladie de Hodgkin). D'autre part, des molécules comme l'ajmalicine, la serpentine et la vincamine ont aussi été isolées de la pervenche de Madagascar et s'avèrent utiles comme vasodilatateurs et antihypertenseurs.

Malheureusement, l'utilisation de cette plante pour la production à grande échelle de médicaments contre le cancer à base de vinblastine et de vincristine se heurte à un défi majeur : il faut environ 20 tonnes de feuilles fraîches pour obtenir un kilo de principe actif (Monnier, 2002). Au moins deux firmes commercialisent à ce jour des médicaments anti-cancer à base de la pervenche de Madagascar. Elli Lilly & Co. commercialise la vincristine sous le nom d'OncovinTM, tandis que les laboratoires Pierre Fabre synthétisent la vinorelbine à partir de précurseurs dans la plante pour la vendre sous le nom de NavelbineTM.

1.2 Cellules de plantes et biotechnologies

Les origines de la culture de cellules végétales remontent à la fin des années 1960 dans le but d'étudier et produire des métabolites secondaires de plantes. Ces molécules jouent un rôle majeur dans la survie et l'adaptation des plantes à leur environnement et représentent une importante source de molécules biologiquement actives pour l'industrie pharmaceutique. Différentes stratégies ont dès lors été employées afin de tenter d'améliorer la production de métabolites secondaires d'intérêt commercial. À cette fin, la majorité des études ont porté sur l'utilisation de cultures de cellules végétales indifférenciées, mais l'utilisation de cultures de tissus et de racines (*hairy roots*) a également soulevé un grand intérêt.

Des procédés spécialisés ont été inventés afin de répondre aux exigences particulières de la culture de cellules en bioréacteurs. Malheureusement, malgré tous les efforts réalisés durant les 30 dernières années, les biotechnologies végétales ont mené à très peu de débouchés commerciaux pour la production de métabolites secondaires utiles. En comparaison, d'autres secteurs de la biotechnologie tels la culture de cellules de bactéries ou de mammifères ont obtenu beaucoup de succès. L'insuccès du domaine de la culture de cellules végétales est essentiellement dû à l'obtention de faibles rendements de production en métabolites secondaires. Par ailleurs, ces mauvais résultats sont possiblement attribuables au manque de connaissance des chemins métaboliques menant à la biosynthèse des composés d'intérêt et le manque d'installations adaptées à la culture de cellules de plantes (Bourgau et coll., 2001).

1.3 Problématique

La culture de cellules de *Catharanthus roseus* est étudiée depuis plusieurs années comme moyen alternatif pour produire des molécules thérapeutiques importantes telles la vinblastine et la vincristine (Moreno et coll., 1995), ou à tout le moins certains de leurs précurseurs potentiellement utiles comme l'ajmalicine, la serpentine, la catharanthine et la tabersonine. Malheureusement, aucune application industrielle rentable n'a été réalisée à ce jour à cause de plusieurs limitations biologiques et technologiques (Verpoorte et coll., 1999; Moreno et coll., 1995).

D'abord, une limitation majeure provient de l'obtention de rendements nuls ou faibles des composés d'intérêt commercial. En fait, la biosynthèse des deux molécules antitumorales, la vinblastine et la vincristine, n'a jamais été décelée dans les cultures de cellules de *C. roseus*, tandis que celle de l'important précurseur vindoline, présent principalement dans les feuilles de *C. roseus*, n'a été détectée que très rarement dans des cultures de cellules différenciées de *C. roseus* (Misawa et Goodbody, 1996; O'keefe et coll., 1997). La sélection de lignées cellulaires hautement productives en réponse au problème de faibles rendements des autres composés utiles de *C. roseus* fait malheureusement aussi face à des problèmes d'entreposage des cellules et à des

variations génétiques (*semiclonal variance*) après un grand nombre de sous-cultures (Zhao et coll., 2000).

Une importante stratégie employée pour l'augmentation des rendements de production est l'utilisation d'éliciteurs biotiques ou abiotiques pour induire la biosynthèse des métabolites secondaires de *C. roseus*. Plusieurs études ont déjà fait la preuve des bienfaits de l'élicitation sur l'accroissement des taux de production dans des cultures de cellules végétales (Smith et Banks, 1986; Threlfall et Whitehead, 1988; Hamerski et coll., 1990), dont plusieurs sur des cellules de *C. roseus* (Zhao et coll., 2000a; Zhao et coll., 2001a; Namdeo et coll., 2002). Cependant, un éliciteur universel n'a pas encore été identifié, surtout car l'efficacité et le type d'éliciteur idéal semble varier d'une lignée cellulaire à l'autre.

D'autre part, l'induction d'une phase de production de métabolites secondaires dans une culture de cellules végétales met généralement fin à la phase de croissance préalable. Une clef importante dans le travail d'augmentation des rendements de production de métabolites secondaires est la détermination du meilleur moment pour induire la phase de production d'une culture cellulaire. Plus précisément, déterminer l'état de la suspension cellulaire qui, après l'élicitation, permettrait la meilleure production possible pour une lignée, un éliciteur et des conditions d'opération fixes.

Sans une optimisation valable des rendements de production de *C. roseus* à petite échelle, les obstacles inhérents à la production à grande échelle demeurent une seconde priorité. D'autant plus que, parallèlement, la mise au point de bioréacteur à grand volume (Fortier, 2004) et de systèmes de contrôle de la production pour la culture de cellules végétales progressent à un rythme encourageant dans certaines entreprises comme Phytobiotech inc.

1.4 Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'étudier la phase d'élicitation d'une suspension cellulaire végétale. L'approche privilégiée pour étudier différents aspects du

processus d'élicitation est par l'analyse des rendements en alcaloïdes indoles terpénoïdes (TIA) d'intérêt obtenus par des cellules de *C. roseus*. L'étude de l'élicitation comprend la réalisation de sous-objectifs distincts. Premièrement, sélectionner l'éliciteur le plus efficace pour induire la production de TIA par un tamisage de différents types d'éliciteurs reconnus dans la littérature. Deuxièmement, investiguer l'influence de la concentration de phosphate extracellulaire et de l'état de la suspension cellulaire au moment de l'élicitation sur la production subséquente de TIA. Troisièmement, étudier l'impact de différents paramètres complémentaires sur l'efficacité d'élicitation et la production de TIA.

1.5 Méthodologie

L'étude de l'élicitation d'une suspension cellulaire de *C. roseus* a été réalisée en effectuant une série d'expériences préliminaires en flacons de petits formats (125, 250, 500 mL) afin de sélectionner une lignée cellulaire productive et fixer certains paramètres de production favorables (format de flacon, concentration de biomasse, méthode d'inoculation).

Par la suite, la sélection d'un éliciteur efficace a été entreprise en commençant tout d'abord par un tamisage d'éliciteurs et de concentrations dans le but de poursuivre les expériences de production subséquentes avec un même éliciteur à une concentration établie.

Finalement, deux expériences ont été réalisées pour comprendre l'influence de l'état de la suspension cellulaire au moment de l'élicitation sur la phase de production et les rendements en TIA d'intérêt.

L'ensemble des informations tirées des résultats des expériences effectuées n'ont malheureusement pas pu être combinés dans le but de valider leur cohérence lors d'une élicitation suprême débouchant dans une production maximale de TIA. Cette situation étant due principalement à un manque de temps lié aux intérêts divergents entre le groupe de recherche chez Phytobiotech inc. et l'étudiant.

CHAPITRE 2

2 REVUE DE LITTÉRATURE

La revue de littérature présentée dans cette section s'organise en trois parties dont la spécificité aux travaux de recherche et le niveau de détail augmentent au fur et à mesure. Premièrement, une brève introduction à la culture de cellules végétales est proposée afin de distinguer les principales caractéristiques physiologiques de ces cellules et d'éclaircir leur méthode de culture. Deuxièmement, le métabolisme des cellules végétales sera exploré de façon à distinguer les rôles du métabolisme primaire et du métabolisme secondaire. Finalement, des informations spécifiques au mécanisme d'élicitation des cellules végétales ont été regroupées afin d'exposer les principales notions au cœur de ces travaux de recherche. Cette dernière partie comprend une classification des différents éliciteurs rapportés dans la littérature, une revue du mécanisme générale d'élicitation des plantes et un aperçu du mécanisme d'élicitation spécifique à la production des molécules d'intérêt par des cellules de *C. roseus*.

2.1 Introduction à la culture de cellules végétales

2.1.1 Principales caractéristiques des cellules végétales

Les informations contenues dans cette section sont tirées de l'ouvrage *Biologie végétale: plantes supérieures* par R.Gorenflot (Gorenflot, 1985).

Les premiers êtres vivants, apparus sur terre il y a environ 3,5 milliards d'années, étaient des bactéries dépourvus de noyau cellulaire : des procaryotes. C'est à partir de ces procaryotes que des êtres plus complexes sont apparus : les eucaryotes. Leur caractéristique essentielle est de posséder un noyau cellulaire qui renferme l'ADN, support de l'information génétique. Tous les animaux et les végétaux sont des eucaryotes.

La cellule végétale se distingue à son tour de la cellule animale par trois caractéristiques cytologiques majeures : les plastes et pigments assimilateurs, la paroi cellulaire et la vacuole (voir Figure 2.1).

Les plastes sont des organites limités par deux membranes. Ils dérivent tous de proplastides et sont de deux types: les leucoplastes et les chromoplastes. Les leucoplastes sont dépourvus de pigments, tels les amyloplastes qui accumulent de l'amidon, une réserve de chaînes carbonées. Les chromoplastes accumulent des pigments spécifiques aux végétaux. Par exemple, les chloroplastes contiennent la chlorophylle qui permet de réaliser la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique par photosynthèse.

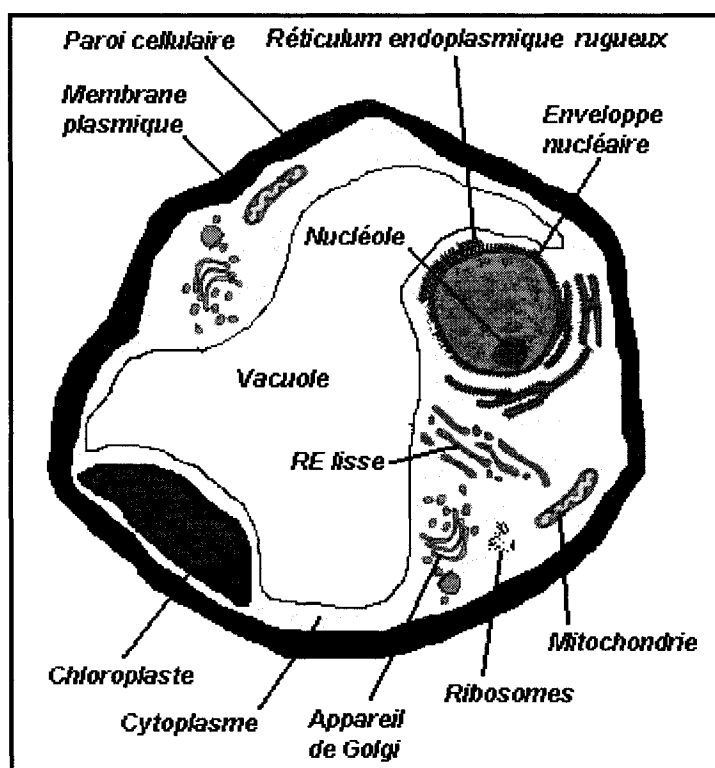


Figure 2.1 – Schéma d'une cellule végétale

La paroi est l'enveloppe la plus externe de la cellule végétale. Elle est essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose et pectine, de protéines pariétales et éventuellement d'autres composés de nature phénolique (lignine et subérine). La paroi assure le maintien et définit la taille et la forme de la cellule végétale. Elle participe à la régulation des relations avec les autres cellules et avec l'extérieur et, de manière passive, au transport, à l'absorption, et à la sécrétion de multiples substances.

La vacuole est très importante chez les végétaux ; elle occupe 80 à 90% du volume cellulaire. Les cellules jeunes possèdent plusieurs petites vacuoles alors que la cellule adulte se caractérise par une vacuole unique. La vacuole est limitée par une membrane : le tonoplasme. Elle contient le suc vacuolaire dont la composition varie en fonction de l'état de la plante. En général, son rôle est dédié au stockage de l'eau, de solutés organiques, d'ions minéraux, de pigments (anthocyanes) et de différents métabolites. À ce titre, la vacuole joue un rôle majeur dans la régulation des grandes fonctions physiologiques de la cellule végétale (pH, pression osmotique, concentrations ioniques, mécanisme de défense, etc.).

2.1.2 Technique de cultures de cellules végétales

Les informations contenues dans cette section sont tirées du chapitre *Callus and cell culture* par Oluf L. Gamborg (Wetter et Constabel, 1982).

Il est possible d'obtenir des cultures de cellules à partir de n'importe quelle espèce de plante. Une culture de cellules est habituellement initiée en plantant un morceau de tissu de plante stérile sur un milieu nutritionnel solidifié avec de l'agar. Quelques semaines plus tard, une calle (tissu formé d'une masse de cellules inorganisée) est ainsi obtenue. L'obtention d'une suspension cellulaire est réalisée en transférant une ou des calles dans un flacon contenant un milieu nutritionnel liquide et en le plaçant sur un agitateur orbital. Graduellement, après quelques semaines et quelques sous-cultures (remplacement du vieux milieu de culture avec du milieu de culture frais), il y a apparition d'une suspension cellulaire.

Le succès de la technologie de culture de cellules végétales et ses applications présentes et futures est attribuable à une meilleure connaissance des besoins nutritionnels des cellules. Les nutriments impliqués dans les milieux nutritionnels de culture de cellules végétales sont regroupés en une classe essentielle et une classe optionnelle. Les nutriments essentiels sont des sels minéraux, une source de carbone (glucides), des vitamines et des hormones (régulateurs de croissance). D'autres composés optionnels sont des composés d'azote inorganique, des acides organiques, des métabolites

additionnels et divers extraits qui peuvent être bénéfiques à la survie et la multiplication des cellules selon le cas.

2.2 Métabolisme des cellules végétales

Le métabolisme des cellules végétales est divisé en deux grandes catégories fonctionnelles : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.

2.2.1 Métabolisme primaire

Le métabolisme primaire peut être décrit comme l'ensemble des modifications chimiques continues des cellules assurant la synthèse des composés organiques de base nécessaire aux mécanismes vitaux des cellules. L'étude du métabolisme primaire des cellules végétales permet une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la croissance cellulaire, l'établissement d'un état physiologique et la formation de précurseurs utilisés subséquemment par le métabolisme secondaire des cellules. Cette revue du métabolisme primaire comprend essentiellement un résumé du rôle des différents nutriments utilisés par les plantes. Les informations contenues dans cette section sont tirées de la revue de littérature du mémoire de C. Tikhomiroff (Tikhomiroff, 2001).

Un nutriment est le terme général utilisé pour désigner tout élément ou composé organique ou inorganique qui peut être utilisé par un organisme sans subir de transformation avant son assimilation par les cellules. Les nutriments sont généralement classés en glucides, lipides, protéines, vitamines, sels minéraux et autres composés organiques métabolisables. Chez les plantes, la principale source de nutriments provient de sels minéraux.

Sels minéraux généraux

Le rôle essentiel du potassium est de participer au gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane plasmique grâce à sa concentration cytoplasmique intracellulaire élevée qui est de l'ordre de 100 mM (Clarkson et Hanson, 1980).

Le chlore assure l'électroneutralité du cytosol (Clarkson et Hanson, 1980). Il intervient également dans certaines réactions photosynthétiques (Haenel, 1984). Il jouerait également un rôle dans la division cellulaire des feuilles et des racines (Terry, 1977).

Le calcium est un messager secondaire pour de nombreux mécanismes de réponse aux signaux environnementaux et hormonaux (Hepler et Wayne, 1985). Il peut être séquestré par la calmoduline, une protéine cytoplasmique. Le complexe calcium-calmoduline est impliqué dans la régulation de nombreuses voies métaboliques associées à la réponse à un signal (Sanders et coll., 1999).

Le magnésium est aussi un messager secondaire impliqué dans la régulation de l'expression de gènes (Prescott, 1993) et joue un rôle dans l'activation des enzymes impliqués dans la respiration, la photosynthèse et la synthèse d'ADN et d'ARN (Taiz et Zeiger, 1998).

Le soufre est utilisé pour les réactions d'oxydoréduction (Bouma, 1975) et est intégré dans deux acides aminés importants, la méthionine et la cystéine. Enfin, il entre dans la composition de plusieurs cofacteurs comme la coenzyme A (Michal, 1999).

Le rôle de trois types de nutriments a été étudié plus en profondeur à cause de leur importance physiologique : le phosphate, l'azote sous la forme d'ammonium et de nitrate et le saccharose.

Phosphate

Le phosphate est utilisé par la cellule sous forme d'orthophosphate (PO_4) ou phosphate inorganique (P_i), de pyrophosphate ou de polyphosphates (plantes inférieures). Le phosphate possède 3 différents pK_a : 2.16, 7.21 et 12.32. Dans les conditions physiologiques des cellules de plantes ($5 < \text{pH} < 7$ selon les compartiments cellulaires), le phosphate se présente sous deux formes dominantes : H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} . La cellule ne peut absorber et stocker que la forme monovalente H_2PO_4^- (Bieleski, 1973).

Le phosphate entre dans la composition des phospholipides, des nucléotides, des nucléosides, des acides nucléiques et de nombreux intermédiaires de réactions

phosphatées. Outre ce rôle structural, le phosphate contenu dans les nucléotides triphosphatés tels que l'ATP et le GTP fourni à la cellule des molécules ayant deux liaisons phosphatées extrêmement riches en énergie. Ces molécules servent de navettes énergétiques. Par exemple, l'hydrolyse d'ATP en ADP libère une enthalpie libre standard de 33 kJ/mol (Taiz et Zeiger, 1998). Inversement l'énergie libérée par la dégradation de molécules complexes (ex : glucides) est utilisée pour la régénération d'ATP. De plus, le P_i régule l'activité des protéines par leur phosphorylation et leur déphosphorylation. Selon son état de phosphorylation, une protéine est soit active ou inhibée.

Azote (ammonium & nitrate)

L'azote est extrêmement important pour la plante car les acides aminés contiennent tous au moins un atome d'azote. Ils servent dans la production de protéines, de nucléotides, d'acides nucléiques, de facteurs de croissance et d'autres métabolites primaires (Wink, 1997). La plante est capable de se servir du nitrate (NO_3^-), de l'ammonium (NH_4^+) et du diazote (N_2) comme source d'azote. L'azote ne joue pas de rôle énergétique comme le phosphate, si ce n'est qu'il entre dans la composition des nucléotides triphosphatés. L'incorporation de l'azote a lieu par l'incorporation d'un ion ammonium dans le 2-oxoglutarate, un intermédiaire du cycle de l'acide citrique. Cette réaction produit le glutamate, acide aminé utilisé pour les réactions de transamination menant aux autres acides aminés (Michal, 1999). L'incorporation de l'ammonium peut aussi se produire lors de la synthèse de la glutamine (qui possède 2 atomes d'azote) à partir du glutamate. Cela se produit de manière plus spécifique au niveau du cycle de la glutamine synthétase/glutamate synthétase (Ivashikina et Sokolov, 1997). Pour utiliser le nitrate, la cellule doit d'abord le réduire en nitrite à l'aide de la nitrate réductase. Le nitrite est ensuite réduit en ammoniacque par la nitrite réductase. L'ammonium est en équilibre avec sa base faible, l'ammoniacque. Le pK_a du couple est de 9,25. Ceci implique que dans le cytosol, la forme basique du couple ne représente qu'environ 1% de l'ammonium.

Saccharose et hexose

Le saccharose est un dimère constitué de deux hexoses, une molécule de glucose et une molécule de fructose. C'est le glucide qu'on retrouve dans la sève des plantes supérieures et qui sert de molécule énergétique pour les plantes. La plante ne peut pas se servir du saccharose directement, elle doit l'hydrolyser en glucose et fructose par l'action des invertases (Sturm, 1999). Dans la cellule, le glucose et le fructose sont rapidement phosphorylés en glucose-6-phosphate et en fructose-6-phosphate pour finalement générer de l'énergie via les voies métaboliques de la glycolyse, des pentoses phosphates et du cycle de Krebs. Ainsi, le métabolisme du saccharose est intimement lié à la disponibilité du P_i dans le cytosol. Le saccharose a également un rôle de régulation de voies métaboliques et de signalisation au sein de la plante, notamment au niveau du développement (Lalonde et coll., 1999 ; Gibson, 2000; Smeekens, 2000; Williams et coll., 2000). Cette signalisation passe par le clivage du saccharose en glucose et en fructose. Les hexokinases, enzymes activées par les hexoses, déclenchent ensuite une cascade d'événements en phosphorylant des protéines spécifiques (Farrar et coll., 2000).

2.2.2 Métabolisme secondaire

Le concept de métabolisme secondaire a été introduit par le scientifique allemand A. Kössel en 1891. Les cellules de plantes produisent beaucoup plus de composés qui ne leur en faut pour assurer leurs fonctions vitales de base. Tandis que les produits du métabolisme primaire sont essentiels dans les mécanismes de respiration, de transport et de différenciation cellulaire, le métabolisme secondaire génère des sous-produits en apparence moins utiles ou pas utiles et très diversifiés appelés métabolites secondaires. Ces métabolites secondaires jouent un rôle primordial dans la survie de la plante dans son écosystème. De fait, les métabolites secondaires sont impliqués dans les processus chimiques de résistance aux organismes nuisibles et aux maladies (phytoalexins), à l'attraction de pollinisateur (couleur, odeur), à l'interaction avec des organismes symbiotiques, etc. (Harborne, 1978).

Déjà plus de 100 000 métabolites secondaires de plantes sont connus à ce jour et environ 4000 de plus sont découverts chaque année (Verpoorte et coll., 1999). Ils peuvent être classés en trois grandes catégories : les composés phénoliques, les isoprénoides et les

alcaloïdes (et autres composés azotés). Le Tableau 2.1 présente des exemples de métabolites pour chaque catégorie. Beaucoup de ces métabolites secondaires ont une application commerciale comme médicament, encre, saveur, fragrance, insecticide, etc. Ces composés d'intérêt sont récupérés des plantes par extraction et purification. La demande mondiale pour ces produits varie de plusieurs tonnes, respectivement 500 et 7 500 tonnes pour la quinine et les acides amères d'houblon, à quelques kilogrammes pour la paclitaxel et la vincristine, deux molécules antitumorales. Évidemment, les prix de ces composés sur le marché international varient également de 100\$ US le kilogramme (quinine et acides amères d'houblon) à plus de 5 000\$ US le gramme (265USD/g paclitaxel, vincristine) (Verpoorte et coll., 1999).

Le métabolisme secondaire des plantes est lié au métabolisme primaire par 5 voies métaboliques principales (Tikhomirov, 2001): la voie de l'acide shikimique, de l'acide malonique, de l'acide mévalonique, des acides aminés (Taiz et Zeiger, 1998) et du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) via la voie des pentoses phosphates (Contin et coll. 1998). La Figure 2.2 résume les principales voies métaboliques menant à la biosynthèse des trois grandes classes de métabolites secondaires.

Tableau 2.1 – Classes de métabolites secondaires (Tikhomiroff, 2001)

Famille	Sous-famille	Exemple
Composés phénoliques	phenols simples	Arbutin dans les Rosaceae et Ericaceae
	hydroxybenzoates	4-Hydroxybenzoate dans plusieurs familles
	Acetophenones	Picein dans <i>Picea abies</i>
	Phenyl acetates	4-Hydroxyphenylacetate dans <i>Taxacum officinale</i>
	Hydroxycinnamates	Chlorogénate dans les Solanaceae
	Phenylpropenes	Eugenol dans les huiles essentielles de plusieurs espèces
	Coumarines	Cichorine dans <i>Cichorium intybus</i>
	Chromones	Eugénine dans <i>Eugenia aromatica</i>
	Naphthoquinones	Juglone dans les Juglandaceae
	Xanthones	Mangiférine dans <i>Mangifera indica</i>
	Stilbenes	Resveratrol dans <i>Eucalyptus</i>
	Anthraquinones	Emodine dans <i>Rheum palmatum</i>
	Flavonoides	Rutine et anthocyanines dans plusieurs familles
	Lignanes	Pinosésinol dans <i>Picea</i> et <i>Pinus</i>
	Biflavonoides	Amentoflavone dans les gymnospermes
	Catechol melanines	polymères de Naphthalène dans <i>Daldinia concentrica</i>
	Tannins hydrolysables	tannin chinois dans <i>Rhus semialata</i>
	Lignines	Lignines guaiacyl dans les gymnospermes
	Tannins condensés	Tannins dans <i>Quercus robur</i>
Isoprenoides	Monoterpenoides	geraniol, menthol, iridoides (loganine, secologanine dans <i>Catharanthus roseus</i>)
	Sesquiterpenoides	Acide abscisique dans la plupart des plantes, lactones sesquiterpenoides
	Diterpenoides	Gibberellines dans toutes les plantes
	Triterpenoides	Phytosterols, saponines, cardenolides dans la plupart des plantes
	Carotenoides	β -carotène dans <i>Daucus carota</i> , prolycopène dans <i>Esculentum</i> , persicaxanthine dans <i>citrus</i>
	Polyterpenoides	Caoutchouc dans <i>Hevea brasiliensis</i>
Composés azotés	Acides aminés non protéiques	acide L-azetidine-2-carboxylique dans les Liliaceae
	Amines	amines aliphatiques, putrescine, spermidine, tryptamine dans la plupart des plantes, cadaverines dans les Leguminosae
	Glycosides cyanogéniques	Linamarine, lotaustaline, lucumine dans plusieurs familles
	Glycosinolates	Glucobrassicine, sinalbine, sinigrine dans les dicotylédons
	Alcaloïdes	Cocaïne dans les Solanaceae, nicotine dans les différentes <i>Nicotiana</i> , ajmalicine, vincristine dans <i>Catharanthus roseus</i> , sanguinarine et berberine dans les Papaveraceae

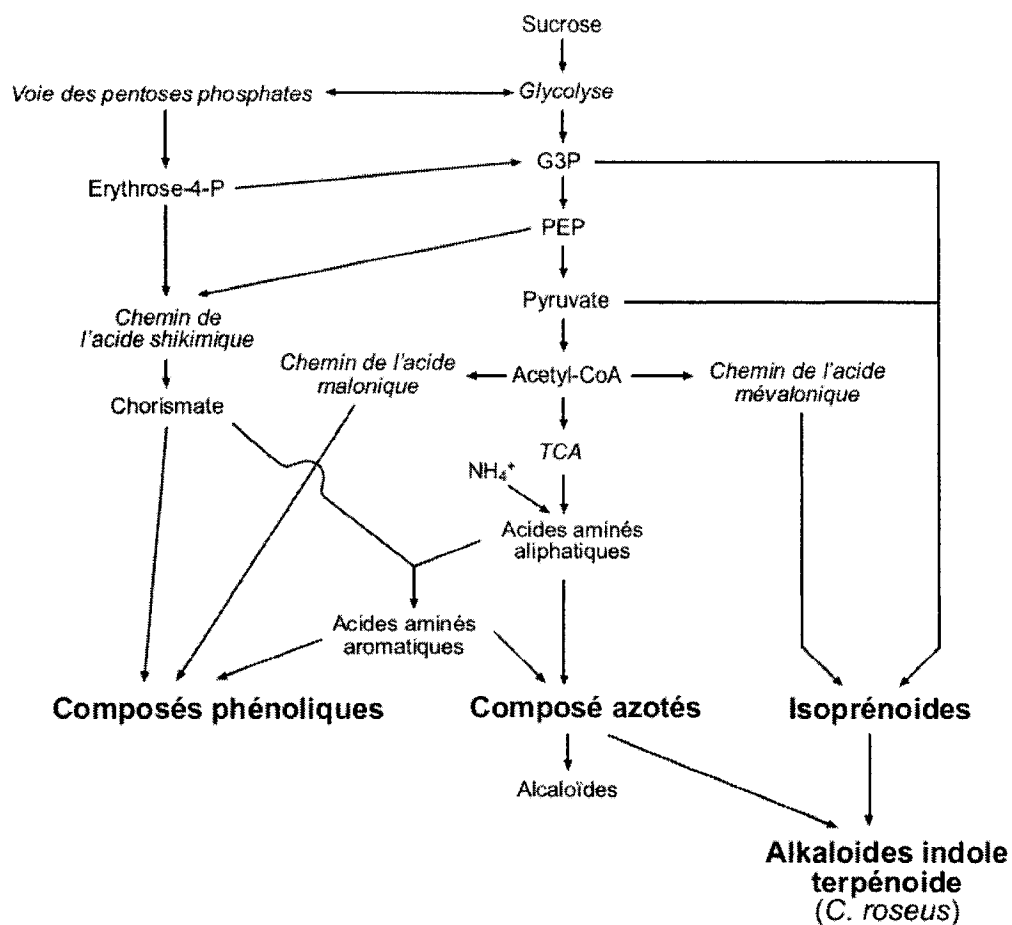


Figure 2.2 – Principales voies métaboliques menant à la biosynthèse de 3 grandes classes de métabolites secondaires (Tikhomiroff, 2001)

Les alcaloïdes

Dans la famille des composés azotés, la sous-famille des alcaloïdes est particulièrement intéressante. Les alcaloïdes sont des molécules organiques azotées très alcalines tirées généralement des dicotylédones (plantes) et qui ont une action physiologique sur l'homme et les animaux (Office langue française, 1997). Environ 20% des plantes peuvent accumuler des alcaloïdes. Ces alcaloïdes sont pour la plupart dérivés des acides aminés suivants : la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, la lysine et l'ornithine (Memelink et coll., 2001). Plus de 16 000 structures d'alcaloïdes sont connues à ce jour. Historiquement, les alcaloïdes ont toujours suscité beaucoup d'intérêt à cause de leur activité biologique (Kutchan, 1995). Près de 25% des médicaments utilisés dans la médecine moderne sont dérivés de plantes et beaucoup des ingrédients actifs de ces médicaments sont des alcaloïdes (Memelink et coll., 2001). Malgré l'existence de nombreux alcaloïdes toxiques (strychnine, coniine), plusieurs d'entre eux sont utilisés en médecine dans la préparation d'analgésiques et d'anesthésiques. De plus, certains alcaloïdes comme la colchicine et la vinblastine sont même utilisés pour combattre le cancer. Parmi les alcaloïdes les plus connus se retrouvent des drogues comme la morphine, la cocaïne, la caféine et la nicotine.

Alcaloïdes indoles terpénoïdes de *C. roseus*

Plusieurs alcaloïdes sont tirés de *C. roseus* à cause de leur intérêt pharmaceutique. Les plus connus sont certainement la vincristine et la vinblastine utilisées dans des traitements contre le cancer. De plus, l'ajmalicine et la serpentine sont utilisées pour régler des problèmes circulatoires. La biosynthèse d'une centaine d'alcaloïdes produits par *C. roseus* comprend plusieurs étapes métaboliques communes (St-Pierre et coll., 1999). La Figure 2.3 présente le chemin métabolique des principaux alcaloïdes de *C. roseus*. En fait, la majorité des alcaloïdes d'intérêt de *C. roseus* dérivent d'un intermédiaire central, la strictosidine, et sont appelés des alcaloïdes indoles terpénoïdes (TIA). Cette appellation est due à la formation de la strictosidine qui provient de la condensation de deux précurseurs, un dérivé indolique, la tryptamine, et d'un

monoterpène, la secologanine. La tryptamine est formée à partir du tryptophane provenant du métabolisme primaire par le chemin métabolique de l'acide shikimique. De même, la secologanine dérive de transformations de composés provenant du métabolisme primaire par le chemin métabolique des acides mévaloniques. La 4,21-déhydrogeissoschizine peut donner la cathénamine qui donne ensuite l'ajmalicine oxydée en serpentine. Ces deux derniers composés sont utilisés comme antihypertenseurs. La biosynthèse de l'ajmalicine à partir de la strictosidine implique l'action d'au moins 10 enzymes dont une a été clonée (Dogru et coll., 2000). La 4,21-déhydrogeissoschizine conduit également à la stemmadénine qui est convertie soit en tabersonine, soit en catharanthine (Meijer et coll., 1993). Aucune enzyme menant à la synthèse de la catharanthine n'est actuellement connue. En revanche, la biosynthèse de la vindoline à partir de la tabersonine a été très bien caractérisée. Cette synthèse a lieu en 6 étapes. La première étape consiste en une hydroxylation par la tabersonine 16-hydroxylase (T16H), une monooxygénase de type P450 et dépendante en NADPH (St-Pierre et DeLuca, 1995). Les étapes suivantes consistent en une 16-O-méthylation par une O-méthyltransférase (OMT) (Fahn et coll., 1985), une hydratation de la double liaison 2-3 par une enzyme encore inconnue puis une N-méthylation de l'atome d'azote de l'anneau indole par une N-méthyltransférase (NMT) (DeLuca et coll., 1987; Dethier et DeLuca, 1993) pour former l'acétoxyvindoline. L'avant dernière étape est effectuée par un dioxygénase (D4H) utilisant comme substrat supplémentaire une molécule de 2-oxoglutarate (DeCarolus et DeLuca, 1993). D4H existerait sous une forme inactive et une forme active en présence de lumière (Vazquez-Flota et coll., 2000). La formation de la vindoline est catalysée par la déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase (DAT) (DeLuca et coll., 1985; Fahn et coll., 1985), qui utilise une acétyl-coenzyme A comme source du groupement acétyl. DAT est inhibée fortement par la tabersonine et l'acétyl-coenzyme A (K_i de l'ordre de 50 μM) et faiblement par la tryptamine, la secologanine et la vindoline (K_i de l'ordre de 500 μM) (Power et coll., 1990). T16H, NMT, D4H et DAT sont très fortement contrôlées par le développement de la plante et par la lumière (DeLuca et coll., 1986, St-Pierre et DeLuca, 1995). Ces enzymes se retrouvent dans les parties aériennes

de la plante uniquement (St-Pierre et coll., 1999), ce qui expliquerait pourquoi la biosynthèse de la vindoline n'est que très rarement observée dans les racines transformées ou les cellules de *C. roseus* (Parr et coll., 1988).

Dans les racines transformées et les cellules en suspension de *C. roseus*, la vindoline n'est pas synthétisée (van der Heijden et coll., 1989; Moreno et coll., 1995). La compartimentation de D4H et de DAT dans les parties aériennes de la plante pourrait expliquer cette inhibition (St-Pierre et coll., 1999). Cependant, la tabersonine, précurseur de la vindoline, n'est pas pour autant accumulée. Shanks et coll. (1997) ont mis en évidence la production de löchnericine et de hörhammericine dans des racines transformées de *C. roseus*. Ces composés semblent être des dérivés de la tabersonine, bien qu'aucune enzyme responsable de leur formation n'ait été identifiée. La catharanthine et la vindoline sont condensées par une peroxydase non spécifique pour produire la vinblastine puis la vincristine (Sottomayor et coll., 1998).

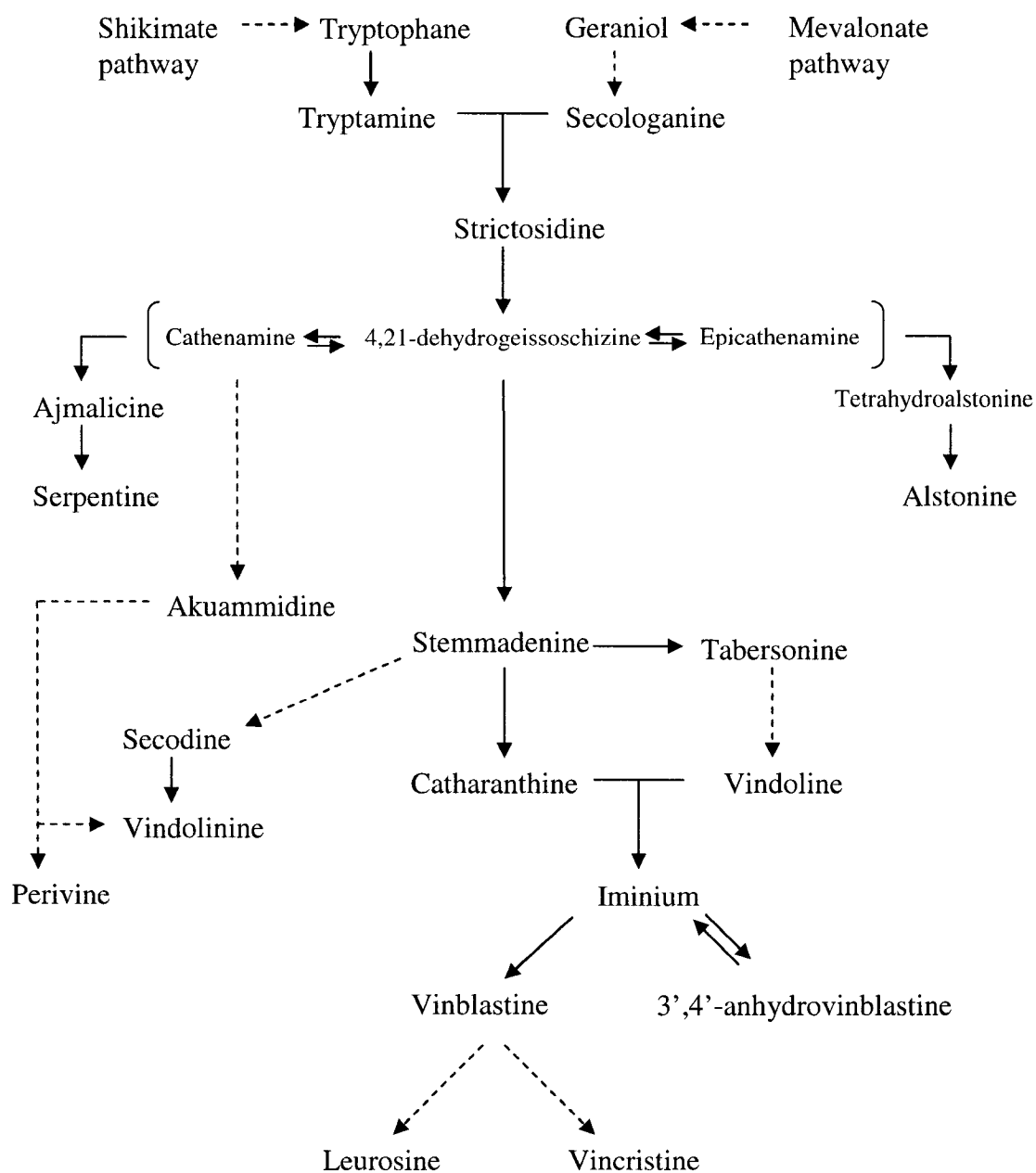


Figure 2.3 – Voies métaboliques des TIA de *C. roseus* (Verpoorte et coll., 2002)

2.3 Élicitation

Au début des années 1970, il a été découvert que de petites molécules de polysaccharides et de protéines provenant d'un agent pathogène pouvaient induire la synthèse de phytoalexins dans des tissus de plantes infectées (Radman et coll., 2003). Le terme « éliciteur » a été introduit par Keen en 1975 lors d'une étude sur les effets du champignon *Phytophthora megasperma* sur la production de phytoalexins par le soya (*Glycine max*). Une définition générale du terme éliciteur est une substance qui induit ou augmente la biosynthèse de composés spécifiques lorsque introduite en faible concentration dans une culture cellulaire vivante. L'élicitation représente donc l'induction ou l'augmentation de la biosynthèse de métabolites suite à l'addition d'une petite quantité d'éliciteur (Radman et coll., 2003).

L'avantage de l'élicitation est la possibilité d'augmenter la productivité d'une culture de plantes ou de cellules de plantes à un moment précis dans le processus de production. Plusieurs exemples intéressants d'élicitation existent dans la littérature. La section suivante portera donc principalement sur une classification et une description des éliciteurs employés à ce jour dans la littérature. De plus, différents exemples d'éliciteurs utilisés avec des cultures de cellules ou tissus (*hairy roots*) de *C. roseus* sont présentés afin de dresser un aperçu des meilleurs éliciteurs à utiliser lors de cette étude.

2.3.1 Classification des éliciteurs

Le Tableau 2.2 montre une classification d'éliciteurs pour lesquels des effets ont déjà été rapportés dans la littérature. Il existe deux grandes catégories d'éliciteurs : physique ou chimique. Les éliciteurs chimiques sont classés selon leur origine biotique ou abiotique. Les éliciteurs biotiques sont ensuite catégorisés selon leur structure moléculaire définie ou indéfinie (complexe).

Tableau 2.2 - Éliciteurs de plantes et de cultures de cellules de plantes
(Radman et coll., 2003)

Éliciteurs					
Physique	Dommages physiques (lésions)				
Chimique	Abiotique	Ions métalliques, éléments rares, choc osmotique, pH			
	Biotique	Composition complexe	Paroi cellulaire de champignons, spores de champignons		
		Composition définie	Glucides	Polysaccharides	Alginate
					Pectine
					Chitosan
					Gomme de guar
					Chitine
				Oligosaccharides	Galacturonides
			Protéiques	Peptides	Glutathione
				Protéines	élicites, cellulase, oligandrine
			Lipides		Lipopolysaccharides, Jasmonate
			Volatiles		C ₆ -C ₁₀

Éliciteur physique

Un éliciteur physique est tout simplement l'application d'un dommage physique aux cellules de plantes qui stimule les mécanismes de défense. Ce type d'élicitation n'a pas été étudié extensivement pour l'élicitation de cultures de cellules de plantes. Un rare exemple a été l'utilisation d'ultrason pour l'induction de mécanismes de défense du *Panax ginseng* (Wu et Lin, 2002).

Le mécanisme d'élicitation par dommage physique serait relié à la libération de polysaccharides lors de la destruction des parois des cellules végétales affligées. Les polysaccharides ainsi libérés agiraient par la suite comme éliciteur biotique et induiraient les mécanismes de défense des cellules végétales connus (section 2.3.2).

Éliciteur chimique

La catégorie des éliciteurs chimiques est de loin la plus exhaustive et inclue tout composé chimique participant à l'induction ou l'augmentation de la biosynthèse de métabolites secondaires par les cellules de plantes.

Un éliciteur est dit biotique s'il est d'origine biologique. Les éliciteurs biotiques à base de complexes chimiques plus ou moins définies comme les extraits de champignons sont parmi les éliciteurs les plus fréquemment utilisés pour l'élicitation de cultures de cellules végétales. Notamment, l'utilisation de *P. megasperma* avec des cellules végétales d'*Eschscholtzia* pour la production de benzophenandrine (Schumacher et coll., 1987), *P. minioluteum* avec *Taxus* pour la production de taxol (Ciddi et coll., 1995), *S. sclerotiorum* avec *T. laxa* pour la production de thiophene (Rodriguez et Giulietti, 1995) et *A. niger* avec *A. euchroma* pour la production de shikonin (Jun et Sheng, 1998). Quant à l'utilisation d'extraits de champignons pour l'élicitation de cellules de *C. roseus*, deux études récentes ont démontré l'efficacité relative de différents extraits pour la production de différents TIA (Zhao et coll., 2001a; Namdeo et coll., 2002). Une liste des meilleurs résultats de production obtenus par le groupe de recherche de Jian Zhao en Chine entre 2000 et 2001 sont présentés avec leurs éliciteurs respectifs au Tableau 2.3.

Dans la catégorie des éliciteurs biotiques dont la composition est définie, les glucides et les lipides (principalement les jasmonates) ont été les plus souvent utilisés avec succès. L'utilisation de glucides spécifiques comme éliciteur provient originalement de l'identification d'oligosaccharides actifs dans des extraits de champignons et leur effet sur la production de phytoalexins par des cultures de cellules (Sharp et coll., 1984). Le Tableau 2.4 présente une liste de glucides utilisés comme éliciteurs avec les espèces végétales et les types de métabolites secondaires produits tels que mentionnés dans la littérature. L'utilisation de polysaccharides comme le chitosan et l'alginate a aussi obtenu du succès pour l'élicitation de cultures de *C. roseus* (Akimoto et coll., 1999).

Tableau 2.3 – Résumé de résultats de production de TIA par des cellules de *C. roseus* pour différents éliciteurs par le groupe de recherche de Jian Zhao, Chine.

Zhao et coll., 2001a		Zhao et coll., 2000c		Zhao et coll., 2000b		Zhao et coll., 2000a	
Éliciteur (concentration)	Production (mgTIA/L)	Éliciteur (concentration)	Production (mgTIA/L)	Éliciteur (concentration)	Production (mgTIA/L)	Éliciteur (concentration)	Production (mgTIA/L)
Contrôle	28	Contrôle	15	Contrôle	7	Contrôle	13
<i>Fusarium solari</i>	91	KCl (6 g/L)	39	Vanadyl sulfate (60 mg/L)	37	Betaine hydrochloride (4.4 mM)	61
<i>Absidia cristata</i>	67	NaCl (4.5 g/L)	27	CeO ₂ (5 mg/L)	76	Tetramethyl ammonium bromide (1 mM)	103
<i>Aspergillus niger</i>	48	Mannitol (300 mM)	56	CeCl ₃ (5 mg/L)	89	Arachidonic acid (90 µM)	43
<i>Pythium irregularare</i>	100	Sodium alginate (1.5% m/v)	42	Y ₂ O ₃ (5 mg/L)	81	Succinic acid (20 mM)	46
<i>Ustilaginodia verens</i>	74	PVP (0.2%)	55	NdCl ₃ (5 mg/L)	63	Malic acid (0.5 mM)	91

Tableau 2.4– Exemples de glucides-éliciteurs et la production de métabolites secondaires (Radman et coll., 2003)

Éliciteur	Espèce de plante	Métabolite
α -1,4-Oligogalacturonide	<i>Glycine max</i>	Phytoalexins
Hepta- β -glucoside	<i>Glycine max</i>	Phytoalexins
β -1,6-1,3-Glucans	<i>Glycine max</i>	Isoflavonoids
β -Glucan	<i>Glycine max</i>	H ₂ O ₂
Pectic oligomers	<i>Citrus limon</i>	Phytoalexins
Chitin, alginate, guar gum, pectin, rhamsan, xanthan	<i>Morinda citrifolia</i>	Anthraquinones
Chitin	<i>Papaver somniferum</i>	Sanguinarine
Chitin et chitosan	<i>Taxus canadensis</i>	Taxol
Chitosan	<i>Polygonum tinctorium</i>	Indirubin
	<i>Lupinus albus</i>	Isoflavonoids, genistein
	<i>Rheum palmatum</i>	Anthracene
Chito-oligosaccharides	<i>Juniperus chinensis</i>	Podophyllotoxin
Laminarin	<i>Nicotiana tabacum</i>	H ₂ O ₂
Mannan	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericins
N-Acetylchitohexaose	<i>Taxus canadensis</i>	Taxol
N-Acetylchito-oligosaccharide	<i>Avena sativa</i>	Anthranilate

L'implication connue des jasmonates dans les voies de signalisation du mécanisme d'élicitation dans les cellules de plantes (section 2.3.2) en fait d'excellents éliciteurs, particulièrement le méthyle jasmonate (MeJa) (Gundlach et coll., 1992). Entre autres, des augmentations considérables dans la production de taxol ont été réalisées par l'élicitation d'une suspension cellulaire de *Taxus cuspidata* avec le MeJa (Mirjalili et Linden, 1996). L'efficacité du MeJa comme éliciteur pour la production de TIA dans des cultures de racines (*hairy roots*) de *C. roseus* a aussi été démontrée dans des études antérieures (Rijhwani et Shanks, 1998; Tikhomiroff, 2001). Le Tableau 2.5 présente des exemples de métabolites secondaires de plantes induits par le MeJa.

Tableau 2.5 – Exemples de métabolites secondaires de plantes induits par des jasmonates (Memelink et coll., 2001)

Classe de métabolites	Espèce de plante
Polyamines	<i>Hyoscyamus muticus</i>
Coumaroyl-conjugated polyamines	<i>Hordeum vulgare</i>
Anthraquinones	<i>Rubia tinctorium</i>
Naphthoquinones	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Gomme (polysaccharide)	<i>Prunus persica</i> , <i>Tulipa gesneriana</i>
Terpénoïdes	
Diterpènes (taxol)	<i>Taxus spp.</i>
Sesquiterpènes	<i>Lactuca sativa</i> , <i>Phaseolus lunatus</i> , <i>Zea mays</i>
Alcaloïdes	
Acridone	<i>Ruta chalepensis</i>
Nicotine	<i>Nicotiana spp.</i>
Tropane	<i>Datura stramonium</i>
Benzylisoquinoline	<i>Eschscholtzia californica</i> , <i>Papaver somniferum</i> , <i>Thalictrum tuberosum</i>
Indole terpénoïde	<i>Catharanthus roseus</i> , <i>Cinchona ledgeriana</i> , <i>Rauvolfia spp.</i>
Phenylpropanoïdes	
Acide rosmarinique	<i>Coleus blumei</i> , <i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Coumarins	<i>Nicotiana tabacum</i>
Furanocoumarins	<i>Petroselinum crispum</i>
Flavonoïdes	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Crotaria cobalticola</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Prunus persica</i> , <i>Tulipa gesneriana</i>

Des protéines et enzymes peuvent aussi jouer le rôle d'éliciteur de cultures de cellules végétales. Ces protéines sont alors nommées élicitines (Radman et coll., 2003). Une élicitine comme la cellulase a par exemple provoqué l'accumulation rapide de phytoalexins dans des cultures cellulaires de *N. tabacum* (Threlfall et Whitehead, 1988).

Un éliciteur est dit abiotique s'il est d'origine non biologique. Ce type d'éliciteur regroupe principalement des sels inorganiques (Ca^{2+}), des métaux lourds (Cu, Cd), des éléments rares (La, Ce, Y) et des facteurs tel un pH élevé.

De récents travaux de recherche ont porté sur l'amélioration de la production de TIA par l'élicitation avec le sulfate de vanadyle et une variété d'éléments rares (SmCl_3 , LaCl_3 , CeO_2 , CeCl_3 , Y_2O_3 , NaSeO_3 , NdCl_3) sur une lignée productive de *C. roseus* (Zhao et coll., 2000b). Ces travaux font suite à plusieurs autres ayant précédemment rapporté des augmentations rapides de production de TIA par l'élicitation de cellules de *C. roseus* avec du sulfate de vanadyle et des éléments rares (Smith et coll., 1987, Backer-Royer et coll., 1990, Moreno et coll., 1995). L'effet biologique d'éléments rares a fait l'objet de nombreuses études sur les animaux, les plantes et les bactéries (Bestwick et coll., 1997 ; Li et coll., 1994 ; Preeta et Nair, 1999 ; Chen et coll., 2000) sans toutefois élucider leur rôle sur le métabolisme secondaire des plantes. Certains pensent que les éléments rares agissent comme des régulateurs biologiques puisque l'occurrence d'hyperaccumulation de métaux lourds pouvant induire un stress a déjà été rapportée dans certaines cultures de cellules végétales dans la littérature (Macek et coll., 1994 ; Nedelkoska et Doran, 2000). L'amélioration des rendements obtenue suite à l'élicitation au cérium est peut-être due à son influence sur la perméabilité du tonoplaste (Zhao et coll., 2000b). En bref, l'étude de Zhao et coll. 2000 a montré un effet significatif du cérium (III, IV), de l'yttrium (III) et du neodymium (III) sur l'augmentation des rendements de catharanthine et d'ajmalicine sur une culture de cellules de *C. roseus*. Ces éléments rares démontrent donc une intéressante perspective commerciale pour l'élicitation de culture de cellules végétales à l'échelle industrielle à cause de leur coût faible et leur effet marquant sur l'augmentation des rendements de production de TIA.

D'autre part, une autre étude sur des cellules de *C. roseus* par le groupe de recherche de Zhao en 2000 a démontré l'efficacité d'éliciteurs abiotiques comme le sodium alginate, le mannitol et le polyvinyl pyrrolidone sur l'accroissement de la production de TIA (Zhao et coll., 2000c). Ces composés agissent comme éliciteur en provoquant un choc osmotique lorsque introduits dans le milieu de culture.

2.3.2 Mécanisme général d'élicitation chez les plantes

Une grande variété de réponses biochimiques surviennent chez les plantes et les cultures de cellules végétales suite à leur élicitation (Radman et coll., 2003). La majorité des études effectuées sur le phénomène d'élicitation jusqu'à maintenant ont porté sur des cas utilisant des éliciteurs biotiques, surtout des glucides dérivés d'extraits de champignons.

Cette section présente un résumé du mécanisme général d'élicitation d'une cellule végétale suite à son interaction avec un éliciteur biotique. Le mécanisme proposé provient d'un résumé par Radman (Radman et coll., 2003) et consiste tout simplement en une énumération des différentes réponses déjà rapportées dans la littérature.

La première étape du mécanisme d'élicitation consiste à la liaison d'un éliciteur à un récepteur situé dans la membrane plasmique de la cellule (Cheong et coll., 1991; Nennstiel et coll., 1998). Cette étape est souvent suivie d'un changement dans les flux ioniques à travers la membrane plasmique (Mathieu et coll., 1991), principalement l'influx de Ca^{2+} vers le cytoplasme à partir du milieu extracellulaire et des réservoirs intracellulaires (Castañeda et coll., 1996; Gelli et coll., 1997; Kasparova et coll., 2001). Une stimulation des efflux de K^+ et Cl^- a aussi déjà été observée (Bach et coll., 1993; Ivashikina et coll., 2001).

L'étape suivante implique des changements dans les voies de phosphorylation de protéines et l'activation d'une protéine kinase (Felix et coll., 1991; Yang et coll., 1997; Romeis, 2001), la stimulation d'une MPKA (*mitogen-activated protein kinase*) (Droillard et coll., 2000; Agrawal et coll., 2002) et l'activation d'une protéine-G (Kelly et coll., 1995; Roos et coll., 1999). Il peut aussi se produire une synthèse de messagers $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ et diacylglycerol (DAG) (Mahady et coll., 1998) pour réguler la libération de Ca^{2+} intracellulaire.

Une réponse importante dans le mécanisme d'élicitation est l'activation de la voie métabolique de signallement des octadecanoïdes (Piel et coll., 1997) menant à la formation d'acide jasmonique, un messenger secondaire (Memelink et coll., 2001). L'acide salicylique est un autre messenger secondaire synthétisé par les cellules de

plantes après élicitation (Katz et coll., 2002). Une seconde voie de signallement répertoriée dans les réponses des plantes à une élicitation est celle de l'oxyde nitrique (Delledonne et coll., 2002; Huang et coll., 2002).

Au niveau du pH, il y a souvent une acidification du cytoplasme causée par l'inactivation de pompes $H^+ATPase$ (Lebrun-Garcia et coll., 1999; Armero et coll., 2001) suivi par une dépolarisation de la membrane (Pugin et coll., 1997). D'autre part, une augmentation du pH extracellulaire a déjà été rapportée dans des cultures de tissus de plantes élicitées (Bolwell et coll., 1995).

Au point de vue de la structure cellulaire, une réorganisation du cytosquelette (Kobayashi et coll., 1995) et une lignification de la paroi cellulaire (Kauss et coll., 2001) sont des réponses courantes. À l'extrême, une réponse hypersensible de la plante au stress provoque la mort cellulaire au site d'infection (Kelly et coll., 1995; Roos et coll., 1999). Il peut également y avoir une accumulation de protéines reliées au mécanisme de défense telles la chitinase, la glucanase et l'endopolygalacturonase. Ces enzymes contribuent à la libération d'oligomères pectiques de signallement (éliciteurs endogènes), de glycoprotéines et d'inhibiteurs de protéase amplifiant le mécanisme de défense de la cellule (Stintzi et coll., 1993; Moreno et coll., 1996).

Une autre réaction commune des plantes suite à une élicitation est la production de ROS (*reactive oxygen species*) (Apostol et coll., 1989) comme le peroxyde et l'anion superoxyde. Ces substances peuvent avoir un effet antimicrobien direct ainsi que contribuer à la génération de dérivés d'acide gras bioactifs et être impliquées dans la liaison de protéines riches en proline dans la paroi cellulaire (Dixon et coll., 1994; Low et coll., 1996). Le peroxyde peut aussi jouer un rôle de messenger secondaire et participer à l'activation de la transcription de gènes de défense de la cellule végétale (Ebel et coll., 1992; Cormack et coll., 2002; Huang et coll., 2002).

Finalement, les molécules de défense comme les tannins et les phytoalexins sont détectées entre 2-4 heures après la stimulation par un éliciteur (Apostol et coll., 1989;

Schopfer et coll., 1998; Ito et coll., 2000; Pedras et coll., 2002) et dans certains cas une résistance systémique peut se développer (Lebrun-Garcia et coll., 1999).

L'ordre chronologique de ces événements et leurs différentes interactions est très complexe et est toujours en cours de recherche. De plus, le mécanisme général décrit plus haut ne s'applique pas nécessairement à tous les éliciteurs (par exemple : la toute première étape).

Rôle des jasmonates

Les jasmonates (Vicks et coll., 1984; Creelman et coll., 1997) sont des puissants régulateurs lipidiques des plantes. Ils régulent d'une part les mécanismes de défense provoqués par un stress physique ou une pathogénie (Farmer et coll., 1992; Vijayan et coll., 1998). D'autre part, ils jouent un rôle capital dans la reproduction (Feys et coll., 1994) et la régulation métabolique (van der Fits et coll., 2000).

Le chemin métabolique des octadecanoïdes menant à la biosynthèse des jasmonates chez les plantes est très similaire à ceux menant aux prostaglandines, prostacyclines, leukotriènes et thromboxanes impliquées dans les mécanismes inflammatoires chez les animaux. Cependant, les jasmonates sont dérivés d'un acide gras polyinsaturé de 18 carbones, l'acide linoléique, tandis que les prostaglandines proviennent d'un précurseur eicosanoïde de 20 carbones, l'acide arachidonique (Liechti et coll., 2002).

La Figure 2.4 montre une partie du chemin métabolique des octadecanoïdes menant à la biosynthèse de jasmonates. En fait, cette partie constitue une seule branche de ce chemin métabolique alors que d'autres branches mènent à la formation de composés volatiles tels des dérivés hétérocycliques ou une hormone de plaies comme l'acide traumatin (Farmer, 1994). La première étape dans la biosynthèse du jasmonate (JA) est la libération de l'acide linoléique à partir de la membrane de phospholipides. Ensuite, l'incorporation de O₂ via une lipoxigénase (LOX) mène à la formation d'acide 13-hydroperoxylinoléique. Cet acide est par la suite déshydraté par une allène oxyde synthase (AOS), un cytochrome P450, en acide 12,13-époxylinoléique. L'allène oxyde cyclase (AOC) forme subséquent l'acide 12-oxo-phytodienoïque (OPDA). L'obtention du composé le

plus connu dans la famille des jasmonates, l'acide jasmonique (JA), est finalement produit à partir de OPDA par une série de trois étapes de β -oxydation (Conconi et coll., 1996). Le JA se retrouve souvent conjugué d'un groupement méthyle formant le méthyle jasmonate (MeJa) (Liechti et coll., 2002).

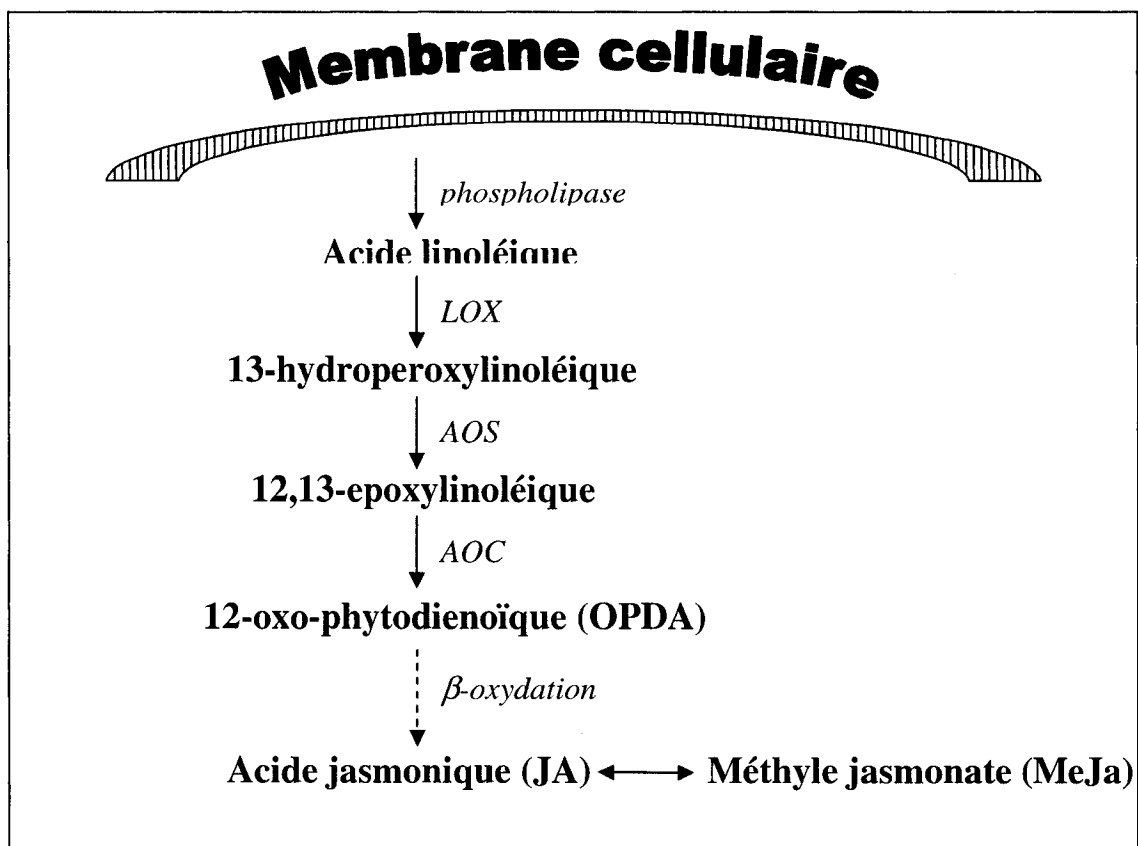


Figure 2.4 – Voies métaboliques des jasmonates (Klessig et coll., 1998)

Rôle du calcium

Tel que mentionné précédemment à la section 2.3.2, les cellules végétales activent une variété de mécanismes de défense pour les protéger face à des attaques comme celles de champignons. L'induction de ces mécanismes de réponses est régulée par différentes voies de signallement à l'intérieur des cellules. Une étude récente a montré que l'influx d'ion Ca^{2+} et des voies de signallement dépendantes au Ca^{2+} sont impliqués dans les mécanismes de défense de *C. roseus* (Zhao et coll., 2001). D'après cette étude, l'influx de Ca^{2+} semble nécessaire et suffisante pour l'induction des mécanismes de défense par l'éllicitation aux champignons tels le relâchement de composés oxygénés (*oxidative burst*) et l'accumulation de TIA. Enfin, malgré des conclusions contradictoires observées pour d'autres espèces de plantes dans des études antérieures sur le sujet (Apostol et coll., 1989; Jabs et coll., 1997; Mithofer et coll., 1997; Dorey et coll., 1999), les observations de l'étude en question supporte l'hypothèse que l'influx de Ca^{2+} est un pré-requis à une éllicitation déclenchée par le relâchement de composés oxygénés (*oxidative burst*). La présence de Ca^{2+} dans les milieux de production de *C. roseus* et le suivi de sa concentration est donc un facteur à considérer sérieusement dans l'étude de production de TIA par éllicitation.

2.3.3 Mécanisme d'éllicitation spécifique aux TIA

La Figure 2.5 présente un modèle résumant les différentes étapes qui mènent à l'expression du gène *Str* lors de l'éllicitation. Le gène *Str* est responsable de l'enzyme strictosidine synthase catalysant la formation de strictosidine, le premier intermédiaire menant aux différents TIA du métabolisme secondaire chez *C. roseus* (Figure 2.3). Le mécanisme d'éllicitation est déclenché lorsqu'un récepteur à la surface de la membrane plasmique entre en contact avec un élliciteur. La perception du signal d'éllicitation engendre par la suite la phosphorylation d'une protéine permettant l'influx de calcium. C'est l'augmentation transitoire de la concentration cytosolique de calcium qui permet l'activation du chemin métabolique des octadecanoïdes et la synthèse de jasmonate (Figure 2.4). Le jasmonate induit ensuite l'expression du gène *Orca* (*octadecanoid-*

responsive Catharanthus AP2-domain proteins) et active les protéines ORCA déjà présentes (van der Fits et coll., 2001). Les ORCAs ainsi activées peuvent interagir avec le JERE (*jasmonate-and-elicitor-responsive element*) et permettre l'expression du gène *Str*. Par ailleurs, l'influx de calcium est aussi requis pour l'accumulation de ARNm CrBPF-1 (*Catharanthus roseus box P-binding factor 1 homologue*), non induit par le jasmonate (van der Fits et coll., 2000). Le CrBPF-1 est supposément impliqué dans la régulation du gène *Str* via l'interaction avec la région BA (*branchial arch*) (Memelink et coll., 2001).

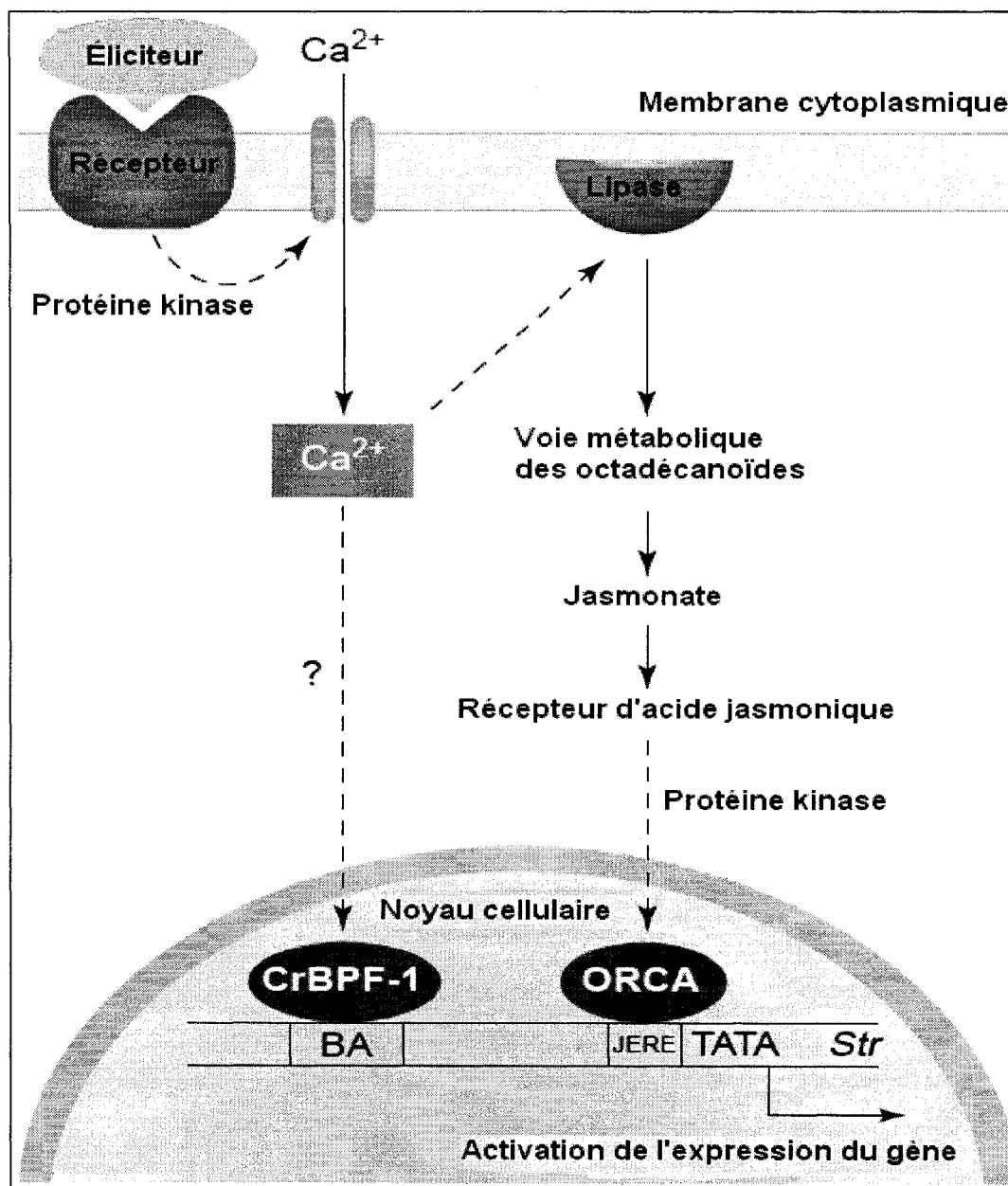


Figure 2.5 – Modèle pour la transduction de signaux menant à l'expression du gène *Str* (Memelink et coll., 2001)

CHAPITRE 3

3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Développement et maintien des lignées cellulaires

Les suspensions de cellules végétales utilisées dans le cadre des travaux présentés dans ce mémoire proviennent de l'espèce *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Les lignées LCR01, LCR02 et LCR03 ont été développées par l'équipe du Dr. Robert Williams du groupe de biologie cellulaire chez Phytobiotech Inc. Le développement et le maintien de lignées cellulaires telles que LCR01, LCR02 et LCR03 se fait en plusieurs étapes.

La première étape consiste à former un amas cellulaire appelé calle à partir d'une graine de la plante. Pour ce faire, des graines de l'espèce choisie sont rincées et stérilisées avec un mélange d'eau et d'eau de javel. Les graines sont ensuite placées stérilement dans un pétri avec un peu d'eau jusqu'à leur germination. Une fois les graines germées, chacune d'elles sont placées stérilement dans un pétri contenant une mince couche solide de milieu nutritionnel B5 (Gamborg et coll., 1968) adapté (section 3.2.1). Après quelques semaines, chaque graine devrait se transformer en un amas cellulaire différencié alors nommé calle. Chaque calle peut être à l'origine d'une lignée cellulaire distincte.

La deuxième étape consiste à transférer les calles dans un milieu nutritionnel liquide. Les calles sont ainsi transférées stérilement dans des flacons contenant du milieu nutritionnel B5 adapté. Les flacons sont ensuite placés sur un agitateur orbital (Innova 5000, New Brunswick sc.) à 100 rpm dans une pièce à température contrôlée (26 ± 1 °C). Une sous-culture périodique (tous les 7 à 10 jours) des cellules est effectuée en purgeant du vieux milieu et en le remplaçant par du milieu B5 adapté frais. Il faut d'abord laisser décanter les cellules (environ 10 minutes), puis sous une hotte stérile, vider 50% du vieux milieu (surnageant) et ajouter l'équivalent de milieu frais. Au fil des sous-cultures, chaque calle transférée en flacon se développera graduellement en une suspension de cellules végétales non différenciées.

La troisième étape consiste au maintien de la suspension cellulaire et la gestion du stock de cellules. Dans le cas des lignées de *C. roseus* développées pour cette étude, le maintien des lignées s'effectuaient sommairement par la sous-culture des flacons à tous les 7-10 jours. Avant la sous-culture des flacons, la prise d'échantillons de 1-2 flacons représentatifs de l'ensemble du stock de flacons était effectuée afin de vérifier la concentration de biomasse sèche (gDW/L) et de nutriments (ions et glucides). La sous-culture était effectuée seulement si la concentration moyenne de biomasse sèche avait doublé depuis la dernière sous-culture. De plus, la dilution effectuée lors de la sous-culture avec du milieu frais ne devait pas faire baisser la concentration de biomasse sèche sous la barre d'environ 5 gDW/L. D'autre part, les concentrations des différents macronutriments et glucides du milieu de sous-culture (section 3.2) étaient de temps à autre ajustées afin de maintenir des concentrations moyennes dans les flacons près de celles du milieu B5 standard avec 30 g/L sucrose.

3.2 Milieu de culture

3.2.1 Milieu de croissance

Le milieu de croissance utilisé pour le développement et le maintien des lignées cellulaires de *C. roseus* LCR01, LCR02 et LCR03 est basé sur le milieu nutritionnel B5 standard (Gamborg et coll., 1968) présenté à l'annexe A. De plus, il a été choisi d'ajouter 30 g/L de sucrose comme source de carbone. Quant aux hormones de croissance, le milieu B5 adapté contient 1.0 mg/L d'acide 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) et 0.1 mg/L de kinétine. Le pH final du milieu est ajusté à 5.5 avec une solution de KOH 1 M. Le milieu est ensuite stérilisé à l'autoclave (modèle 3053, Steris) pendant 25 minutes à 121°C et 15 psi.

Lors de la préparation du milieu B5 adapté pour les sous-cultures périodiques en flacons ou pour l'inoculation d'un bioréacteur, toutes les concentrations des nutriments, vitamines, glucides et hormones sont ajustées afin d'obtenir les concentrations théoriques après dilution. L'équation 3.1 est utilisée pour obtenir le facteur multiplicatif

nécessaire à l'ajustement des concentrations du milieu selon le volume de suspension cellulaire initial présent avant l'ajout du milieu frais pour atteindre le volume final.

3.2.2 Milieu de production

Le milieu de production de base utilisé pour favoriser la biosynthèse de TIA est présenté à l'annexe B. Ce milieu a été développé essentiellement par le groupe de chercheurs chez Phytobiotech Inc. pour la production de métabolites secondaires par des cellules de plantes. Le milieu de production se distingue du milieu de croissance par l'absence de phosphate et d'hormones de croissance. D'autre part, par la présence de glucose à une concentration de 60 g/L (au lieu du sucrose à 30 g/L). Par ailleurs, les concentrations du nitrate et du potassium sont plus faibles tandis que les concentrations d'ammonium, de chlore et de calcium sont plus élevées. Les concentrations des nutriments, vitamines et glucides sont ajustées à l'aide de l'équation 3.1 afin d'obtenir les concentrations théoriques après dilution.

$$F = \frac{Volume_final}{Volume_final - Volume_suspension_initial} \quad 3.1$$

3.3 Préparation des éliciteurs

Une liste des différents éliciteurs utilisés est présentée à l'annexe D. La liste comprend également le fournisseur, le type de solvant et la méthode de stérilisation pour chaque éliciteur. L'eau ou l'éthanol 95% sont les deux solvants employés pour solubiliser les différents éliciteurs. La concentration des solutions d'éliciteur varie d'un éliciteur à l'autre selon la concentration visée de l'éliciteur dans le flacon ou bioréacteur. La concentration de la solution d'éliciteur est ajustée afin de respecter deux limites. D'une part, la concentration maximale doit permettre l'ajout de la quantité requise avec une pipette stérile. D'autre part, la concentration minimale doit permettre l'ajout de la quantité requise sans affecter significativement le volume de la culture. La stérilisation des solutions d'éliciteur se fait en majorité par filtration stérile (filtre 0.22 µm) pour éviter la dégradation par la chaleur. Cependant, dans certains cas comme celui de la

chitine, la solution d'éliciteur est stérilisée à l'autoclave (modèle 3053, Steris) pendant 25 minutes à 121°C et 15 psi.

3.4 Préparation de la résine adsorbante

Une résine de polymère Amberlite XAD-7 (Sigma-Aldrich) est utilisée pour l'adsorption des alcaloïdes dans le milieu de culture lors de la phase de production. La résine doit subir 2 traitements avant son introduction dans une culture de cellules. Premièrement, elle est lavée de tout composant pour s'assurer qu'elle possède un potentiel d'adsorption maximum. La résine est lavée deux fois avec 50% (v/v) méthanol durant des cycles de 1-2 heures sur un agitateur (676D, New brunswick sc.) à 150 rpm. À la fin du 2^e cycle, le méthanol est rincé à l'eau pendant 15 minutes à l'aide d'un système à fluidisation. La résine propre est filtrée sur miracloth (Calbiochem) et entreposée dans des contenants en plastique à la température de la pièce.

Avant son utilisation, la résine est pesée et placée directement dans un ballon en verre (pour élicitation dans un bioréacteur) ou un flacon. Le tout est ensuite stérilisé à l'autoclave (modèle 3053, Steris) à 121°C et 15 psi pendant 50 minutes.

3.5 Culture en flacons

La culture de cellules en flacons est une méthode très pratique pour maintenir un stock de cellules en phase de croissance (sous-cultures périodiques) ainsi que pour effectuer des tests préliminaires d'élicitation et de production à cause de leur petit volume et format pratique. La majorité des résultats présentés dans ce mémoire proviennent d'expériences réalisées à l'aide de cultures en flacons.

Quatre formats de flacons (125, 250, 500 et 1000 mL) en PYREX© ont été utilisés pour les cultures en flacons. Les expériences d'élicitation et de production ont principalement été effectuées avec les trois plus petits formats. La majorité d'entre elles ont cependant été effectuées en flacons de 250 mL (section 4.2.1). Par ailleurs, des flacons de 500 et 1000 mL étaient utilisés pour le maintien d'un stock cellulaire en phase de croissance.

Toutes les expériences d'élicitation et de production en flacons étaient opérées en mode cuvée, c'est-à-dire qu'aucun ajout de nutriments était effectué entre l'inoculation et la récolte de la culture. Les flacons sont stérilisés à l'autoclave (modèle 3053, Steris) un minimum de 25 minutes à 121°C et 15 psi. L'embouchure des flacons doit toujours être bloquée par un bouchon de coton pour prévenir la contamination et permettre une aération suffisante. Sauf lors de l'inoculation d'un flacon dans une hotte stérile,

Les flacons étaient maintenus sur un agitateur orbital (Innova 5000, New Brunswick Scientific) à 100 rpm pour assurer un bon mélange et une aération adéquate.

3.5.1 Inoculation

Deux méthodes sont utilisées pour l'inoculation d'une suspension cellulaire en flacons. La première méthode consiste au transfert d'un volume de suspension cellulaire (cellules et milieu de croissance). Dans une hotte stérile (PN62675, Enviroco) et à proximité d'une flamme (brûleur bunsen), un volume prédéterminé de suspension cellulaire est transvidé d'un flacon source à un flacon vide selon la nouvelle concentration de biomasse désirée. Par la suite, une dilution de la suspension cellulaire est effectuée en ajoutant du milieu de croissance ou de production (selon le cas) frais jusqu'à l'obtention d'un volume final de $\approx 45\%$ de la capacité du flacon. La deuxième méthode consiste à introduire des cellules préalablement filtrées, donc exempt de milieu de croissance, dans le flacon vide. Dans des conditions stériles, un volume de suspension cellulaire provenant d'un flacon source est filtré sous vide sur miracloth (Calbiochem). À l'aide d'une spatule stérile, des cellules sont alors pesées et déposées dans un flacon contenant déjà du milieu frais. La masse de cellules ajoutée au milieu est établie selon la concentration de biomasse désirée pour un volume total de $\approx 45\%$ de la capacité du flacon.

3.5.2 Élicitation

L'élicitation d'une suspension cellulaire pour l'induction d'une phase de production en flacons est effectuée en trois étapes.

Premièrement, la veille de l'élicitation, des flacons sources (flacons en phase de croissance) sont échantillonnés afin de déterminer les concentrations des nutriments et

de la biomasse sèche. Si la concentration de phosphate extracellulaire est nulle, 0.1 à 0.3 mM de NaH_2PO_4 est ajouté aux flacons sources. L'élicitation s'effectue le lendemain une fois la certitude que le phosphate ajouté a été entièrement consommé par les cellules dans les flacons sources. La procédure d'inoculation peut alors être entreprise telle que décrite à la section 3.5.1. Par la suite, un éliciteur est ajouté aux flacons contenant la suspension cellulaire et le milieu de production. Les flacons sont alors agités pendant 1 à 5 heures sur un agitateur orbital (Innova 5000, New Brunswick sc.) à 100 rpm avant de transférer leur contenu dans des flacons contenant 100 g/L de résine propre et stérilisée (section 3.4). Les flacons sont finalement remis sur un agitateur orbital à 100 rpm dans une pièce à température contrôlée ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). La durée de la phase de production a été fixée à 7 jours pour toutes les expériences afin de faciliter leur comparaison.

3.6 Culture en bioréacteur

Deux types de bioréacteurs ont été utilisés dans le cadre de ce projet. Le premier possède un volume utile de 3.5 L (volume maximal 4 L) et le second un volume utile de 6.5 L (volume maximal 7 L).

3.6.1 Bioréacteur 4 L

Le bioréacteur de 4 L est composé d'un réservoir en verre sur lequel repose un couvercle en acier inoxydable (SS-316) usiné. Le couvercle est fixé par l'utilisation de brides et d'un joint en caoutchouc. L'agitation est réalisée par une hélice à doubles rubans hélicoïdaux et des chicanes de surface. La rotation de l'hélice est assurée par un moteur (modèle 4554-10, Stir-Pak, Cole Palmer) dont la vitesse est ajustée manuellement à 60 rpm et mesurée périodiquement à l'aide d'un tachymètre portable (modèle 20904-010, VWR).

Ce bioréacteur possède un port d'échantillonnage à sa base et plusieurs ports sur son couvercle (voir Figure 3.1). Les ports du couvercle comprennent 1 port d'inoculation, 1 port d'alimentation en gaz, 1 port de sortie des gaz et 2 ports d'alimentation en milieu ou nutriments pouvant être relié à des réservoirs de milieu ou de nutriments spécifiques. Le

couvercle contient également 1 port muni d'une sonde à oxygène dissous (modèle 322756702, Ingold, Mettler toledo).

Les gaz d'alimentation sont stérilisés en passant par deux filtres 0.45 (Bacterial air vent, Gelman Sciences) consécutifs avant d'être acheminés à un aérateur poreux à la base du bioréacteur. L'aérateur poreux permet la création de microbulles favorisant le transfert gazeux dans le milieu de culture. Les gaz de sortie traversent une trappe à mousse avant de passer par des filtres stériles 0.45 μm (Bacterial air vent, Gelman Sciences) et d'être analysés dans un moniteur à gaz carbonique (modèle 880A, Rosemount analytical).

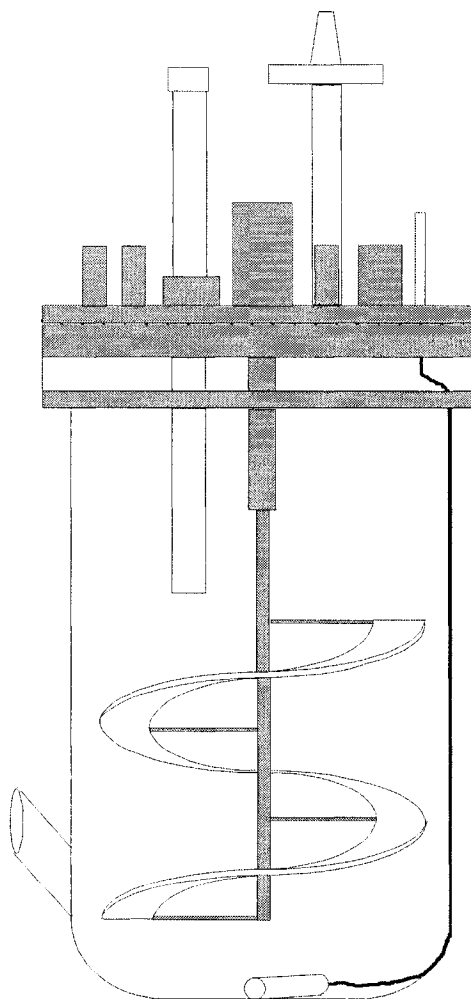


Figure 3.1 – Bioréacteur 4 L (Galipeau, 2004)

3.6.2 Bioréacteur 7 L

Le bioréacteur 7 L (Figure 3.2) est composé de deux parties superposées et jointes étanchement. La partie inférieure du réservoir (jusqu'à 3 L) est faite d'acier inoxydable (SS-316), tandis que la partie supérieure est faite de verre. Le couvercle est fixé par des vis et un joint en caoutchouc. L'agitation est réalisée par une hélice à doubles rubans hélicoïdaux et le vortex est brisé à l'aide de trois chicanes de surface. La rotation de l'hélice est assurée par un moteur (modèle 108226, Leeson,) dont la vitesse est ajustée manuellement à 30 rpm et mesurée périodiquement à l'aide d'un tachymètre portable (modèle 20904-010, VWR).

Ce bioréacteur possède également un port d'échantillonnage à sa base. Sa partie inférieure possède aussi d'autres ports, dont un port utilisé pour la sonde à oxygène dissous (modèle 322756702, Ingold, Mettler toledo,). Le couvercle comprend un port d'inoculation, un port de sortie des gaz et deux ports d'alimentation en milieu ou nutriments pouvant être relié à des réservoirs de milieu ou de nutriments spécifiques.

Les gaz d'alimentation sont stérilisés en passant par deux filtres 0.45 (Bacterial air vent, Gelman Sciences) consécutifs avant de traverser une plaque poreuse à la base du bioréacteur. La plaque poreuse permet la création de microbulles favorisant le transfert gazeux dans le milieu de culture. Les gaz de sortie traversent une trappe à mousse avant de passer par des filtres stériles 0.45 μm (Bacterial air vent, Gelman Sciences) et d'être analysées dans un moniteur à gaz carbonique (Rosemount analytical, modèle 880A).

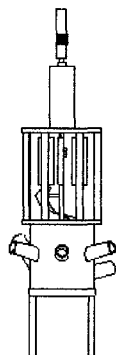


Figure 3.2 – Bioréacteur 7 L

3.6.3 Contrôle des bioréacteurs

La concentration en oxygène dissous des cultures est mesurée à l'aide d'une sonde palographique stérilisable (modèle 322756702, Ingold, Mettler toledo). Après une période de polarisation de 24 heures, la sonde est calibrée avec de l'eau saturée à l'air (100% oxygène dissous). La concentration en gaz carbonique dans les gaz de sortie est analysée grâce à un moniteur infrarouge de haute précision (modèle 880A, Rosemount analytical) d'une capacité 0 à 10%. La calibration du moniteur est réalisée à l'aide d'azote (0%) et de gaz certifié à 8.00% de gaz carbonique (Air liquide).

Les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone dissous dans le bioréacteur sont maintenues respectivement à 120% et 4% par un système de contrôle (Altersis, Virgo). Le contrôleur utilise les données en ligne d'oxygène dissous et une estimation du gaz carbonique dissous (en utilisant les données en ligne de gaz carbonique dans les gaz de sortie) pour ajuster les débits d'alimentation en air et en oxygène gazeux grâce à des débitmètres (5850E, Brooks instruments). La température des bioréacteurs est maintenue par un contrôle de la température ambiante dans le laboratoire à $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.6.4 Inoculation

L'inoculation d'un bioréacteur est une opération clef dans le succès d'une culture. Dans un premier temps, des cellules doivent préalablement être sous-cultivées en flacons quelques jours à l'avance de manière à être en phase exponentielle de croissance. D'après les résultats de concentration de biomasse sèche et des concentrations en nutriments provenant de l'échantillonnage de l'inoculum, du milieu de croissance est préparé afin d'ajuster la concentration de biomasse dans le bioréacteur après dilution à un niveau supérieur à 5 gDW/L tout en conservant des concentrations de nutriments proches des niveaux théoriques d'un milieu B5 ajusté (section 3.2.1).

L'inoculation d'un bioréacteur se fait sous une hotte stérile (PN62675, Enviroco) aux abords d'un brûleur bunsen et à l'aide d'une torche au propane. Avant l'inoculation, le bioréacteur et les différents instruments servant à son inoculation sont stérilisés à l'autoclave à 121°C et 15 psi pendant 50 minutes. Une fois le matériel suffisamment

refroidi suite au cycle de stérilisation, les cellules de l'inoculum et le milieu de croissance sont successivement ajoutés de façon stérile dans le bioréacteur par le port d'inoculation.

3.6.5 Élicitation

L'élicitation d'un bioréacteur s'effectue par l'ajout successif de trois éléments à la culture de cellules végétales : milieu de production (section 3.2.2), solution d'éliciteur (section 3.3) et résine adsorbante (section 3.4). Afin d'éviter un débordement du bioréacteur suite à l'ajout de ces éléments, le volume de suspension cellulaire dans le bioréacteur est tout d'abord abaissé en conséquence.

Le processus d'élicitation est initialisé par l'introduction de la solution d'éliciteur dans le bioréacteur par un port d'ajout. L'ajout se fait de façon stérile à l'aide d'une flamme. De la même manière, le milieu de production est ensuite introduit dans la culture. Après 1 heure, le ballon contenant la résine adsorbante (100 g/L final) est ajoutée. Le laps de temps séparant les deux phases d'ajouts est basé sur des résultats d'une étude sur le temps d'introduction de la résine après l'élicitation réalisée dans des travaux sur la lignée LCR02 dans le groupe de recherche chez Phytobiotech inc. (Galipeau, 2004).

3.6.6 Culture en cuvée alimentée

Dans cette étude, les bioréacteurs ont toujours été opérés en mode cuvée alimentée (*fed-batch*). Ce mode d'opération se distingue d'une simple opération en mode cuvée par l'ajout de nutriments tout au long de la culture afin d'éviter toute limitation nutritionnelle. D'une part, l'ajout d'ammonium dans les bioréacteurs se fait grâce à une pompe péristaltique (7503-01, Masterflex) et d'une solution d'ammonium citrate concentrée (45 g/L) afin de maintenir les concentrations de NH_4^+ constantes entre 3 et 8 mM. Il est aussi possible d'alimenter le glucose pendant une phase de production en bioréacteur à l'aide d'une pompe péristaltique (7503-01, Masterflex) et d'une solution de glucose concentrée (400 g/L). Les autres ions majeurs sont ajoutés ponctuellement de façon stérile.

3.7 Échantillonnage et mesure

Afin d'évaluer l'évolution des cultures de cellules, des échantillons homogènes sont prélevés des bioréacteurs et des flacons. À partir d'un échantillon, une série de mesures peut être prise afin de suivre le pH, la croissance de biomasse, les concentrations des nutriments et les concentrations de métabolites secondaires (phase de production seulement).

3.7.1 Technique d'échantillonnage homogène et stérile

Il y a deux façons différentes de prendre un échantillon homogène et stérile selon la provenance des cellules : un bioréacteur ou un flacon. La prise d'échantillon à partir d'un bioréacteur se fait à l'aide d'un flacon stérile (stérilisé à l'autoclave à 121°C et 15 psi pendant 25 minutes) muni d'une sortie d'air avec un filtre 0.22 µm stérile (Bacterial air vent, Gelman Sciences) et d'une source de chaleur. Le flacon d'échantillonnage est inséré dans le port d'échantillonnage du bioréacteur après une brève stérilisation à la flamme. Un volume variable peut alors être transféré du bioréacteur au flacon en dévissant les 2 pinces Hoffman qui assurent l'étanchéité du port d'échantillonnage. L'homogénéité de l'échantillon est assurée par l'agitation dans le bioréacteur. La stérilité du bioréacteur est assurée après la prise de l'échantillon en revissant les pinces Hoffman, en chauffant la sortie du port d'échantillonnage et en la plongeant dans un flacon d'éthanol 95% jusqu'au prochain échantillonnage du bioréacteur.

La prise d'échantillon à partir d'un flacon de 125, 250, 500 ou 1000 mL est beaucoup plus simple. La stérilité de l'opération est assurée en travaillant dans une hotte stérile (PN62675, Enviroco) et en chauffant l'ouverture du flacon à la flamme d'un brûleur bunsen avant et après le transfert de la suspension cellulaire. Un échantillon homogène est pris en mélangeant le flacon et en vidant une partie de la suspension cellulaire dans un flacon, une éprouvette ou un vial.

3.7.2 Concentration de la biomasse humide et sèche

Un volume homogène de suspension cellulaire est versé dans un vial de 20 mL (Fisher). Le vial vide a préalablement été pesé. Le vial plein est ensuite pesé puis le contenu est

filtré sous vide avec un filtre de nitrocellulose 0.45 μm (Millipore, Fischer Scientific). La biomasse recueillie est placée avec le filtre dans une cupule de masse connue (Fischer), pesée et mise à sécher dans un four (Despatch) à 80°C. Après 24 heures, la cupule contenant la biomasse sèche est pesée à nouveau.

Les données de poids recueillies permettent de calculer des concentrations de biomasse humide (gWW/L) et sèche (gDW/L). Un rapport de la biomasse humide sur la biomasse sèche (W/D) est aussi calculé à partir de ces données.

3.7.3 pH extracellulaire

Le pH du milieu de culture des échantillons est mesuré à l'aide d'une sonde Accumet ® (pH meter model 805mp, Fischer Scientific).

3.7.4 Concentrations des nutriments

3.7.4.1 Extracellulaires

Un volume de 2 mL de l'échantillon est filtré dans un vial pour HPLC (Kimble glass, Fischer) à l'aide d'une seringue muni d'un filtre 0.45 μm (Fischer Scientific). Le contenu du vial est ensuite analysé au HPLC (section 3.8) pour déterminer les concentrations en ions et en glucides.

3.7.4.2 Intracellulaires

Au moins 20 mL d'échantillon est filtré sur un morceau de miracloth (Calbiochem) et rincé avec 50 mL d'eau distillée. Ensuite, 1.5 g de biomasse humide est congelée avec de l'azote liquide afin d'arrêter toute réaction enzymatique et la préserver jusqu'au traitement de l'échantillon. La biomasse congelée est gardée au congélateur (-20°C) jusqu'à l'extraction des ions intracellulaires.

À l'extraction, la biomasse congelée est réduite en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon (60316, Coortek), pesée et placée dans un tube à centrifugation 15 mL (Fischer). Un volume de 8 mL d'eau déionisée est ajouté à la biomasse pour extraire les ions puis le tube est placé sur un agitateur orbital à 250 rpm (676D, New Brunswick Sc.) pendant

1 heure. 2 mL de l'extrait de biomasse sont ensuite filtrés dans un vial pour HPLC (Kimble glass, Fischer) à l'aide d'une seringue muni d'un filtre 0.45 μm (Fischer). Le contenu du vial est ensuite analysé au HPLC (section 3.8) pour déterminer les concentrations en ions et en glucides.

3.7.5 Concentrations de métabolites secondaires

La concentration de métabolites secondaires dans un échantillon contenant de la biomasse (X) et de la résine (R) est déterminée en 5 étapes. Premièrement, il faut déterminer la concentration de biomasse dans l'échantillon. Celui-ci est donc pesé et filtré, puis la concentration de biomasse est calculée en soustrayant la concentration connue de résine (100 g/L). Ensuite, 2 g de biomasse ou de résine sont pesés et placés dans un tube d'extraction de 50 mL (Fischer) avec 20 mL de méthanol acidifié. Le tube d'extraction est alors mis sur un agitateur à 250 rpm (676D, New Brunswick Scientific) pour une période d'environ 2 à 24 heures. L'extrait de méthanol est filtré avec une seringue munie d'un filtre (Nylon 0.45 μm , Millipore) dans un vial pour HPLC et son contenu est analysé au HPLC pour la quantification des métabolites secondaires d'intérêt, des TIA dans le cas de cette étude (section 3.8).

Finalement, les résultats de concentrations de métabolites secondaires dans l'extrait de méthanol (mg/L) sont transformés en rendements de métabolites secondaires par gramme de biomasse sèche élicitée (mg/gDW). L'utilisation de résultats sous forme de rendements permet une comparaison plus juste de la production. Ainsi, la comparaison de rendements met en valeur l'efficacité de production des cellules.

3.8 Analyse HPLC

3.8.1 Ions

Les cations et les anions sont analysés à l'aide d'un HPLC avec un détecteur électrochimique (Dionex) opéré en mode conductivité. Pour les anions, la phase mobile est une solution aqueuse d'acide méthanosulfonique 20 mM alimentée à 0.9 ml min⁻¹ et leur séparation est effectuée à l'aide d'une colonne 4x250 mm (IONPAC AS4A-SC, Dionex) et un supprimeur cationique (ASRS-1, Dionex). Quant aux anions, la phase

mobile est une solution aqueuse de bicarbonate (35 mM Na₂CO₃ et 1.0 mM NaHCO₃) alimentée à 1.0 ml min⁻¹ et leur séparation est effectuée à l'aide d'une colonne 4x250 mm (IONPAC CS-12, Dionex) et un suppresseur anionique (CSRS-1, Dionex). Une pompe (Dionex) sert à l'alimentation des solutions. La commande de la pompe et de l'injecteur automatique (AS3500, Spectra System) ainsi que l'acquisition de données est accomplie par le logiciel PeakNet 5.2 (Dionex).

3.8.2 Glucides

Les glucides sont analysés à l'aide d'un HPLC muni d'un détecteur à indice de réfraction (7515-A, ERC Inc). La phase mobile est de l'eau déionisée alimentée à 0.25 ml min⁻¹ par une pompe (modèle 501, Waters). La séparation (saccharose, glucose, fructose) est effectuée à l'aide d'une colonne analytique (Aminex HPX87C, Biorad) maintenue à 80 ± 3°C par un élément chauffant (7980, Mantech). L'acquisition de données est accomplie par le logiciel PeakNet 5.2 (Dionex).

3.8.3 Alcaloïdes

Les concentrations des différents alcaloïdes ont été obtenues par analyse au HPLC avec un détecteur UV DAD - 225 nm (Agilent, 190-400 nm, 1100 series) et la comparaison de standards. Les standards disponibles étaient la tryptamine, l'ajmalicine, la serpentine, la tabersonine, la catharanthine, la vindoline, la vinblastine, la vincristine et la vincamine. La phase mobile utilisée consistait d'un gradient de tampon ammonium formate 5 mM/ hydroxide d'ammonium pH 9:ACN alimentée à 1.0 ml min⁻¹. La séparation des alcaloïdes est effectuée à l'aide d'une colonne analytique (Phenomenex, LUNA C18(2), 250 mm x 4, 6 mm, 5 um) pendant une séquence de 60 min. La commande de la pompe et de l'injecteur automatique (Agilent, 1100 series) ainsi que l'acquisition de données est accomplie par le logiciel Chemstation Rev. A.09.01 (Agilent).

Une identification supplémentaire des différents alcaloïdes a été effectuée par analyse au HPLC en série à la détection UV avec un détecteur MS quadrupole (Agilent, Source API-ES, scan positif 150-1500amu, 1100 series SL) et la comparaison aux standards mentionnés ci haut.

CHAPITRE 4

4 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Cette section présente les résultats des principales expériences réalisées dans le cadre de l'étude de l'élicitation d'une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus*. Les résultats d'expériences ont été regroupés en 4 catégories permettant une exploration graduelle du processus d'élicitation et des résultats de production de TIA. La cinquième section propose une étude comparative des rendements obtenus à travers les différentes expériences et résume ainsi la progression effectuée dans l'augmentation des rendements en TIA.

4.1 Sélection d'une lignée cellulaire productive de *C. roseus*

La sélection d'une lignée productive à partir de suspensions cellulaires de plantes est une étape charnière dans l'augmentation des rendements de métabolites secondaires. En effet, la production de métabolites secondaires varie d'une lignée cellulaire à l'autre (Bourgau et coll., 2001). Dans le cadre de cette étude, des suspensions cellulaires de *C. roseus* ont été établies pour la production de TIA. Il est donc primordial d'effectuer un tamisage des lignées cellulaires disponibles afin de sélectionner une lignée ayant un bon potentiel de production. Ainsi, il sera plus facile et intéressant d'étudier l'impact de différents facteurs sur la phase d'élicitation et les rendements subséquents de TIA.

L'établissement et le maintien de lignées cellulaires de plantes ont été réalisés selon la méthode standard (section 3.1). Trois lignées cellulaires de *Catharanthus roseus* étaient disponibles au moment de cette étude : LCR01, LCR02 et LCR03. Ces trois lignées ont été développées à partir de différentes graines de *C. roseus* et maintenues dans un milieu nutritif B5 avec du 2,4-D et de la kinétine comme hormones (section 3.2.1).

La production de TIA a été obtenue par l'inoculation et l'élicitation subséquente de cellules dans des flacons 125 mL. Les cellules utilisées pour l'expérience provenaient de 3 flacons de 500 mL contenant chacun les différentes lignées de *C. roseus*. L'inoculation

des flacons a été réalisée par la méthode de filtration stérile (section 3.5.1). L'élitation des cultures en flacons a été effectuée avec une combinaison de milieu de production (section 3.2.2), 100 g/L de résine XAD-7 (section 3.4) et deux différents éliciteurs : 0.9 g/L de chitine ou 100 μ M de MeJa (section 3.3). Les flacons en phase de production ont été maintenus sur un agitateur orbital à 100 rpm pendant 7 jours.

L'analyse des résultats au HPLC a révélé la présence de quatre alcaloïdes : la tryptamine, l'ajmalicine, la catharanthine et la tabersonine. Les résultats de production en alcaloïdes obtenus pour chaque lignée et éliciteur sont présentés sous forme de rendements en TIA spécifiques à la Figure 4.1.

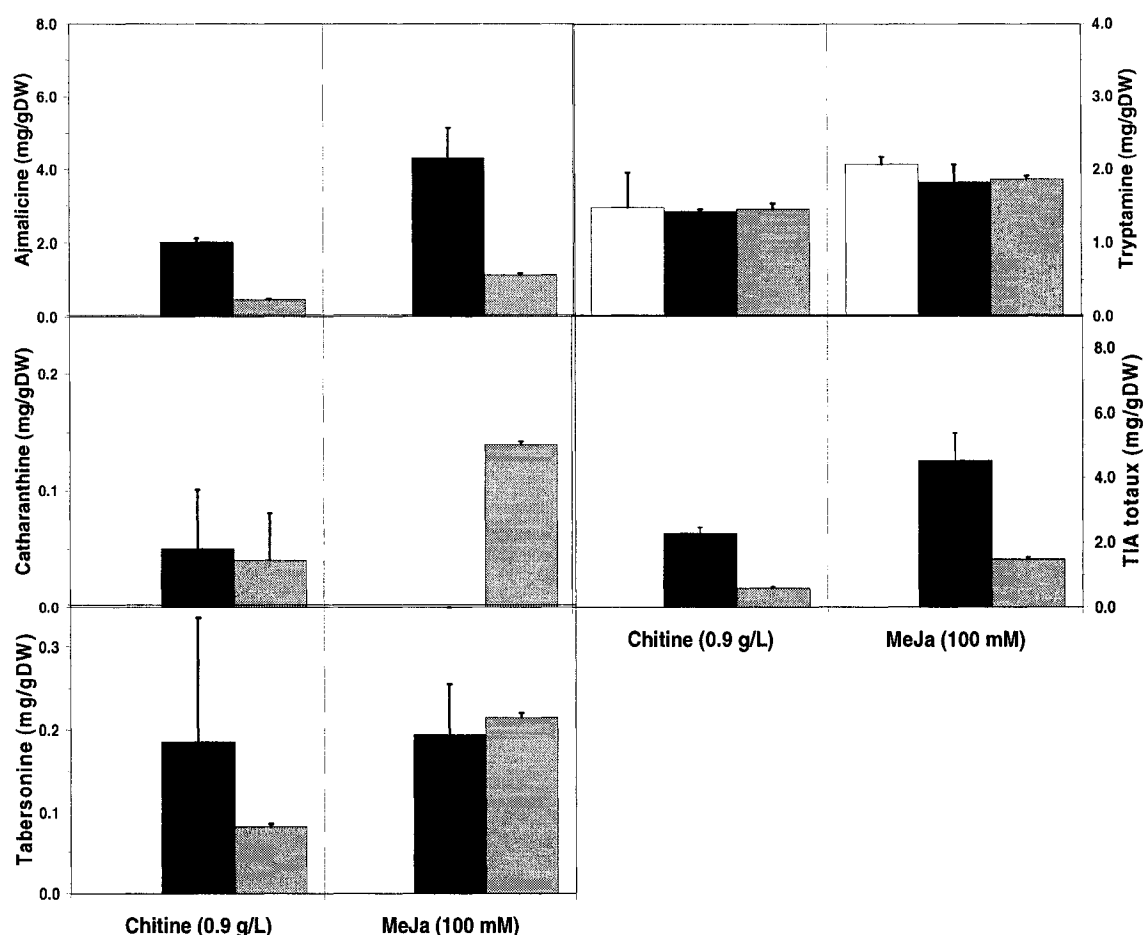


Figure 4.1 – Rendements spécifiques de TIA en fonction de la lignée cellulaire. □ : LCR01, ■ : LCR02, ▒ : LCR03. Les barres d'erreurs représentent le résultat maximum pour les cultures en duplicata.

Selon les résultats de la Figure 4.1, il est facile d'éliminer le choix de la lignée LCR01 car elle ne produit aucun des TIA d'intérêt. Peu importe l'éliciteur utilisé, cette lignée accumule seulement de la tryptamine, le précurseur indolique des TIA. Ces résultats confirment des résultats d'expériences antérieures effectuées en flacons et en bioréacteurs (données non publiées) dans lesquelles la lignée LCR01 ne produisait que de minimes quantités de TIA (< 1.0 mg/g DW).

Afin de sélectionner l'une des lignées LCR02 et LCR03, il suffit d'observer le graphique des rendements en TIA totaux. En effet, peu importe l'éliciteur, la lignée LCR02 montre des rendements au moins deux fois plus élevés que la lignée LCR03 en TIA totaux. La supériorité en TIA totaux de la lignée LCR02 est due à son accumulation d'ajmalicine, car elle ne produit pas plus de catharanthine ni de tabersonine que la lignée LCR03. D'autre part, les rendements en tryptamine pour les trois lignées et les deux éliciteurs sont sensiblement équivalents. Cependant, l'accumulation de tryptamine n'est pas un critère de sélection car ce précurseur indolique n'est pas un TIA d'intérêt. La lignée LCR02 a été sélectionnée parmi les trois lignées testées parce qu'elle a obtenue les meilleurs rendements en TIA totaux, soit 2.3 mg/g DW (élicitation avec chitine) et 4.5 mg/g DW (élicitation avec MeJa). Il est à noter que l'essentiel de la production de TIA par la lignée LCR02 est constituée d'ajmalicine, mais il y a aussi présence de catharanthine et de tabersonine. La poursuite des travaux sur l'efficacité d'élicitation et la production de TIA avec la lignée LCR02 est justifiée puisque cette lignée produit significativement des TIA d'intérêt, contrairement à la lignée LCR01.

4.2 Expérimentation en flacons

La culture de cellules végétales en flacons est le moyen le plus couramment utilisé dans la littérature pour l'étude de facteurs influençant la production de métabolites secondaires. Le principal avantage de la culture en flacons est la possibilité d'effectuer des expériences combinant un nombre élevé de facteurs et de répétitions en utilisant un minimum de matériel (flacons, agitateur, milieu) et de suspension cellulaire (faible

densité, petit volume). La majorité des expériences effectuées dans le cadre de cette étude ont donc été réalisées en flacons.

Les résultats présentés dans cette section proviennent de deux expériences distinctes. La première étudie l'influence du volume de suspension cellulaire sur les rendements de TIA. La deuxième expérience se penche sur l'effet de la concentration de biomasse (gWW/L) en combinaison avec deux autres facteurs : le type d'éliciteur (chitine ou MeJa) et la méthode d'inoculation des flacons.

4.2.1 Effet du volume de suspension cellulaire

Le premier facteur testé dans l'étude des rendements de TIA en flacons a été le volume de suspension par l'utilisation de différents formats de flacons. À une vitesse d'agitateur constante (100 rpm) et un ratio volume de suspension sur volume total constant (50%), il a été observé que des flacons de plus gros format sont agités plus vigoureusement. Une agitation plus forte du milieu de culture peut avoir différents effets : une meilleure aération du milieu, un meilleur contact entre les cellules et la résine adsorbante et un cisaillement plus élevé aux parois du flacon. Les résultats présentés dans cette section tenteront de déterminer si les effets reliés au volume de suspension cellulaire, et par conséquent l'agitation, ont une influence significative sur les rendements de TIA.

Trois formats de flacons (125, 250 et 500 mL) ont été utilisés pour l'étude de la production en flacons. Les cellules utilisées pour l'expérience provenaient d'une même cuvée de cellules de *C. roseus* (LCR02) sous-cultivées en flacons de 1000 mL. L'inoculation des flacons a été réalisée par la méthode de filtration stérile (section 3.5.1). L'élicitation des cultures en flacons a été effectuée avec une combinaison de milieu de production (section 3.2.2), 100 g/L de résine XAD-7 (section 3.4) et 100 μ M de MeJa (section 3.3). Les flacons en phase de production ont été maintenus sur un agitateur orbital à 100 rpm pendant 7 jours.

L'analyse des résultats au HPLC a révélé la présence de quatre alcaloïdes : la tryptamine, l'ajmalicine, la catharanthine et la tabersonine. Les résultats de production obtenus pour

chaque format de flacon sont présentés sous forme de rendements en TIA spécifiques à la Figure 4.2.

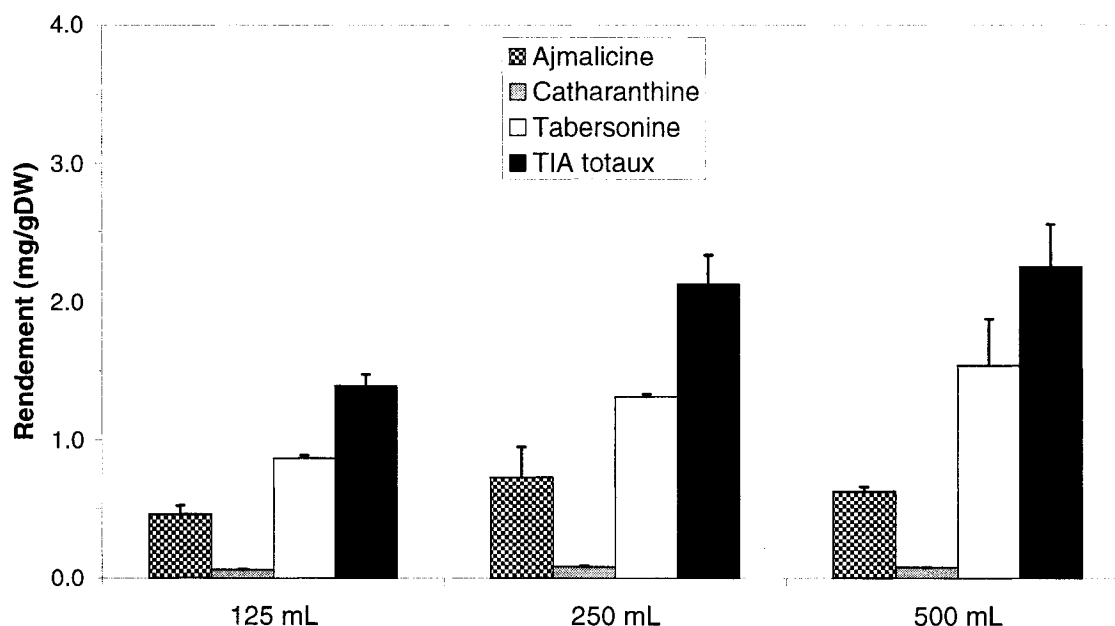


Figure 4.2 - Rendements spécifiques de TIA en fonction du volume du flacon. Les barres d'erreurs représentent le résultat maximum pour les cultures en duplicata.

L'observation des rendements en TIA totaux présentés à la Figure 4.2 montre que l'utilisation de flacons de 250 et 500 mL semble favoriser une plus grande production de TIA par les cellules de *C. roseus* en comparaison à l'utilisation de flacons de 125 mL, soit environ 2.1 mgTIA/gDW par rapport à 1.4 mgTIA/gDW. Ce résultat est principalement due à l'augmentation des rendements de la tabersonine. En effet, peu importe le format de flacon utilisé, la production de tabersonine représente environ 65% de la production totale en TIA. En comparaison, la production de catharanthine représente moins de 5% de la production totale. C'est donc dire que l'augmentation du volume de flacons a des effets bénéfiques sur la production de tabersonine. Il serait donc intéressant d'observer si l'utilisation de flacons de 1000 mL dans les mêmes conditions de production résulterait aussi à une augmentation des rendements de tabersonine. Enfin, puisque l'augmentation du format de flacons amplifie l'agitation de la suspension cellulaire, il faudrait éventuellement comprendre l'impact distinctif des effets sous-jacents à l'agitation (aération, cisaillement, mélange) sur les rendements en TIA.

Cependant, une étude du genre serait plus facile et utile au niveau de la production en bioréacteur. Malheureusement, le raffinement de l'étude jusqu'en bioréacteur n'a pas pu être effectué au cours de cette étude.

Les résultats de l'expérience sur l'étude des rendements en TIA totaux selon le format de flacons utilisé et le volume sous-jacent de suspension cellulaire pendant la phase de production semblent montrer que les flacons de 250 et 500 mL permettent d'obtenir de meilleurs résultats que ceux de 125 mL. Cependant, les rendements en TIA étant à peu près équivalents pour les formats 250 et 500 mL, il serait plus avantageux d'utiliser le format de 250 mL lors de vastes études de production en flacons, par exemple un tamisage d'éliciteurs avec répétitions, pour minimiser la quantité de cellules requises.

D'autre part, l'écart minime entre les rendements générés par l'utilisation des 3 différents formats de flacons ($<1 \text{ mgTIA/gDW}$) pourrait être considéré négligeable en comparaison à la variation générée par d'autres paramètres comme la concentration de biomasse à l'élicitation, le choix d'éliciteur et l'état de la suspension cellulaire à l'élicitation (sections 4.2.2, 4.3 et 4.4).

Malgré tout, l'utilisation systématique du flacon de 250 mL a été choisie pour la suite des expériences de production en flacons avec la lignée LCR02.

4.2.2 Effet de la concentration de biomasse

Le second facteur testé dans l'étude des rendements de TIA en flacons a été l'effet de la concentration de biomasse dans la suspension cellulaire à l'élicitation. Deux hypothèses de bases sont à l'origine de l'expérience réalisée à cette fin. La première est qu'à une concentration de biomasse trop faible, le stress induit par l'introduction d'un éliciteur dans le milieu de production cause une forte mortalité cellulaire et résulte conséquemment en une diminution de la capacité de production de métabolites secondaires. La deuxième hypothèse est qu'à une concentration de biomasse trop élevée, les cellules ne peuvent produire à leur plein potentiel à cause d'une limitation en oxygène due au faible taux de transfert (k_{La}) caractérisant l'aération de surface en flacons.

4.2.2.1 Effet de la concentration de biomasse en fonction du type d'éliciteur

Dans un premier temps, l'effet de la concentration de biomasse a été étudié par rapport au type d'éliciteur utilisé pour induire la production de TIA. L'objectif de l'expérience était d'observer si différentes concentrations de biomasse à l'élicitation avaient le même impact sur les rendements de TIA pour deux types d'éliciteurs (chitine et MeJa) et un contrôle sans éliciteur.

Les rendements en TIA ont été obtenus par l'inoculation et l'élicitation subséquente de cellules dans des flacons de 250 mL. Les cellules utilisées pour l'expérience provenaient d'une même cuvée de cellules de *C. roseus* (LCR02) sous-cultivées en flacons 1000 mL. L'inoculation des flacons a été réalisée par la méthode de filtration stérile (section 3.5.1) de manière à constituer 3 séries à 3 concentrations de biomasse humide : 20, 40 et 60 gWW/L (0.9, 1.8 et 2.7 gDW/L). Chaque série se distinguait par le type d'éliciteur utilisé : contrôle (série A), chitine (série B), MeJa (série C). L'élicitation des cultures en flacons a été effectuée avec une combinaison de milieu de production (section 3.2.2) et 100 g/L de résine XAD-7 (section 3.4). De plus, dans les cas de la série B et C respectivement, 0.9 g/L de chitine et 100 µM de MeJa (section 3.3) ont été ajoutés. Les flacons en phase de production ont été maintenus sur un agitateur orbital à 100 rpm pendant 7 jours.

L'analyse des résultats au HPLC a révélé la présence de quatre alcaloïdes : la tryptamine, l'ajmalicine, la catharanthine et la tabersonine. Les résultats de production obtenus pour les différentes concentrations de biomasse et type d'éliciteur sont présentés sous forme de rendements en TIA spécifiques à la Figure 4.3.

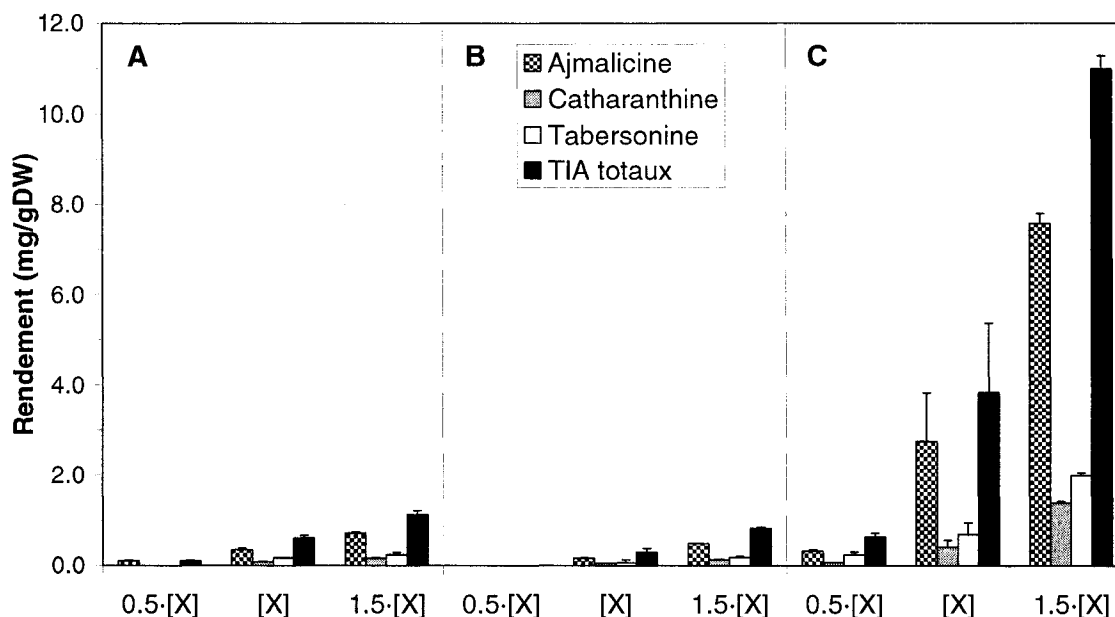


Figure 4.3 – Rendements spécifiques de TIA en fonction de la concentration de biomasse et du type d'éliciteur : (A) aucun éliciteur (contrôle), (B) 0.9 g/L de chitine, (C) 100 μ M de MeJa. Les barres d'erreurs représentent le résultat maximum pour les cultures en duplicata.

En premier lieu, en regardant séparément les rendements de la Figure 4.3 pour chaque série A, B et C, il est possible de constater que l'augmentation de la concentration de biomasse à l'élicitation résulte en une hausse des rendements en TIA spécifiques et totaux. Dans la plage de concentration de biomasse étudiée, un rendement spécifique maximum de TIA ne semble pas avoir été atteint à la concentration de biomasse maximale selon la tendance observée. Cependant, à la concentration de biomasse minimale testée, les rendements de TIA sont extrêmement faibles pour les trois séries. Les rendements en TIA sont sous le seuil de détection pour la série élicitée avec la chitine (B). Ceci semble indiquer qu'il existe un seuil critique de concentration de biomasse. Ce seuil critique est peut-être dû à l'atteinte d'un niveau de toxicité fatale lorsque le ratio g éliciteur/g biomasse dépasse une certaine valeur. D'autres facteurs tels le ratio g nutriments/g biomasse ou g résine/g biomasse pourraient aussi avoir été à l'origine d'un effet toxique à la concentration minimale de biomasse testée.

En deuxième lieu, la comparaison des rendements de TIA entre chaque série montre qu'à une concentration donnée de biomasse à l'élicitation, le MeJa est un meilleur éliciteur que la chitine. Ces résultats confirment les résultats obtenus lors de la sélection de la lignée LCR02. Il est à noter que les rendements obtenus avec la série de flacons sans éliciteur (A) sont supérieurs à ceux des flacons élicités avec la chitine (B), mais bien inférieurs aux flacons élicités avec du MeJa (C). Une étude plus approfondie des rendements de TIA en fonction d'éliciteurs et de leur concentration est présentée plus loin (section 4.3.1).

En rappel, les trois concentrations de biomasse testées ont permis d'établir une concentration minimum critique de 40 gWW/L (1.8 g DW/L) en dessous de laquelle la production de TIA est trop faible. De plus, la concentration maximale de biomasse testée, 60 gWW/L (2.7 g DW/L), a donné les meilleurs rendements tout en montrant aucun signe de plafonnement.

4.2.2.2 Effet de la concentration de biomasse en fonction de la méthode d'inoculation

Dans un deuxième temps, la méthode d'inoculation des cellules de *C. roseus* dans les flacons de production a été étudiée afin de déterminer si ce facteur a un impact sur les rendements en TIA. Les deux méthodes d'inoculation les plus couramment utilisés dans les expériences avec des cellules végétales sont par filtration stérile des cellules et par transfert d'un volume de suspension cellulaire avec son milieu de croissance (section 3.5.1). La majorité des expériences en flacons effectuées dans le cadre de cette étude ont été réalisées en employant la méthode par filtration stérile des cellules. Malgré la plus grande difficulté technique de cette méthode, requérant plus de préparation matériel et un plus long temps d'exécution, elle fut généralement privilégiée car elle semblait faciliter l'inoculation uniforme d'une série de flacons à une concentration de biomasse fixe. De plus, la filtration des cellules assurait la précision des concentrations en nutriments du milieu de production puisque aucun volume résiduel du milieu de croissance n'y est transféré avec les cellules. Par contre, aucune information concrète

n'était connue sur l'impact physiologique de la filtration sur les cellules et les répercussions sur le potentiel de production de TIA des cellules suite à une élicitation. Donc, l'objectif de l'expérience était de comparer des résultats de production de TIA entre des flacons inoculés par filtration stérile (section 4.2.2.1) et par transfert de cellules.

Les rendements en TIA ont été obtenus par l'inoculation et l'élicitation subséquente de cellules dans des flacons de 250 mL. Les cellules utilisées pour l'expérience provenaient d'une même cuvée de cellules de *C. roseus* (LCR02) sous-cultivées en flacons de 1000 mL. Une série de flacons a été inoculée selon la méthode de transfert de biomasse avec son milieu de culture (section 3.5.1) afin d'obtenir une concentration approximative de biomasse humide de 60 gWW/L. L'élicitation des cultures en flacons a été effectuée avec une combinaison de milieu de production (section 3.2.2), 100 g/L de résine XAD-7 (section 3.4) et l'ajout de 100 μ M de MeJa (section 3.3) ou aucun éliciteur (contrôle). Les flacons en phase de production ont été maintenus sur un agitateur orbital à 100 rpm pendant 7 jours.

La série de flacons inoculée par transfert de cellules décrite ci-dessus a été réalisée simultanément et comparée à celle inoculée par filtration stérile décrite dans l'expérience précédente (section 4.2.2.1).

L'analyse des résultats au HPLC a révélé la présence de quatre alcaloïdes : la tryptamine, l'ajmalicine, la catharanthine et la tabersonine. Les résultats de production obtenus pour les différentes concentrations de biomasse et méthodes d'inoculation sont présentés sous forme de rendements spécifiques en TIA à la Figure 4.4. D'après ces résultats, il semble que la méthode d'inoculation par transfert de cellules avec leur milieu de croissance engendre des rendements en TIA spécifiques plus élevés que par filtration stérile. Cette constatation est valable pour l'élicitation au MeJa et le contrôle. Étant donné la plus grande difficulté technique à inoculer des flacons à une concentration de biomasse fixe lors de l'inoculation des flacons de 250 mL par la méthode de transfert de cellules, la concentration de biomasse présente dans ces flacons de production (54 gWW/L) n'a pu être parfaitement égale à celle des flacons inoculés précédemment par filtration stérile

(60 gWW/L). Cependant, à la lueur de résultats antérieurs (section 4.2.2.1), les rendements supérieurs en TIA obtenus par transfert de cellules sont donc d'autant plus convaincants pour l'utilisation future de cette méthode d'inoculation.

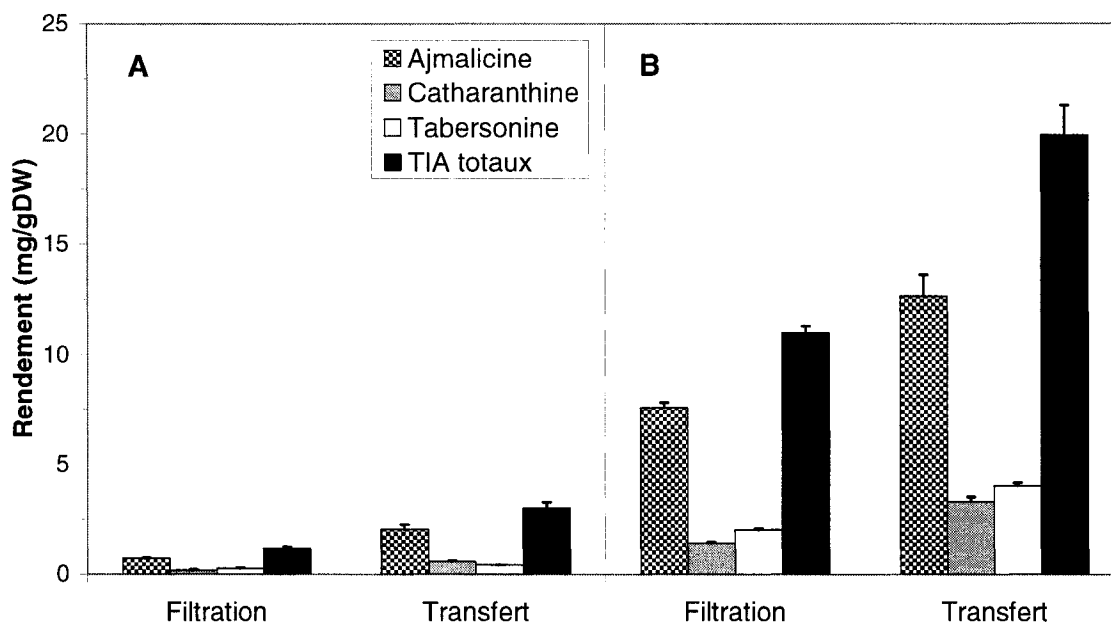


Figure 4.4 – Rendements spécifiques de TIA en fonction de la méthode d'inoculation et de deux éliciteurs différents: (A) aucun éliciteur (contrôle), (B) 100 μM MeJa. Les barres d'erreurs représentent le résultat maximum pour les cultures en duplicata.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats. D'une part, il est possible que l'inoculation par filtration stérile des cellules soit dommageable pour celles-ci et qu'une partie des cellules pesées (incluses dans le calcul du rendement) meurent ou soient affectées de telle sorte qu'elles ne produisent pas à pleine capacité. En effet, les cellules filtrées sont manipulées par une spatule potentiellement très chaude (suite à la stérilisation à la flamme) lors de leur inoculation dans les flacons. De plus, suite à leur introduction dans le milieu de production, les cellules subissent un choc osmotique possiblement néfaste au contact avec le milieu de production riche en nutriments. Bien que de tels stress physiques puissent contribuer positivement à l'élicitation de cellules végétales (section 2.3.1), il est possible que les inconvénients liés à la mortalité de cellules l'emportent.

D'autre part, l'inoculation par transfert de cellules avec leur milieu de croissance a pour conséquence d'introduire un certain volume de milieu de croissance résiduelle (pauvre en nutriments) de sorte que, pour un volume final fixe de 100 mL dans un flacon de 250 mL, le milieu de production ajouté à la suspension cellulaire est en réalité plus dilué ($\approx 85\%$ milieu de production/volume total) que lors d'une inoculation par filtration stérile (100% milieu de production). Il est possible que les cellules de *C. roseus* (LCR02) produisent mieux dans un milieu moins riche en nutriments ce qui aurait comme effet d'augmenter les rendements des cellules inoculées par transfert avec leur milieu de croissance. D'autres expériences effectuées sur la lignée cellulaire LCR02 ont d'ailleurs montré des résultats dans ce sens pour un milieu de culture 50% moins concentré en glucose (Galipeau, 2004). Conséquemment, il serait intéressant de comparer à nouveau les deux méthodes d'inoculation en s'assurant d'utiliser un milieu de production identiquement dilué.

4.3 Sélection d'un éliciteur

Une stratégie clef dans l'augmentation des rendements de TIA d'une culture de cellules de *C. roseus* est la sélection d'un éliciteur efficace. En effet, plusieurs études ont démontré que le choix d'éliciteur a un effet sur la quantité, la diversité et la proportion de TIA produits par des cellules de *C. roseus* (Moreno et coll., 1995; Akimoto et coll., 1999; Zhao et coll., 2000a; Namdeo et coll., 2002). La sélection d'un éliciteur efficace pour la production de TIA avec la lignée LCR02 a été effectuée en deux phases. Premièrement, une expérience de tamisage de différents éliciteurs à trois concentrations a été réalisée en flacons. Deuxièmement, une expérience de validation des trois meilleurs résultats d'élicitation en flacons a été réalisée en bioréacteurs.

4.3.1 Tamisage d'éliciteurs en flacons

Plusieurs études ont déjà été réalisées sur l'effet de différents éliciteurs sur la production de TIA avec des cellules de *C. roseus* (Tableau 2.3). L'analyse des différents résultats émergeant de ces études a permis une présélection d'éliciteurs parmi les différentes classes (Tableau 2.2). Les 5 éliciteurs choisis pour le tamisage d'éliciteurs et de

concentrations sont la chitine, le méthyle jasmonate (MeJa), l'acide malique (AM), le tetraméthyle ammonium bromide (TAB) et le trichlorure de cérium (CeCl_3).

La chitine est un polysaccharide similaire en structure à la cellulose à l'exception que l'unité répétitive est dérivée de l'acétylglucosamine plutôt que du glucose. La chitine est une composante des carapaces d'insectes et de crustacées en plus de se retrouver dans les champignons. Étant donné les bons résultats d'élicitation obtenus dans la littérature pour des extraits de champignons (section 2.3.1) et l'interdiction de manipuler des cultures de champignons dans les laboratoires de Phytobiotech Inc., la chitine a été sélectionnée comme éliciteur biotique.

Le MeJa est un éliciteur biotique à composition définie dérivé de lipides membranaires. Son rôle dans les voies de signalisation de l'élicitation dans les cellules végétales est bien étudié (section 2.3.2). Il a été sélectionné comme éliciteur à cause de son rôle dans le mécanisme d'élicitation, ses performances dans la littérature et chez Phytobiotech inc. avec *C. roseus* et d'autres espèces comme *Taxus* (section 2.3.1).

L'acide malique est aussi un éliciteur biotique à composition définie classé dans les glucides. C'est un composé naturel qui joue un rôle dans les processus énergétiques du cycle de Krebs. Il a été sélectionné en se basant sur des résultats intéressants d'élicitation de cellules de *C. roseus* pour la production de catharanthine (Tableau 2.4; Zhao et coll., 2000a).

Le CeCl_3 est un éliciteur abiotique considéré comme un élément rare. Il est notamment utilisé comme sonde pour mesurer la production et la localisation de peroxyde dans les cellules de plantes par son oxydation de Ce(III) à Ce(IV) . Des résultats d'étude ont aussi montré son efficacité sur l'élicitation de cellules de *C. roseus* et la production de TIA (Tableau 2.4; Zhao et coll., 2000b).

Finalement, le tetraméthyle ammonium bromide (TAB) est un éliciteur chimique abiotique soupçonné d'agir comme inhibiteur de peroxydase (Zhao et coll., 2000a). Il a été sélectionné en se basant sur des résultats intéressants d'élicitation de cellules de *C. roseus* pour la production de catharanthine (Tableau 2.4; Zhao et coll., 2000a).

Les rendements en TIA ont été obtenus par l'inoculation et l'élicitation subséquente de cellules dans des flacons de 250 mL. Les cellules utilisées pour l'expérience provenaient d'une même cuvée de cellules de *C. roseus* (LCR02) sous-cultivées en flacons 1000 mL. L'élicitation des cultures en flacons a été effectuée avec une combinaison de milieu de production (MP) (section 3.2.2), 100 g/L de résine XAD-7 (R) (section 3.4) et d'agents éliciteurs (section 3.3). Cinq agents éliciteurs différents ont été testés à trois doses différentes (Tableau 4.1): MeJa, chitine, acide malique, TAB et CeCl_3 . Le dosage effectué est montré au Tableau 4.1 et représente dans l'ordre 0.5, 1 et 2 fois la valeur d'une dose de référence (D_{ref}) basée sur des résultats dans la littérature (section 2.3.1). Les flacons en phase de production ont été maintenus sur un agitateur orbital à 100 rpm pendant 7 jours.

Tableau 4.1 – Détail du dosage de la légende de la Figure 4.5

Légende	50 % · D_{ref}	D_{ref}	200 % · D_{ref}
MC	--	Annexe A	--
MP	--	Annexe B	--
R	--	100 g/L	--
EtOH	--	0.25 %v/v	--
MeJa	50 μM	100 μM	200 μM
AM	30 mg/L	60 mg/L	120 mg/L
Chitine	0.5 g/L*	0.9 g/L	1.5 g/L**
TAB	75 mg/L	150 mg/L	300 mg/L
CeCl_3	2.5 mg/L	5 mg/L	10 mg/L

*55% · D_{ref}

**166% · D_{ref}

L'analyse des résultats au HPLC a révélé la présence de quatre alcaloïdes : la tryptamine, l'ajmalicine, la catharanthine et la tabersonine. Les résultats de production obtenus sont présentés sous forme de rendements spécifiques de TIA à la Figure 4.5.

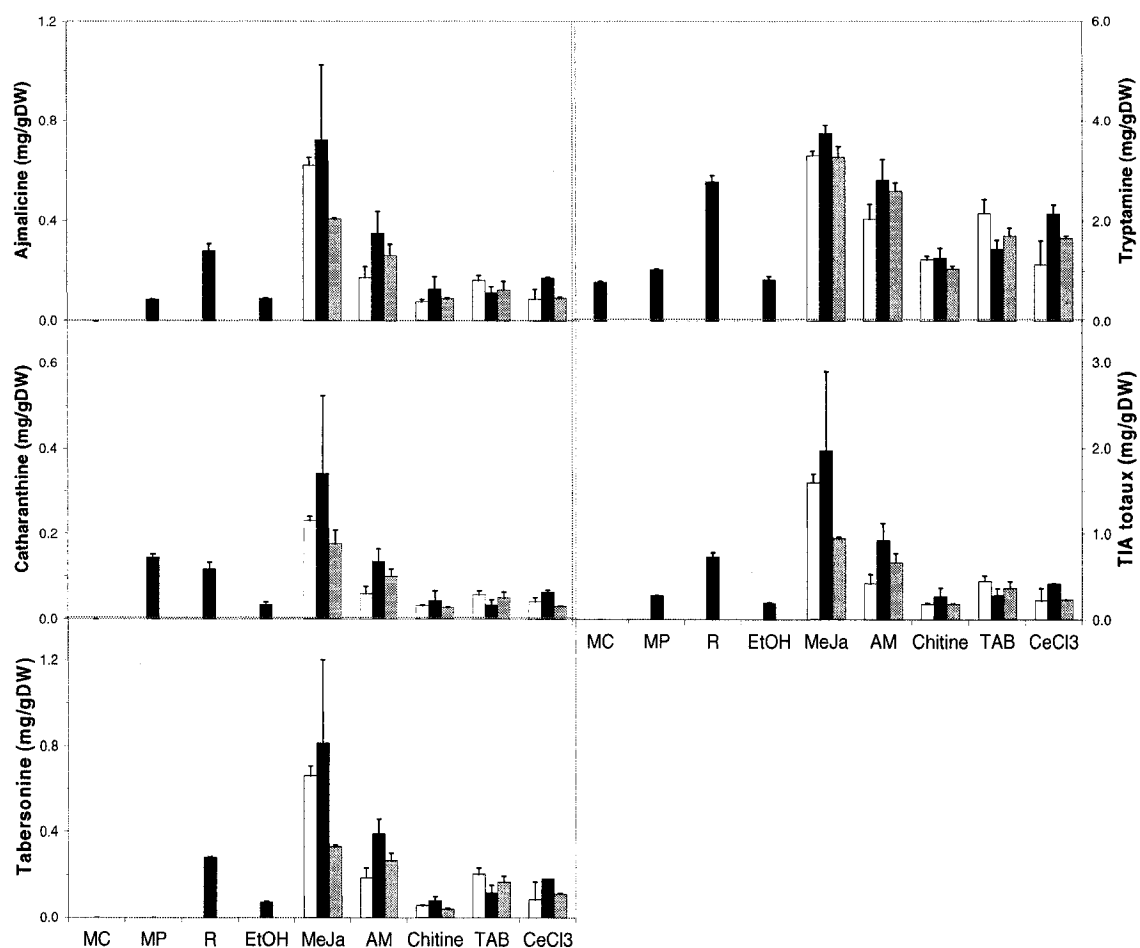


Figure 4.5 – Rendements spécifiques en fonction de différents agents éliciteurs et leur concentration (Tableau 4.1). □ : 50%·D_{ref}, ■ : D_{ref}, ▒ : 150%·D_{ref}. Les barres d'erreurs représentent le résultat maximum pour les cultures en duplicata.

Dans un premier temps, il est intéressant de comparer les résultats de rendements de la Figure 4.5 pour les catégories MC, MP, R et EtOH. Ces quatre séries de flacons servaient essentiellement à dissocier l'effet de l'éliciteur de l'effet des autres composants ajoutés à la suspension cellulaire sur la production de TIA. Tout d'abord, il est important de noter que le rendement en TIA totaux des cultures contenant seulement du milieu de croissance (MC) est nul. Donc, il ne semble pas y avoir d'accumulation de TIA à l'intérieur des cellules pendant la phase de croissance. L'utilisation d'un milieu de production (MP) sans hormones ni phosphate, mais riche en nutriments et contenant 6% de glucose (annexe B) a induit l'accumulation de 0.28 mgTIA/gDW. Donc, l'utilisation seule du milieu de production cause un stress suffisant aux cellules pour les éliciter. L'ajout additionnel de 100 g/L de résine XAD-7 (R) au milieu de production mène à l'accumulation d'environ 3 fois plus de TIA, soit 0.73 mgTIA/gDW. Ce résultat confirme la nécessité de l'ajout de résine XAD-7 pour la production de TIA par des cellules de *C. roseus* aussi mis en évidence dans des travaux parallèles (Galipeau, 2004). Par ailleurs, l'ajout de 0.25% (v/v) d'éthanol (EtOH) a diminué la production à 0.19 mgTIA/gDW. L'ajout d'éthanol servait à évaluer l'impact du solvant utilisé dans la solution de MeJa à une dose équivalente de 100 μ M. Donc, en comparaison avec le rendement précédent, l'ajout d'éthanol à cette concentration semble nuire à la production de TIA. Il est possible que l'éthanol induit de la mortalité cellulaire causant la diminution du rendement. Le rendement de production des flacons avec le milieu de production et la résine servira de point de référence (contrôle) pour évaluer la performance subséquente des agents éliciteurs.

Dans un second temps, il est possible de classer les agents éliciteurs testés selon l'impact qu'ils ont eu sur les rendements en TIA totaux par rapport au contrôle : positif, neutre, négatif.

Effet positif : MeJa

Un seul agent éliciteur testé a eu un effet positif sur les rendements par rapport au contrôle. Cet éliciteur est le MeJa et son rôle clef en tant que messenger secondaire dans

le mécanisme de transcription de gènes du chemin métabolique des TIA est bien connu (section 2.3.2). Le meilleur rendement en TIA totaux a été obtenu pour une concentration 100 μM (1.97 mgTIA/gDW). Cependant, en considérant l'écart entre les résultats en duplicata, le rendement de 1.60 mgTIA/gDW obtenu à 50 μM de MeJa peu être considéré équivalent. Dans l'intervalle de concentrations testé, il semble que la concentration optimale de MeJa à ajouter pour une élicitation efficace en flacons se situe entre 50 et 100 μM puisqu'un rendement inférieur a été obtenu à 200 μM de MeJa.

Effet neutre : acide malique

L'acide malique n'a pas semblé avoir d'impact sur les rendements de TIA par rapport au contrôle. En effet, la comparaison des rendements moyens avec leurs écarts (duplicata) obtenus pour les trois concentrations testées ne montre pas de différence importante par rapport au contrôle. Le meilleur résultat a cependant été obtenu à 60 mg/L d'acide malique, soit 0.92 mgTIA/gDW.

Effet négatif : chitine, TAB et CeCl_3

L'utilisation des trois autres agents éliciteurs (chitine, TAB, CeCl_3) a eu un impact négatif sur les rendements de TIA par rapport au contrôle. Peu importe la concentration testée, l'ajout de ces trois éliciteurs a toujours résulté à des rendements en TIA inférieurs à ceux du contrôle. Il est possible que la présence de ces éliciteurs cause une mortalité cellulaire qui expliquerait la diminution des rendements.

4.3.2 Validation d'éliciteurs en bioréacteurs

Le tamisage d'éliciteurs et de concentrations en flacons a permis d'identifier deux éliciteurs induisant des rendements en TIA supérieurs ou égaux à celui du contrôle. Ces éliciteurs sont respectivement le MeJa (100 μM) et l'acide malique (60 mg/L). Dans l'optique d'une mise à l'échelle de la production de TIA avec la lignée LCR02, il est important de vérifier la validité des résultats de ces éliciteurs pour des cultures en bioréacteurs.

La mise à l'échelle a été faite en bioréacteur de 3.5 L (section 3.6.1) en contrôlant la concentration d'oxygène dissous, de bioxyde de carbone dissous et des principaux nutriments. De plus, l'utilisation de bioréacteurs de 3.5 L permet un échantillonnage quotidien de la culture, donc un suivi de la production de TIA dans le temps.

La comparaison des rendements en TIA a été réalisée grâce à l'inoculation et l'élicitation de trois bioréacteurs en parallèle. L'inoculation des bioréacteurs a été effectuée selon la procédure standard (section 3.6.4). Les cultures ont été élicitées après une période de croissance de 3 jours, à la même concentration de biomasse (≈ 6.5 gDW/L) et à une concentration de phosphate extracellulaire nulle. Un ajout de 0.2 mM de phosphate a été fait la veille de l'élicitation. L'élicitation des bioréacteurs a été effectuée selon la procédure standard (section 3.6.5) avec une combinaison de milieu de production (section 3.2.2), 100 g/L de résine XAD-7 (section 3.4) et trois différents agents éliciteurs (MeJa, acide malique, aucun). Les bioréacteurs ont été opérés en mode cuvée alimentée avec des ajouts en ammonium citrate et en glucose régulés par des pompes (section 3.6.6). Des échantillons quotidiens ont été prélevés durant les 11 jours de la phase de production pour suivre la production.

Les cinétiques de production obtenues pour les trois cultures en bioréacteurs sont présentées sous forme de rendements spécifiques de TIA à la Figure 4.6. Les rendements représentent les TIA quantifiés dans les extraits de résines à chaque point d'échantillonnage pendant la phase de production. Il est à noter qu'une séparation de la biomasse et de la résine avait été effectuée pour chaque échantillon. Cependant, l'analyse des extraits au HPLC a démontré que la quantité de TIA présente dans la biomasse était négligeable comparativement à celle présente dans la résine (< 0.1 mg/gDW). L'analyse des résultats au HPLC a révélé la présence de quatre alcaloïdes : la tryptamine, l'ajmalicine, la catharanthine et la tabersonine. Cependant, la tryptamine n'a pu être quantifiée que dans les extraits de biomasse (données non présentées). L'analyse des résultats se concentre sur les rendements en TIA totaux car l'effet de l'élicitation sur leur production est l'intérêt principal de cette étude.

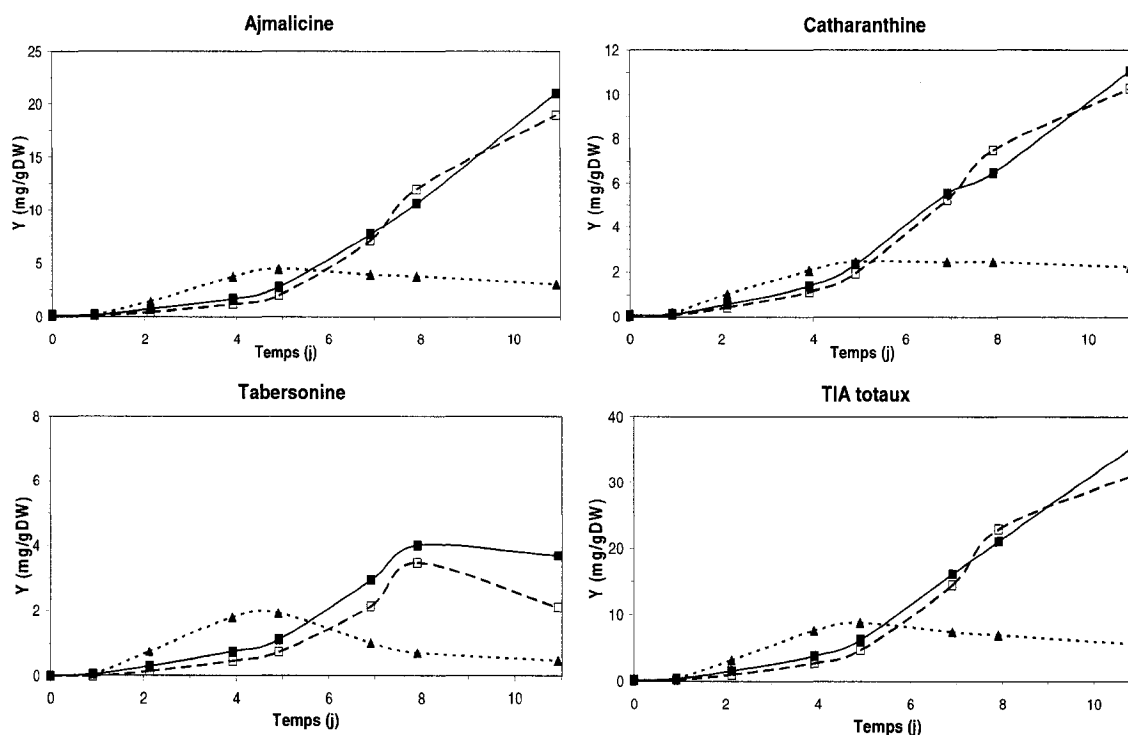


Figure 4.6 – Rendements spécifiques de TIA en fonction du temps et de l'éléciteur pour trois cultures en bioréacteurs. ▲ : MeJa (100 µM), □ : acide malique, ■ : aucun éléciteur. Les résultats de rendements en TIA totaux de la Figure 4.6 montrent deux profils de production distincts. Le premier profil est attribuable à une élécitation au MeJa et se caractérise par l'augmentation graduelle des rendements jusqu'au 5^e jour, suivi par un plafonnement. Les rendements maximaux obtenus au cinquième jour avec le MeJa ont été respectivement de 4.4 mg/gDW d'ajmalicine, 2.5 mg/gDW de catharanthine et 1.9 mg/gDW de tabersonine pour un total de 8.8 mgTIA/gDW.

Le deuxième type de profil de production visible à la Figure 4.6 est attribuable conjointement à une élécitation à l'acide malique et à la culture sans agent éléciteur (contrôle). Ce type de profil se caractérise par une augmentation lente des rendements jusqu'au 5^e jour, puis d'une ascension rapide et presque constante des rendements jusqu'à la fin de la période d'échantillonnage (11^e jour). Il semble donc que l'ajout d'acide malique n'a aucun effet sur l'efficacité d'élécitation par rapport au contrôle. Les cinétiques de production de chacun des TIA identifiés respectent ce type de profil sauf celle de la tabersonine qui plafonne entre le 8^e et 11^e jour de production. Les rendements

maximaux obtenus au 11^e jour avec aucun éliciteur ont été respectivement de 21.0 mg/gDW d'ajmalicine, 11.0 mg/gDW de catharanthine, 4.0 mg/gDW de tabersonine (8^e jour) et 35.7 mg TIA/g DW.

La distinction entre les deux profils de production se reflète aussi dans l'analyse des données d'échantillonnage des trois bioréacteurs. La Figure 4.7 présente les taux de consommation des nutriments suivis tout au long de la phase de production pour les trois bioréacteurs. L'ensemble des données d'échantillonnage recueillis pour ces cultures est présenté à l'annexe D. Il est à noter que les taux de consommation négatifs calculés au jour 1 d'échantillonnage pour certains nutriments (par exemple : glucose) sont la conséquence de l'augmentation de la concentration du nutriment due à l'ajout de milieu de production à l'élicitation suivant l'échantillon au jour 0. Malgré la ressemblance de la majorité des taux de consommation de nutriments, ceux de l'ion ammonium et du glucose sont particulièrement intéressants. D'une part, les taux de consommation de la culture élicitée au MeJa sont plus faibles par rapport aux deux autres cultures, en particulier en ammonium. D'autre part, la culture élicitée à l'acide malique et celle sans agent éliciteur (contrôle) montrent des profils de taux de consommation très similaires. Il semble donc que les niveaux de consommation d'ammonium et de glucose sont reliés aux niveaux de rendements en TIA totaux obtenus pendant la phase de production en bioréacteur. Cette constatation paraît logique du fait qu'une plus grande production d'alcaloïde nécessite l'incorporation de plus de molécules d'azotes et de carbones. Par ailleurs, l'arrêt de la production de TIA au 5^e jour pour la culture élicitée au MeJa coïncide avec le maximum et la diminution de la consommation d'ammonium. La diminution du taux de consommation ne semble pas généralisée aux autres nutriments, mis à part le chlore. L'arrêt de production n'est donc pas nécessairement un signe de mortalité cellulaire puisque les cellules continuent de consommer normalement la majorité des nutriments. Parallèlement, la culture élicitée avec l'acide malique et la culture sans agent éliciteur ont continué d'augmenter graduellement leur consommation d'ammonium jusqu'à la fin du 11^e jour. La consommation d'ammonium semble donc étroitement liée à la production de TIA dans les trois cultures en bioréacteurs étudiées.

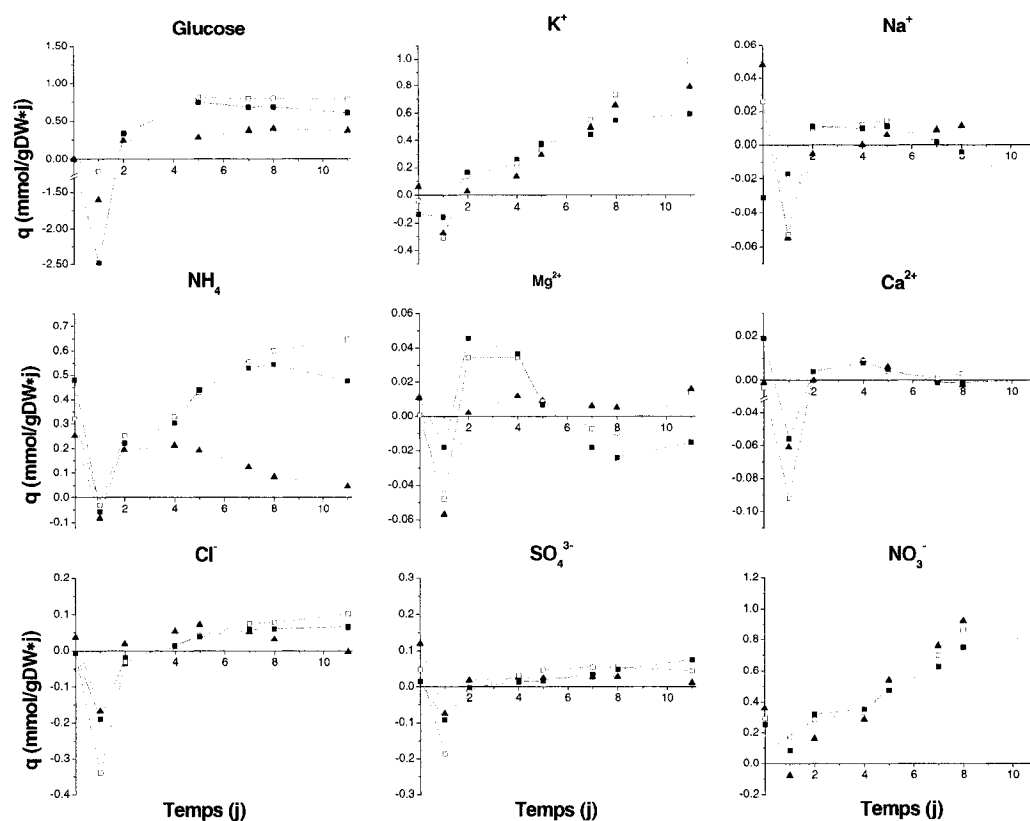


Figure 4.7 - Taux de consommation des principaux nutriments en fonction du temps et de l'éléciteur. ▲ : MeJa (100 µM), □ : acide malique, ■ : aucun éléciteur.

Il est aussi intéressant de comparer les résultats de rendements en bioréacteurs avec ceux obtenus lors de l'expérience de tamisage d'éléciteurs et de concentrations en flacons.

Dans un premier temps, les résultats en bioréacteurs ont confirmé que l'élécitation d'une culture avec 60 mg/L d'acide malique n'a aucun effet sur l'augmentation des rendements en TIA par rapport au contrôle. C'est donc dire que la culture élécitée avec l'acide malique peut être considérée comme un duplicata de la culture contrôle et les différences mineures dans leurs profils de rendements donnent une idée de la variabilité des résultats. Dans ce cas, l'erreur relative moyenne des écarts à la moyenne pour ces deux cultures est de 15%. Selon cette analyse, la diminution des rendements observés à partir du 5^e jour pour la culture élécitée au MeJa (Figure 4.6) serait non-significative

pour la l'ajmalicine et la catharanthine, mais pas pour la tabersonine (baisse $\approx 75\%$). La diminution des rendements observée après le 5^e jour pour la tabersonine est donc énigmatique car elle suppose la transformation de TIA adsorbés sur la résine XAD-7. Ce phénomène a aussi été observé dans des travaux réalisés parallèlement (Galipeau, 2004) et pourrait éventuellement faire l'objet d'une étude plus approfondie.

En deuxième lieu, les rendements obtenus en flacons et en bioréacteurs pour les trois éliciteurs étudiés doivent être comparés pour la même période de production. La Figure 4.8 présente une comparaison des rendements après 7 jours de production, soit le temps fixé lors de l'expérience de tamisage d'éliciteurs et de concentrations en flacons. Cette comparaison montre deux différences majeures. Premièrement, les rendements obtenus en flacons par l'élicitation au MeJa dépassent ceux du contrôle. Tandis qu'ils sont inférieurs en bioréacteur. Deuxièmement, les valeurs des rendements obtenus en bioréacteurs sont nettement plus élevées qu'en flacons. Les niveaux de rendements observés pour la culture élicitée au MeJa par rapport à ceux du contrôle en bioréacteurs sont très dépendants du temps de production. En effet, entre le 5^e et 7^e jour de production, les rendements en TIA de la culture élicitée au MeJa passent d'un niveau supérieur à inférieur à ceux du contrôle. Il est probable que cette tendance soit aussi présente en flacons, mais qu'il ait été impossible de la voir puisque le seul point de production disponible est celui de la récolte au 7^e jour. Étant donné qu'à ce moment le niveau des rendements en TIA de la culture élicitée au MeJa en flacon était supérieur au contrôle, la production de TIA en flacons semblent être plus lente. Donc, il est possible que les conditions d'opération présentes en bioréacteurs tels le contrôle de l'oxygène dissous, une meilleure agitation et une concentration plus élevée en biomasse aient accéléré la production de TIA.

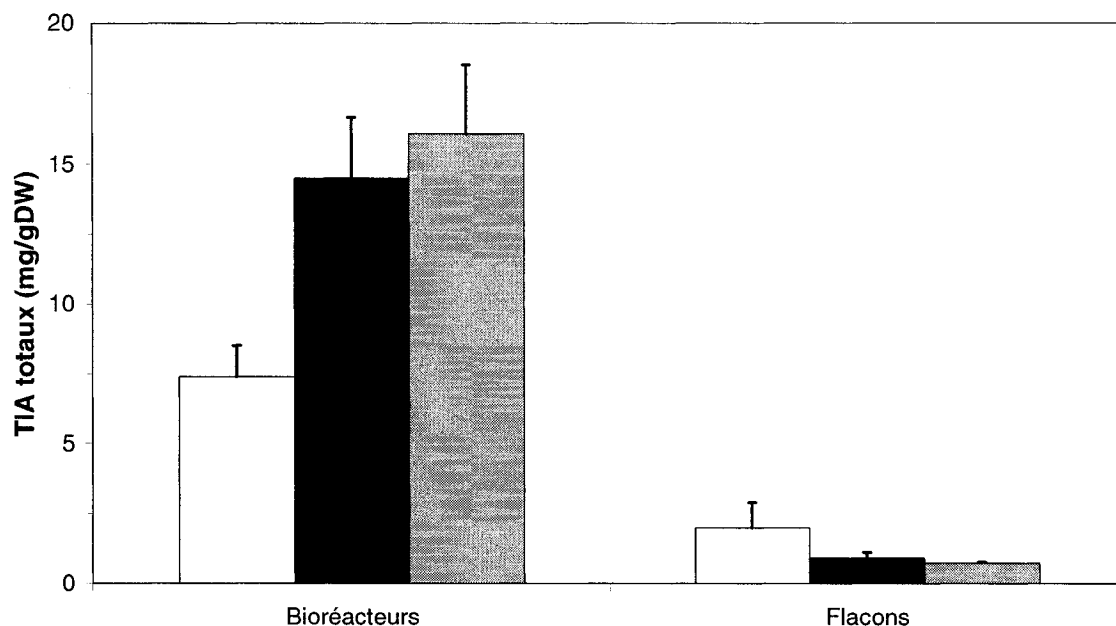


Figure 4.8 – Rendements spécifiques en fonction de l'éliciteur et du mode de production : cuvée alimentée en bioréacteur 3.5L ou cuvée en flacons 250 mL. □ : MeJa (100 µM), ■ : acide malique (60 mg/L), ▒ : aucun éliciteur (contrôle). Les barres d'erreurs représentent le résultat maximum pour les cultures en duplicata en flacons et une moyenne de l'erreur relative entre les cultures élicitées à l'acide malique et le contrôle (Figure 4.6).

Par ailleurs, il est trompeur de comparer directement les rendements obtenus en bioréacteurs avec ceux obtenus de l'expérience de tamisage d'éliciteurs et de concentrations en flacons. En effet, à la lueur des résultats de production obtenus avec la lignée LCR02 dans cette étude (section 4.5), il semble y avoir une grande variabilité dans les niveaux de rendements en TIA d'une expérience à l'autre. Une comparaison rigoureuse des rendements de production de TIA ne peut être effectuée qu'entre des cultures élicitées au même moment et à partir d'une même cuvée de suspension cellulaire de LCR02. Ce qui n'était pas le cas pour ces deux expériences de sélection d'éliciteur.

En bref, le rendement de 35.7 mgTIA/gDW (243 mgTIA/L) constitue le meilleur rendement atteint par le groupe de recherche par une quantification spécifique de TIA. L'élicitation de cultures en bioréacteurs avec deux éliciteurs et un contrôle a permis d'obtenir beaucoup d'informations sur la relation entre l'élicitation d'une suspension

cellulaire de *C. roseus* et les rendements de TIA. Un facteur important a été la consommation de nutriments et donc par conséquent l'évolution de l'état de la suspension cellulaire.

4.4 État de la suspension cellulaire à l'élicitation

Un aspect important dans l'étude de l'élicitation d'une suspension cellulaire est la compréhension des conditions initiales favorisant l'induction du métabolisme secondaire des cellules. Une meilleure connaissance de l'état de la suspension cellulaire au moment de l'élicitation est peut-être une des clefs menant à l'augmentation des rendements et à la diminution de la variabilité dans les rendements en TIA d'une culture à l'autre avec les cellules de *C. roseus*.

4.4.1 Effet du temps après la sous-culture

Dans un premier temps, une expérience a été réalisée pour évaluer l'effet du temps après la sous-culture de cellules de *C. roseus* sur la réponse à l'élicitation des cellules et leur capacité à produire des TIA. En bref, l'expérience consistait à prélever des cellules à différents temps à partir d'une série de flacons-mères de 1 L, tous sous-cultivés au même moment, et d'éliciter ces cellules avec du MeJa dans des flacons de 250 mL afin d'en analyser la production en TIA.

Outre l'observation de liens entre l'évolution générale de l'état de la suspension cellulaire et la production de TIA par les cellules, l'expérience tentait de vérifier une hypothèse spécifique quant à l'effet de la concentration de phosphate sur la production de métabolites secondaires. En effet, des travaux antérieurs ont montré que la production de métabolites secondaires est meilleure au moment où la concentration de phosphate extracellulaire devient nulle (Archambault et coll., 1996).

Les cellules utilisées pour l'expérience provenaient de 3 flacons (A, B, C) de 1L contenant des cellules de *C. roseus* (LCR02) sous-cultivées au même moment et environ aux mêmes conditions de concentration de biomasse et de nutriments extracellulaires. Le flacon A a été utilisé pour inoculer les flacons de production I, II et III (en duplicata). Le

flacon B a été utilisé pour inoculer les flacons de production IV et IV' (en duplicata). Le flacon C a été utilisé pour inoculer les flacons de production V et V' (en duplicata). Les flacons de production IV' et V' ont été inoculés à partir des flacons B et C respectivement auxquels 0.2 mM de phosphate (solution KH_2PO_4) a été ajouté après le prélèvement de la biomasse nécessaire aux flacons de production IV et V. Cette opération avait comme objectif d'évaluer l'impact d'un ajout supplémentaire de phosphate sur la production de TIA de cellules ayant sensiblement les mêmes caractéristiques que les flacons IV et V.

Les rendements en TIA ont été obtenus par le prélèvement de cellules des flacons A, B, C et leur inoculation et élicitation subséquente dans des flacons de 250 mL. L'inoculation des flacons a été réalisée par la méthode de filtration stérile (section 3.5.1). L'élicitation des cultures en flacons a été effectuée avec une combinaison de milieu de production (section 3.2.2), 100 g/L de résine XAD-7 (section 3.4) et 100 μM de MeJa (section 3.3). Les flacons en phase de production ont été maintenus sur un agitateur orbital à 100 rpm pendant 7 jours.

L'analyse des résultats au HPLC a révélé la présence de quatre alcaloïdes : la tryptamine, l'ajmalicine, la catharanthine et la tabersonine. Les résultats de rendements en TIA totaux obtenus à chaque temps d'inoculation et d'élicitation de cellules provenant de flacons sous-cultivés au jour 0 sont présentés à la Figure 4.9. La série A de points de production sans ajout de phosphate (I, II, III, IV, V) sont indiqués par les carrés noirs (■) tandis que ceux de la série B avec ajout de phosphate (IV', V') sont indiqués par les carrés blancs (□). La Figure 4.9 comprend également les données de concentration de phosphate extracellulaire (▲) et de concentration de biomasse (gDW/L) dans les flacons au moment de l'élicitation. La proportion moyenne des TIA spécifiques obtenue aux différents temps d'inoculation dans l'expérience est présentée à la Figure 4.10. De plus, l'ensemble des données disponibles sur l'état de la suspension cellulaire en croissance dans les flacons-mères est présenté à la Figure 4.11.

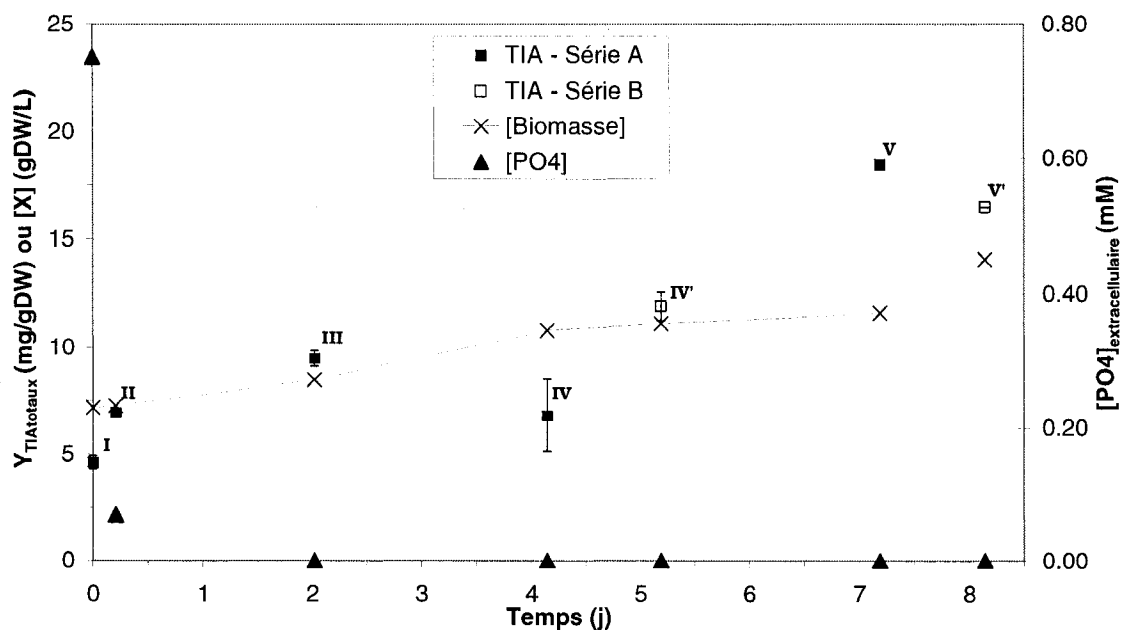


Figure 4.9- Rendements en fonction du temps après la sous-culture des flacons-mères et comparaison avec des indicateurs de l'état de la suspension cellulaire au moment de l'élicitation. Les barres d'erreurs correspondent au maximum et au minimum des rendements obtenus en duplicata.

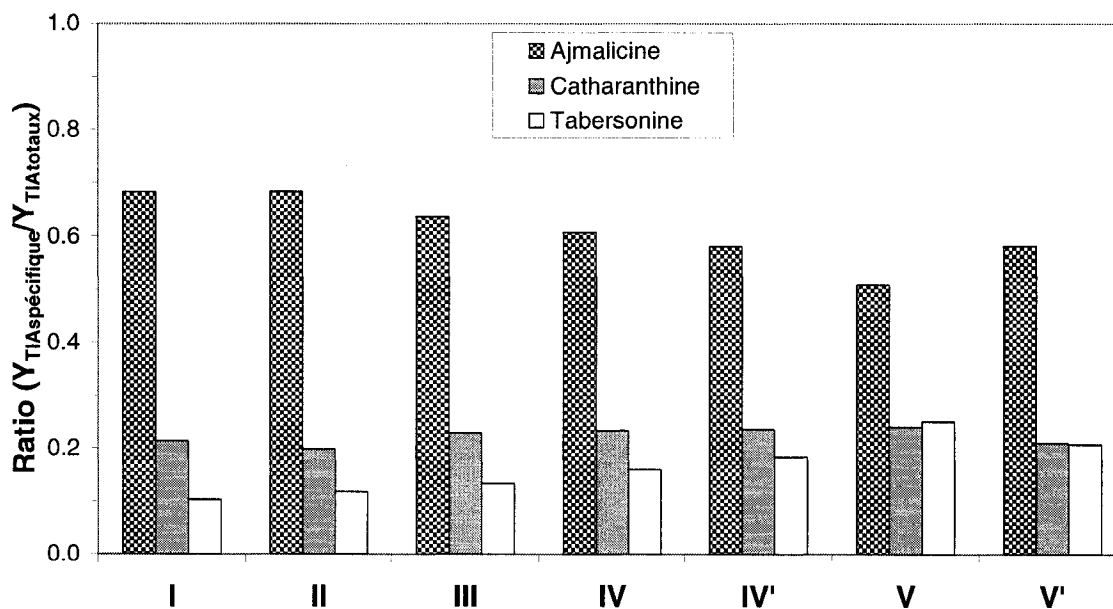


Figure 4.10 – Proportion des différents TIA spécifiques pour chaque point de production

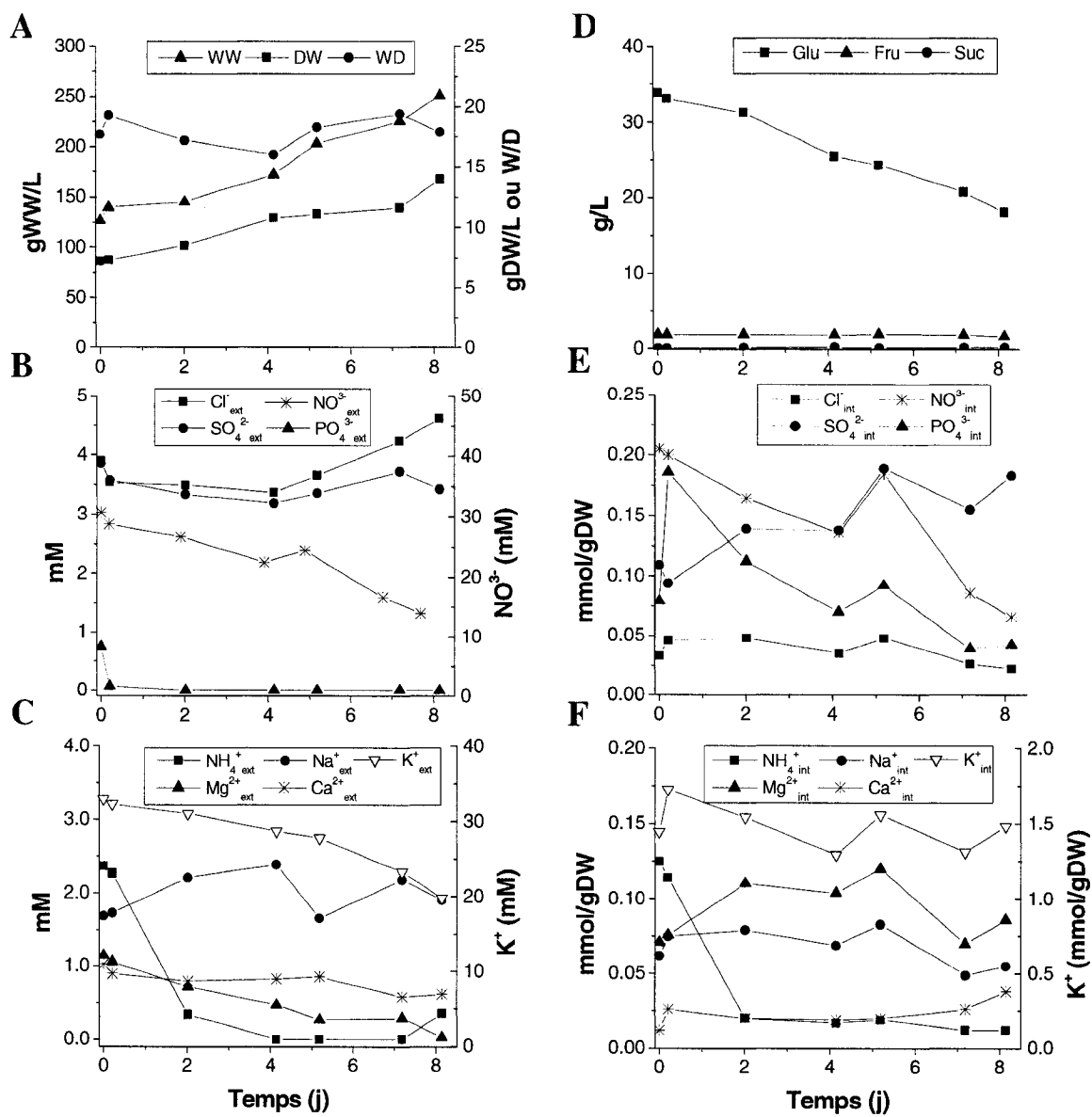


Figure 4.11 – Suivi de l'état de la suspension cellulaire en fonction du temps.

Dans un premier temps, l'observation des rendements en TIA totaux en fonction du temps d'inoculation après la sous-culture des flacons 1L expose une augmentation de ceux-ci, soit de 4.6 mg/gDW (jour 0) à 18.5 mg/gDW (jour 7). Cette augmentation semble plus rapide lors des deux premiers jours (2.4 mg/gDW.j entre I & III) comparativement aux derniers jours (1.7 mgTIA/gDW.jour entre III et V). Le résultat de rendement du 4^e jour (IV) ne semble pas suivre la tendance ascensionnelle des autres points. L'explication la plus vraisemblable est que l'état de la suspension cellulaire de son flacon-mère (B) était différent des deux autres (A et C). Cette hypothèse est cependant difficile à confirmer en observant les niveaux spécifiques de chaque nutriment à la Figure 4.11. Par ailleurs, il est possible qu'une mauvaise manipulation des cellules lors de l'inoculation par filtration stérile ait endommagé des cellules et affecté leurs rendements (barres d'erreurs anormalement grandes).

Les rendements de la Figure 4.9 sont mis en comparaison à deux indicateurs importants de l'état de la suspension cellulaire au moment de l'élicitation, soit la concentration de biomasse et la concentration de phosphate extracellulaire. Le profil des concentrations de biomasse sèche donne un indicatif de la croissance des cellules pendant le cycle de sous-culture. Quant à la concentration de phosphate extracellulaire, l'hypothèse à vérifier est qu'elle a un effet important sur la production de métabolites secondaires par des cellules végétales.

La comparaison des rendements au profil des concentrations de biomasse dans l'intervalle de temps étudié semble montrer que l'augmentation globale des rendements coïncide avec l'augmentation de la concentration de biomasse. L'intervalle de temps d'environ 8 jours représente un cycle approximatif de sous-culture normal, soit un doublement de la concentration de la biomasse. L'évolution de l'état de la suspension cellulaire (Figure 4.11), à partir du moment de la sous-culture jusqu'au 7^e jour, a donc favorisé l'augmentation des rendements en TIA suite à une élicitation au MeJa et une période de production de 7 jours. Selon les résultats de la Figure 4.9, pour des conditions de croissance semblable (milieu de croissance, flacons 1L, concentration de biomasse ≈ 7 gDW/L), il serait donc préférable d'éliciter les cellules suite à une période de croissance

leur permettant de doubler leur biomasse sèche pour obtenir les meilleurs rendements possibles. Le meilleur temps pour l'élicitation de la suspension cellulaire de *C. roseus* correspond donc à la phase de croissance exponentielle des cellules et ce résultat est en accord avec les travaux de plusieurs autres chercheurs dans le domaine (Kombrink et Hahlbrock, 1985; Eilert et coll., 1985; Eilert, 1987; Williams et coll., 1992).

Autre fait intéressant, d'après les résultats de la Figure 4.10, la proportion de tabersonine produite augmente graduellement pendant l'évolution de l'état de la suspension cellulaire tout au long de la phase de croissance. En effet, la proportion de tabersonine passe de 10% à 25% entre le 1^{er} (I) et le 7^e (V) jour, tandis que la proportion d'ajmalicine décroît parallèlement de 68% à 51%. Ce phénomène semble donc indiquer que l'état de la suspension cellulaire à l'élicitation affecte la quantité relative des TIA produits. Dans ce cas-ci, la tabersonine qui est une molécule située plus bas dans le chemin métabolique de TIA des cellules de *C. roseus* (Figure 2.3) a bénéficié des changements dans l'état de la suspension cellulaire. Une meilleure connaissance des paramètres de l'état de la suspension cellulaire à l'origine de ces différences pourra peut-être permettre de diriger la production de TIA par des cellules de *C. roseus* vers les composés de plus grand intérêt comme la catharanthine, la vindoline et la vinblastine.

Par ailleurs, parmi les différents paramètres de l'état de la suspension cellulaire suivis au cours de l'expérience, l'effet de la concentration de phosphate sur les rendements en TIA soulevait un intérêt important. Tout d'abord, il est à noter que la concentration de phosphate extracellulaire (Figure 4.11B) passe d'environ 0.8 à 0 mM dans les premiers 48 heures après la sous-culture des flacons-mères de 1 L. Par la suite, elle demeure nulle. Parallèlement, la concentration de phosphate intracellulaire (Figure 4.11E) augmente rapidement dans les cinq premières heures, soit de 0.079 à 0.186 mmol/gDW (entre I et II), pour diminuer graduellement jusqu'à une valeur inférieure à la concentration initiale au 8^e jour. La différence entre la diminution de phosphate extracellulaire (≈ 0.8 mM) et l'augmentation de phosphate intracellulaire ($0.107 \text{ mmol/gDW} \times 7.3 \text{ gDW/L} = 0.78 \text{ mM}$) durant les 5 premières heures est à peu près équivalente (la précision des mesures expliquant l'écart). Il semble donc que la cellule absorbe rapidement tout le phosphate

présent dans le milieu extracellulaire et l'utilise par la suite au fur et à mesure de sa croissance comme l'avait démontré Sirois (1997).

Quant aux rendements en TIA totaux des flacons élicités pendant les 48 premières heures, ils ont augmenté au taux de 2.4 mgTIA/gDW·jour, passant de 4.6 à 9.4 mg/gDW. Ce taux correspond au taux de production le plus élevé observé au cours de l'expérience. Donc, durant les premières heures après la sous-culture de cellules de *C. roseus*, il semble que l'absorption rapide du phosphate extracellulaire par les cellules coïncident avec une augmentation rapide du potentiel de production de TIA. Au cours de cette période de 48 heures, la concentration extracellulaire d'ammonium chute aussi très rapidement, soit de 2.4 à 0.4 mM. L'augmentation des rendements est peut-être aussi associée à l'absorption d'autres nutriments. En fait, il est possible que suite au choc osmotique de l'ajout de milieu frais au moment de la sous-culture, l'état de la suspension cellulaire évolue rapidement dans les premières heures et devient de plus en plus propice à l'élicitation et une phase subséquente de production.

Cette relation entre l'augmentation de la production de métabolites secondaires et la déplétion de phosphate extracellulaire a déjà été observée pour la production de sanguinarine par une suspension cellulaire de *P. somniferum* élicitée avec de la chitine (Williams et coll., 1996). D'après les résultats de rendements obtenus dans cette première expérience sur l'état de la suspension cellulaire, il semble que les rendements après élicitation soient toujours plus grands après la déplétion du phosphate extracellulaire. Cependant, à partir du moment où il n'y a plus de phosphate extracellulaire, l'augmentation des rendements ne peut être attribuée à la variation de ce paramètre et l'explication précédente sur l'évolution de l'état de la suspension cellulaire doit être prise en compte.

Il est à noter que la concentration de phosphate intracellulaire diminue graduellement après le jour 2 et que le rendement maximum en TIA totaux obtenu au cours de l'intervalle étudié (18.5 mg/gDW au 7^e jour) correspond au minimum de concentration de phosphate intracellulaire (0.039 mmol/gDW au 7^e jour). D'autre part, dans

l'expérience à l'étude, la concentration d'ammonium extracellulaire chute à 0 mM à partir du jour 4 et peut-être que l'effet combiné de la déplétion de phosphate et d'ammonium extracellulaire favorise la production de TIA à l'élicitation des cellules. Cet aspect serait à évaluer plus attentivement dans des expériences subséquentes.

D'autre part, l'analyse des points de rendements IV' et V' pour lesquels 0.2 mM de phosphate a été ajouté dans le milieu extracellulaire comparativement aux cellules des points IV et V semble montrer que cet ajout de phosphate supplémentaire n'a pas influencé les rendements. En fait, cette observation doit tenir compte que le point IV est probablement affecté par des erreurs expérimentales et pourrait se situer plus haut. De plus, le point V' étant inoculé un jour plus tard que le point V l'évolution d'autres paramètres de la suspension cellulaire autre que le phosphate pourrait avoir affecté négativement les rendements. En bref, en supposant que l'effet d'ajout de 0.2 mM de phosphate est négligeable malgré sa proportion élevée par rapport à la quantité déjà présente (IV' : $\approx 33\% \text{ PO}_{4\text{ajouté}}/\text{PO}_{4\text{total}}$ et V' : $\approx 50\% \text{ PO}_{4\text{ajouté}}/\text{PO}_{4\text{total}}$), les points IV' et V' confirment simplement la tendance ascensionnelle des rendements en fonction de l'évolution de l'état de la suspension cellulaire et de l'augmentation de la biomasse dans la fenêtre de temps observée.

Enfin, il aurait été intéressant d'obtenir plus de résultats de rendements dans la fenêtre de 0.75 à 0 mM de phosphate pour observer si un maximum encore plus élevé est présent dans cette zone. Cela aurait permis de valider une hypothèse voulant que le potentiel de production de métabolites secondaires soit intimement lié à la concentration de phosphate extracellulaire quand le reste des concentrations de nutriments sont à l'intérieur d'intervalles acceptables.

4.4.2 Effet du temps après l'inoculation en bioréacteur

Dans un second temps, une expérience a été réalisée pour évaluer l'effet du temps après l'inoculation en bioréacteur de cellules de *C. roseus* sur l'état de la suspension cellulaire et leur capacité à produire des TIA suite à une élicitation. En bref, l'expérience consistait à inoculer un bioréacteur, suivre la croissance des cellules et prélever des cellules à différents temps pour les éliciter en flacons de 250 mL. Les résultats de production de TIA obtenus dans les flacons ont ensuite été comparés à l'état de la suspension cellulaire au moment de l'élicitation.

La différence principale de cette deuxième expérience sur l'étude de l'état de la suspension cellulaire à l'élicitation par rapport à la première (section 4.4.1) est de prélever les cellules en croissance à partir d'une seule grosse cuvée (bioréacteur 7 L) plutôt que différentes petites cuvées (3 flacons de 1 L). L'utilisation du bioréacteur comme unique cuvée et source de toutes les cellules permettait de mieux suivre l'état de la suspension cellulaire pendant leur phase de croissance grâce à l'homogénéité et la plus grande quantité de volume de suspension cellulaire disponible. Cependant, le principal avantage recherché par l'utilisation du bioréacteur était la possibilité de maintenir la croissance des cellules sur plus d'une semaine en contrôlant le niveau des nutriments (incluant l'oxygène dissous); cette alternative est pratiquement impossible dans un flacon de 1 L. Cette caractéristique dans l'opération d'un bioréacteur permettait de répéter une expérience sur l'ajout de phosphate dans le milieu extracellulaire et d'étudier l'effet de sa concentration sur la production de TIA à différents stades pendant la phase de croissance.

Donc, suite aux conclusions de la première expérience (section 4.4.1), cette deuxième expérience visait trois objectifs particuliers. Premièrement, confirmer l'augmentation des rendements avec l'évolution de l'état de la suspension cellulaire pendant un cycle de croissance qui fait doubler la biomasse. De plus, des rendements maximaux devraient être observés pendant la phase exponentielle de croissance. Deuxièmement, étudier avec plus de précision la zone de transition entre la présence et l'absence de phosphate extracellulaire dans les heures suivant l'inoculation du bioréacteur et d'y confirmer

l'augmentation graduelle des rendements avec la diminution de la concentration de phosphate extracellulaire. Troisièmement, répéter l'ajout de phosphate après une période de croissance de quelques jours et observer à nouveau l'effet de la diminution de sa concentration sur les rendements de TIA.

La phase de croissance des cellules a été réalisée dans un bioréacteur 7 L inoculé selon la procédure standard (section 3.6.4). La concentration de biomasse initiale visée dans le bioréacteur était d'environ 9 gDW/L. Le bioréacteur a été opéré en mode cuvée alimentée avec une pompe pour les ajouts d'ammonium citrate afin de maintenir les concentrations aux niveaux standard de culture (section 3.6.6). La phase de croissance utile de la suspension cellulaire pour l'expérience d'élicitation a été de 7 jours. Après cette période, plusieurs irrégularités dans l'évolution de la culture en bioréacteur a mené à son arrêt.

Les rendements en TIA ont été obtenus par la prise d'échantillons stériles de cellules dans le bioréacteur et leur inoculation et élicitation subséquente dans des flacons de 250 mL. L'inoculation des flacons a été réalisée par la méthode de filtration stérile (section 3.5.1). L'élicitation des cultures en flacons a été effectuée avec une combinaison de milieu de production (section 3.2.2), 100 g/L de résine XAD-7 (section 3.4) et 100 μ M de MeJa (section 3.3). Les flacons en phase de production ont été maintenus sur un agitateur orbital à 100 rpm pendant 7 jours.

L'analyse des résultats au HPLC a révélé la présence de quatre alcaloïdes : la tryptamine, l'ajmalicine, la catharanthine et la tabersonine. Les résultats de rendements en TIA totaux obtenus à chaque temps d'élicitation des cellules en flacons sont présentés à la Figure 4.12. Un graphique montrant la proportion des différents TIA à chaque point de production est présentée à la Figure 4.13. D'autre part, l'ensemble des données disponibles sur l'état de la suspension cellulaire en croissance dans le bioréacteur 7 L est présenté à la Figure 4.14.

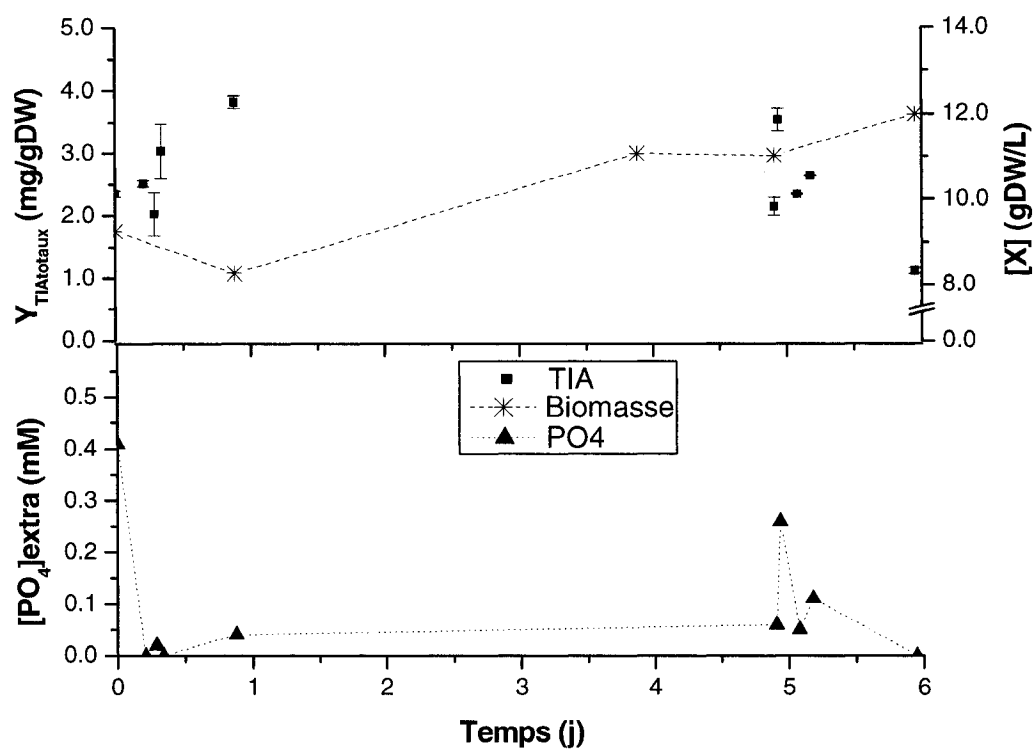


Figure 4.12 – Rendements en fonction du temps après l'inoculation du bioréacteur. Comparaison des rendements avec deux indicateurs de l'état de la suspension cellulaire à l'élicitation : concentration de la biomasse et concentration de phosphate extracellulaire. Les barres d'erreurs représentent les rendements minimum et maximum pour les cultures en duplicata.

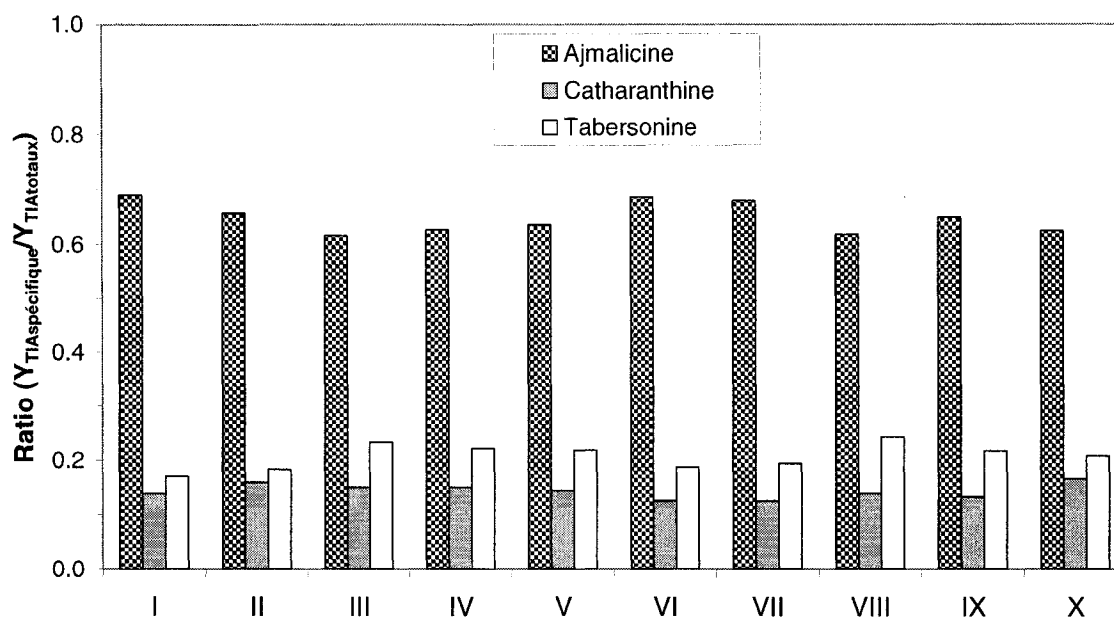


Figure 4.13 – Proportion des différents TIA spécifiques à chaque point de production.

Dans un premier temps, l'observation des rendements en TIA totaux en fonction du temps d'élicitation (Figure 4.12) des cellules prélevées à partir de la culture en croissance dans le bioréacteur révèle plusieurs phénomènes intéressants. Premièrement, les cellules élicitées pendant les premiers 24 heures suite à l'inoculation du bioréacteur ont montré une hausse de rendements en TIA totaux. En effet, les rendements ont passé de 2.4 mg/gDW (I) à 3.9 mg/gDW (V) à un taux de 1.7 mgTIA/gDW·jour pendant cette période. Le rendement de 3.9 mg/gDW obtenu 21 heures après l'inoculation du bioréacteur correspond au rendement maximal dans cette expérience. Cependant, il est important de souligner que ce rendement maximum en TIA totaux est inférieur au rendement minimum (4.6 mg/gDW) obtenu dans l'expérience précédente (section 4.4.1), malgré des conditions de production identiques. Cette observation laisse croire que l'état de la suspension cellulaire dans cette expérience n'était pas idéal. De plus, la proportion des TIA spécifiques obtenue dans cette expérience (Figure 4.13) ne ressemble pas à celle de l'expérience précédente (Figure 4.10), ce qui tend aussi à démontrer une différence importante dans l'état de la suspension cellulaire entre ces deux expériences.

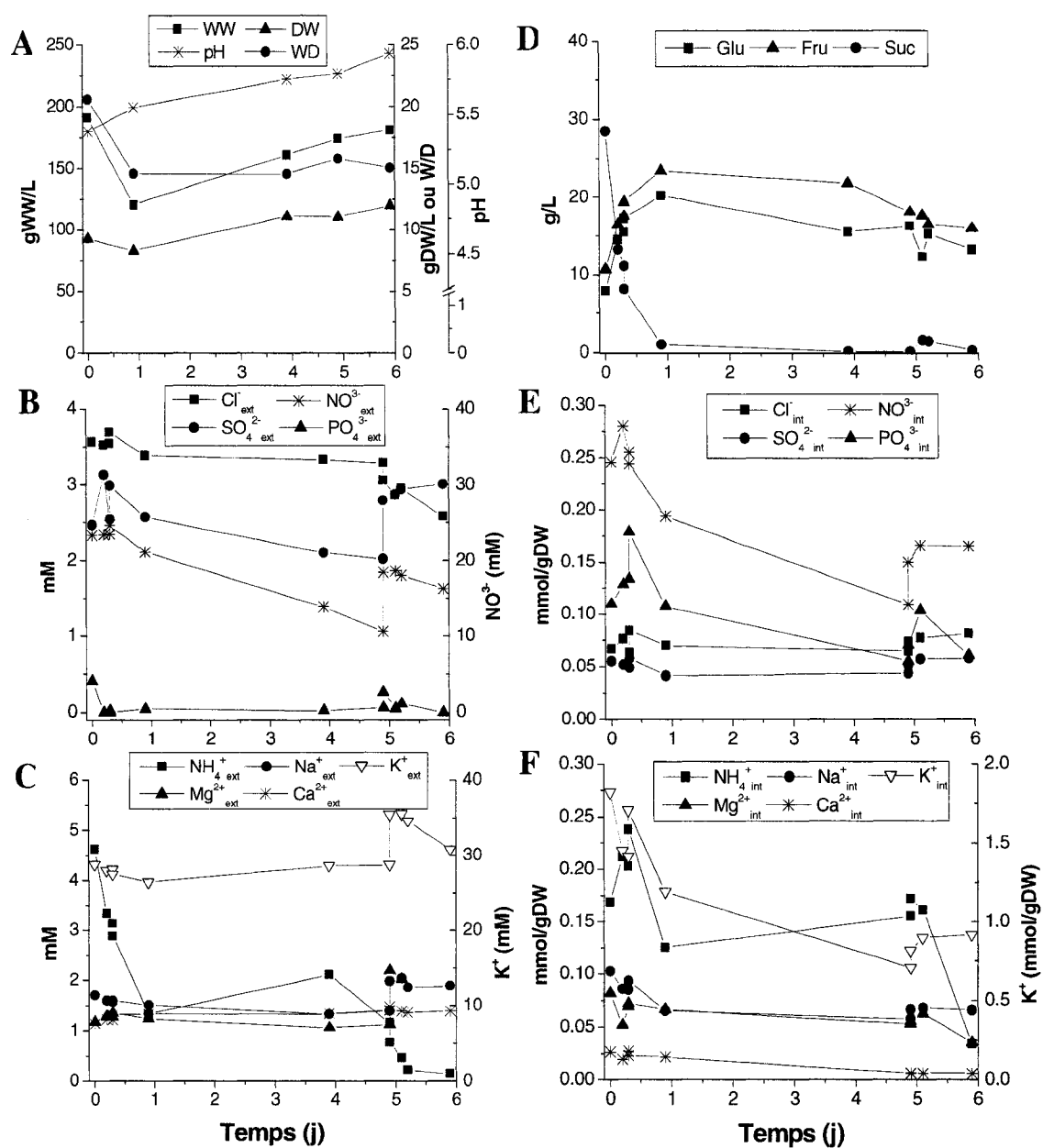


Figure 4.14 – Suivi de l'état de la suspension cellulaire en fonction du temps.

Par ailleurs, l'augmentation des rendements pendant cette période initiale des cellules en bioréacteur coïncide avec l'absorption rapide du phosphate extracellulaire par les cellules. En effet, la concentration de phosphate extracellulaire est passée de 0.41 à 0 mM au cours des 8 premières heures de culture en bioréacteur. Parallèlement, la concentration de phosphate intracellulaire (Figure 4.14E) a augmenté rapidement dans les 8 premières heures (entre I et IV). La différence entre la diminution de phosphate extracellulaire (0.41 mM) et l'augmentation de phosphate intracellulaire ($0.07 \text{ mmol/gDW} \times 9.3 \text{ gDW/L} = 0.65 \text{ mM}$) durant les 8 premières heures est à peu près équivalente (la précision des mesures expliquant l'écart). En somme, comme à l'expérience 4.4.1, il semble que l'absorption rapide du phosphate extracellulaire par les cellules coïncident avec une augmentation rapide du potentiel de production de TIA durant les premières heures de culture. Malheureusement, le nombre d'échantillon pris au début de la culture en bioréacteur n'a pas été suffisant pour observer de façon précise la transition de concentration de phosphate à une valeur nulle comme il était souhaité pour cette expérience.

Deuxièmement, après 5 jours de croissance cellulaire en bioréacteur, 0.5 mM de NaH_2PO_4 a été ajouté à la suspension cellulaire afin d'observer une deuxième fois l'impact de l'ajout de phosphate sur l'état de la suspension et les rendements subséquents de TIA. Une hausse prononcée des rendements en TIA totaux a été observée dans l'intervalle de 1 heure suivant l'ajout de phosphate (entre les points VI et VII). Ainsi, les rendements ont passé de 2.1 mg/gDW à 3.5 mg/gDW. Cette accroissement dans les rendements a coïncidé avec une hausse simultanée de la concentration de phosphate extracellulaire (0.06 à 0.26 mM) et intracellulaire (0.07 à 0.10 mmol/gDW) due à l'absorption d'une partie de l'ajout de 0.5 mM de phosphate par les cellules ($0.5 \text{ mM PO}_{4\text{ajouté}} \approx 0.2 \text{ mM PO}_{4\text{extra}} + 0.36 \text{ mM PO}_{4\text{intra}}$). Le changement de l'état de la suspension cellulaire suite à cet ajout semble donc avoir amélioré instantanément la capacité des cellules à produire des TIA. À première vue, ce phénomène est possiblement dû à une limitation des cellules en phosphate avant l'ajout causant ainsi une limitation dans la production de TIA. Cependant, les résultats de

l'expérience précédente (section 4.4.1) ont montré qu'à une concentration de phosphate intracellulaire inférieure (0.04 mmol/gDW – Figure 4.11E) un rendement maximum en culture a déjà été atteint. L'explication est donc plus complexe. En fait, d'autres nutriments ont été ajoutés en même temps que le phosphate au 5^e jour de culture, soit 1 mM de MgSO_4 et 8 mM KNO_3 , pour rétablir certaines concentrations selon les normes en vigueur au laboratoire pour une culture en cuvée alimentée. L'amélioration de l'état de la suspension cellulaire correspondant à l'augmentation des rendements en TIA est possiblement due à l'ajustement des concentrations de plusieurs de ces nutriments (Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}). La méthode de culture en mode cuvée alimentée a donc nui à l'analyse des effets de l'ajout de phosphate sur la production de TIA.

Troisièmement, les cellules élicitées pendant les derniers 24 heures de la culture en bioréacteur ont montré une baisse de rendements en TIA totaux. En effet, les rendements ont chuté de 3.5 mg/gDW (VII) à 1.1 mgTIA/gDW (X) à un taux de 2.4 mgTIA/gDW·jour pendant cette période. Cette baisse fait suite à la hausse momentanée des rendements suite à l'ajout de 0.5 mM de phosphate au 5^e jour. Contrairement à ce qui a été observé dans les premiers 24 heures de culture en relation à la concentration de phosphate extracellulaire, le meilleur rendement en TIA totaux a été obtenu à la plus haute concentration de phosphate extracellulaire (3.5 mg/gDW à 0.26 mM PO_4^{3-}) et le plus faible rendement après l'absorption complète du phosphate extracellulaire (1.1 mg/gDW à 0 mM PO_4^{3-}). Cependant, l'analyse des points de rendement dans cette région est hasardeuse car l'état de la culture se détériorait tranquillement. En effet, la couleur de la culture a passé du jaune au brun pendant cette période ce qui a déjà concordé à une mauvaise croissance cellulaire dans des expériences antérieures. De plus, une quantité excessive de cellules étaient poussées en dehors du milieu de culture par l'agitation et s'accumulaient sous la forme d'un cerne épais au niveau des chicanes dans la partie supérieure du bioréacteur. Ces raisons ont d'ailleurs mené à l'arrêt de la culture après le 6^e jour puisqu'il devenait évident qu'il serait impossible de maintenir des conditions de culture normales nécessaire à des fins de comparaison. D'autres expériences devront être effectuées pour valider clairement l'effet de la concentration de

phosphate (extracellulaire et intracellulaire) à différents stades d'une culture en bioréacteur (inoculation, phase exponentielle et plateau) pour véritablement conclure de son influence sur les rendements en TIA des cellules de *C. roseus*.

Quatrièmement, il est à noter que malgré l'augmentation de la concentration de biomasse observée dans la culture en bioréacteur (9.3 à 12 gDW/L en 6 jours) les meilleurs rendements ont été obtenus au début de la période de croissance. Cette observation est différente de celle effectuée à l'expérience précédente (section 4.4.1) où des meilleurs rendements avaient été obtenus progressivement tout au long de la croissance cellulaire. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine des différences reliées à la phase de croissance entre ces deux expériences. D'une part, une croissance plus rapide a été obtenue pour les cellules cultivées en flacons de 1 L en mode cuvée par rapport à celles cultivées dans le bioréacteur de 7 L en mode cuvée alimentée, malgré une meilleure agitation, un contrôle de la concentration d'oxygène dissous (120%) et l'ajustement des concentrations de nutriment à des niveaux standards et non limitants dans le deuxième cas. Il est très difficile d'expliquer comment des conditions de culture a priori favorables puissent désavantager la croissance. Cependant, c'est peut-être une différence dans l'état de la suspension cellulaire à l'inoculation qui est à l'origine de l'écart entre les deux cultures. Une comparaison des paramètres de l'état de la suspension cellulaire à l'inoculation est présentée à l'annexe E. Parmi les nombreuses différences, il est important de noter le type de glucide utilisé (glucose en flacon vs sucrose en bioréacteur) et le ratio W/D (17 en flacon vs 21 en bioréacteur). Une explication possible pour la faible croissance des cellules dans le bioréacteur 7 L est possiblement la prise d'échantillon massive pendant les 6 jours de culture faisant passer le volume de la culture de 5.7 à 3.3 L. La meilleure façon de vérifier les nombreuses hypothèses émises ci-dessus serait de recommencer l'expérience en s'assurant d'inoculer 2 ou 3 bioréacteurs de façon identique pour s'assurer d'avoir des répétitions et ainsi observer si le phénomène est vraiment significatif ou juste le fruit du hasard. Cette mesure n'a pu être prise dans les délais accordés aux travaux expérimentaux de ce mémoire.

En somme, cette deuxième expérience sur l'étude de l'état de la suspension cellulaire à l'élicitation n'a pas véritablement atteint les objectifs fixés.

4.5 Étude comparative des rendements

Enfin, il est intéressant de comparer l'apport des différentes expériences présentées dans ce mémoire dans l'étude de la phase d'élicitation. Le Tableau 4.2 donne un aperçu de la contribution de chaque section (expérience) dans l'optique de l'amélioration des rendements de TIA totaux (mg/gDW) d'une suspension cellulaire de *C. roseus*.

Tableau 4.2 – Sommaire des minima et maxima de rendements en TIA et principales conclusions pour chaque section (expérience) de cette étude.

Section	Y_{TIAmin} (mg/gDW)	Y_{TIAmax} (mg/gDW)	Δ_{max}	$\frac{Y_{max}}{Y_{min}}$	Conclusion
4.1	0	4.5	4.5	∞	Sélection de la lignée plus productive : LCR02
4.2.1	1.4	2.1	0.7	1.5	Flacon plus avantageux pour production : 250 mL
4.2.2.1	0.6	11.0	10.4	18.3	Meilleure [biomasse] testée avec MeJa: $\approx$ 3.0gDW/L
4.2.2.2	11.0	20.0	9.0	1.8	Meilleure méthode d'inoculation à [biomasse] équivalente : transfert X&MC
4.3.1	0.2	2.0	1.8	10	Meilleur éliciteur et concentration : MeJa entre 50-100 μM
4.3.2	4.7* 5.7**	8.8* 35.7**	4.1 30.0	1.9 6.3	Meilleur éliciteur : MeJa* (100μM) ou aucun*** (XAD7 100 g/L)
4.4.1	4.6	18.5	13.9	4	Élicitation plus efficace : phase exponentielle + [PO₄]=0
4.4.2	1.1	3.8	2.7	3.5	Élicitation plus efficace : [PO₄]=0

* Après 5 jours de production

** Après 11 jours de production

*** À partir du 7^e jour jusqu'au 11 jour de production

À la lueur de ce tableau récapitulatif, les trois éléments clefs peuvent être mis en évidence dans cette étude sont: la sélection d'une lignée, la durée de la phase de production en bioréacteur sans éliciteur et l'importance de l'état de la suspension cellulaire.

D'abord, la sélection de la lignée cellulaire productive LCR02 (section 4.1; $Y_{\max} = 4.5$ mg/gDW) a mis fin à six mois d'expériences antérieures improductives avec la lignée LCR01 (section 4.1; $Y_{\min} = 0$ mg/gDW)) et a ouvert la porte à l'expérimentation de différents facteurs sur l'élicitation puisqu'il devenait possible d'observer des effets sur la production de TIA.

Puis, la comparaison de l'effet de différents éliciteurs sur la production de TIA en bioréacteur en fonction du temps a résulté dans l'obtention du meilleur rendement du groupe de recherche (section 4.3.2; $Y_{\max} = 35.7$ mg/gDW). Cet accomplissement est majeur car il met en doute l'efficacité à court terme d'une élicitation au MeJa par rapport à une phase de production prolongée sans éliciteur.

Enfin, l'importance de l'état de la suspension cellulaire a été soulevée par l'effet de la concentration de la biomasse à l'élicitation (section 4.2.2.1; ratio $Y_{\max}/Y_{\min} = 18$) et l'évolution des différentes concentrations de nutriments reliée à la croissance cellulaire (section 4.4.1; $\Delta_{\max} = 13.9$ mg/gDW). La portée de ces résultats est particulièrement intéressante quant à la question de la répétitivité des expériences. Il est en effet primordial de pouvoir recréer les conditions favorables à la production de TIA découvertes dans ces travaux pour éventuellement répéter et surpasser les meilleurs rendements obtenus. La Figure 4.15 présente une comparaison de rendements en TIA totaux obtenus dans diverses expériences identiques menées dans le cadre de ce mémoire. Les rendements sont comparés selon la concentration de biomasse à l'élicitation pour des conditions de production fixes : lignée cellulaire LCR02, élicitation avec 100 μM de MeJa, production en flacons de 250 mL et une période de production de 7 jours.

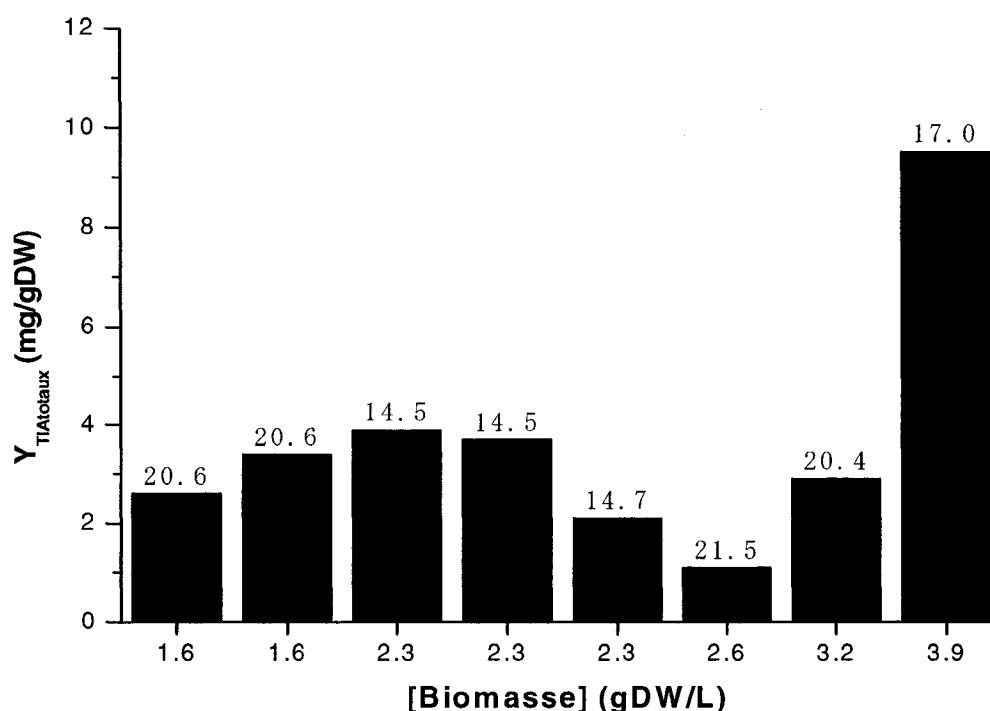


Figure 4.15 – Comparaison de rendements en TIA totaux en fonction de la concentration de la biomasse. Les valeurs au-dessus des barres noires représentent le ratio W/D.

Essentiellement, cette figure illustre que l'augmentation seule de la concentration de la biomasse à l'élicitation ne peut expliquer l'augmentation des rendements en TIA (section 4.2.2). En fait, comment expliquer les rendements similaires entre 1.6 et 3.2 gDW/L (≈ 3.0 mg/gDW), tandis qu'à 3.9 gDW/L les rendements en TIA augmentent subitement (9.5 mg/gDW). L'observation d'un paramètre supplémentaire comme le ratio W/D montre par exemple qu'il existe une différence importante dans l'état de la suspension cellulaire entre les résultats de rendements de 3.2 gDW/L (W/D= 20.4) et 3.9 gDW/L (W/D= 17.0). Les cellules contiennent en effet beaucoup plus d'eau à un ratio W/D plus élevé et cet état peut potentiellement affecté leur réponse à l'élicitation. D'autre part, la diminution du ratio W/D à un niveau tel 14.5 ne change pas nécessairement de façon spectaculaire les résultats de rendements. Par exemple, en passant de 1.6 gDW/L et W/D= 20.6 à 2.3 gDW/L et W/D= 14.5, les rendements sont

demeurés relativement égaux (≈ 3.5 mg/gDW). Ces deux paramètres ne suffisent pas à expliquer la variabilité dans les rendements. Donc, c'est bel et bien vers un état global de la suspension cellulaire équivalent qu'il faudra diriger les efforts de répétitivité des résultats de rendements d'une expérience à l'autre.

Cependant, malgré l'effort fait pour suivre la même procédure lors de l'inoculation et l'élicitation des cultures pour la production de TIA, il est évident qu'il est très difficile de suivre et maintenir constant tous les paramètres de l'état de la suspension cellulaire d'une fois à l'autre. En conséquence, une comparaison légitime des rendements de production de TIA ne peut être effectuée qu'entre des cultures élicitées au même moment et à partir d'une même cuvée de suspension cellulaire : l'état de la suspension cellulaire est alors nécessairement homogène. Ainsi, pour chaque série d'expériences présentées dans ce mémoire (section), il est correct de dire que la variabilité des rendements observés est due aux différents paramètres testés. Une conclusion identique est rapportée dans les travaux parallèles de Galipeau (2004).

CHAPITRE 5

5 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

L'objectif de ce projet de recherche était d'étudier la phase d'élicitation d'une suspension cellulaire de *C. roseus* afin de mieux comprendre le bioprocédé menant à la production d'alcaloïdes indoles terpénoïdes (TIA). Dans cette perspective, plusieurs paramètres de culture ont été étudiés quant à leurs effets sur les rendements de TIA suite à l'induction d'une période production. L'étude a donc débuté par la sélection d'une lignée cellulaire productive. Puis, les effets du volume de suspension cellulaire et ceux de la concentration de biomasse à l'élicitation ont été explorés en flacons. Ensuite, la sélection d'un éliciteur efficace a été menée en flacons et validée en bioréacteur. Enfin, deux expériences distinctes ont tenté d'observer l'importance de l'état de la suspension cellulaire à l'élicitation.

Les tests effectués sur trois différentes lignées cellulaires de *C. roseus* (LCR01, LCR02, LCR03) ont tout d'abord permis d'identifier la lignée LCR02 comme la plus productive. Cette étape a été déterminante car elle a permis d'abandonner une lignée complètement improductive (LCR01) sur laquelle de multiples essais infructueux avaient préalablement été tentés au laboratoire. Le tamisage d'une panoplie de lignées de *C. roseus* semble une avenue prometteuse dans la découverte d'une lignée possédant un potentiel de production optimale pour différents TIA d'intérêt.

Les expériences réalisées sur l'effet du volume de suspension cellulaire en flacons ont mené à l'adoption du format de flacons de 250 mL pour favoriser les rendements lors d'une phase de production en flacons. L'utilisation de ce petit format limite aussi le volume de suspension cellulaire requis ce qui pourrait faciliter la réalisation d'expériences en flacons avec répétitions, meilleures au point de vue statistique.

Les essais portant sur l'effet de trois différentes concentrations de biomasse à l'élicitation (20, 40 et 60 gWW/L) ont révélé une augmentation significative des rendements de TIA parallèlement à l'accroissement de l'incrément de concentration.

L'intervalle étudié n'a pas montré de plafonnement aux concentrations supérieures. Les résultats observés suggèrent fortement d'élucider les cultures de *C. roseus* à des concentrations au-dessus d'un seuil de 40 gWW/L afin d'éviter un effet toxique de l'élucideur et favoriser les rendements. D'autre part, à une concentration équivalente de biomasse, la méthode d'inoculation des flacons par transfert de la suspension cellulaire semble plus efficace (meilleur rendement) que la méthode par transfert de cellules filtrées stérilement.

L'étape culminante du choix d'un élucideur par tamisage en flacons de cinq différents élucideurs (MeJa, chitine, acide malique, TAB, CeCl_3) à trois niveaux de concentration a permis de distinguer le méthyle jasmonate (50 à 100 μM) comme le meilleur élucideur du groupe. L'acide malique est le seul autre élucideur testé n'ayant pas eu un effet négatif sur les rendements en TIA en comparaison au contrôle (milieu de production et résine XAD-7). Une étude de la production de TIA en fonction du temps a par la suite été entreprise en bioréacteurs afin de comparer à nouveau les rendements entre une élucitation au MeJa, à l'acide malique et un contrôle sans élucideur (contrôle). Cette expérience a confirmé les résultats de Galipeau (Galipeau, 2004) quant à la période maximale de production en bioréacteur de 4 à 6 jours induite par l'élucitation d'une culture au MeJa. Cependant, le fait saillant de ce mémoire a été obtenu alors que la culture sans élucideur a continué de produire jusqu'à la fin de l'expérience (11 jours) résultant au rendement maximum du groupe de recherche (35.7 $\text{mgTIA}_{\text{total}}/\text{gDW}$). Malgré une productivité accrue pendant les 7 premiers jours de production suite à l'élucitation au MeJa, il pourrait être plus avantageux de ne pas ajouter d'élucideur de manière à favoriser une phase de production prolongée permettant une plus grande production totale et une productivité accrue sur l'ensemble du temps de culture (croissance et production). Cette possibilité pourra certainement être investiguée au cours de travaux ultérieurs afin de maximiser la productivité du bioprocédé.

Enfin, la première expérience en flacons tentée sur l'étude de l'état de la suspension cellulaire à l'élucitation a permis de réaffirmer deux conclusions déjà exprimées dans des travaux antérieurs chez Phytobiotech inc. D'une part, la production de métabolites

secondaires est souvent meilleure après l'absorption complète du phosphate extracellulaire par les cellules. D'autre part, il est souvent préférable d'élucider les cellules alors qu'elles sont en pleine phase exponentielle de croissance pour obtenir des meilleurs rendements. En fait, dans cette expérience, le rendement maximum en TIA totaux a été obtenu après 7 jours de croissance et un doublement de la concentration de biomasse. L'évolution de l'état de la suspension cellulaire sous-jacente à cette croissance a fait augmenter les rendements par un facteur de 14. Il serait maintenant intéressant de répéter cette expérience en maintenant égaux les paramètres de l'état de la suspension cellulaire et vérifier si les rendements obtenus seraient identiques. Éventuellement, si l'hypothèse précédente est vérifiée, il serait alors possible de chercher quel état de la suspension cellulaire à l'élucitation résulte à un rendement optimal. Malheureusement, la deuxième expérience tentée sur l'étude de la suspension cellulaire a plutôt porté sur une nouvelle exploration de l'effet de la concentration de phosphate extracellulaire au moment de l'élucitation sur la production de TIA. Cette expérience a su confirmer une augmentation du potentiel de production en TIA dans les premiers 24 heures suivant l'inoculation de la culture. Cette période de temps coïncide à nouveau avec l'absorption complète du phosphate extracellulaire par les cellules.

Finalement, la difficulté à assurer la reproduction des différents paramètres de l'état de la suspension cellulaire d'une expérience à l'autre dans le temps cause un problème de répétitivité des rendements. En effet, une comparaison légitime des rendements de production ne peut être effectuée qu'entre des cultures élicitées au même moment et à partir d'une même cuvée de cellules. Il est donc crucial d'arriver à mieux comprendre quels paramètres de l'état de la suspension cellulaire ont le plus d'impact sur la capacité des cellules de *C. roseus* à produire des TIA. D'une part, cela permettrait de garantir la répétitivité des rendements obtenus à ce jour en maintenant les bons paramètres constants. D'autre part, cette compréhension accrue des cellules végétales est peut-être la clef vers le développement d'un bioprocédé rentable.

BIBLIOGRAPHIE

- AGRAWAL, G.K., RAKWAK, R., IWAHASHI, H. 2002. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294 : 1009-1016.
- AKIMOTO, C., AOAGI, H., TANAKA, H. 1999. "Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 : 429-436.
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F., LOW, P.S. 1989. "Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction". *Plant Physiology.* 90 : 109-116.
- ARMERO, J., TENA, M. 2001. "Possible role of plasma membrane H⁺-ATPase in the elicitation of phytoalexin and related isoflavone root secretion in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings". *Plant Science.* 161 : 791-798.
- BACH, M., SCHNITZLER, J.-P., SEITZ, H.U. 1993. "Elicitor-Induced Changes in Ca²⁺ Influx, K⁺ Efflux, and 4-Hydroxybenzoic Acid Synthesis in Protoplasts of *Daucus carota* L. ". *Plant Physiology.* 103 : 407-412.
- BACKER-ROYER, C., DE VANNEREAU, A., DURAT, S., VILLARIGNES, R., COSSON, L. 1990. "Action de métaux lourds Cu et Ca sur des cellules de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*: adaptation et production alcaloïdique". *Les Colloq. de l'INRA.* 51 : 247-251.
- BESTWICK, C.S., BROWN, I.R., BENNET, M.H., MANSFIELD, J.W. 1997. "Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* bv *phaseolicola*". *Plant Cell.* 9 : 209-221.

- BIELESKI, R. 1973. "Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability". *Annual Review of Plant Physiology*. 24 : 225-252.
- BOLWELL G.P., BUTI, V.S., DAVIES, D.R., ZIMMERLIN, A. 1995. "The origin of the oxidative burst in plants". *Free Radical Research*. 23 : 517-532.
- BOUMA, D. 1975. "The uptake and translocation of sulphur in plant". *Sulphur in Australasian Agriculture* . Ed. K.D. McLachlan. Sydney : 79.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, E., GONTIER, E. 2001. "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.". *Plant Science*. 161 : 839-851.
- CASTANEDA, P., PEREZ, L.M. 1996. "Calcium ions promote the response of *Citrus limon* against fungal elicitors or wounding". *Phytochemistry*. 42 : 595-598.
- CHEN, W.J., GU, Y.H., ZHAO, G.W., TAO, Y., LUO, J.P., HU, T.D. 2000. "Effects of rare earth ions on activity of RuBPcase in tobacco". *Plant Sci*. 152 : 145-151.
- CHEONG, J.J., HAHN, M.G. 1991. "A specific, high-affinity binding site for the hepta- β -glucoside elicitor exists in soybean membranes". *Plant Cell*. 3 : 137-147.
- CIDDI, V., SRINIVASAN, V., SHULER, M.L. 1995. "Elicitation of *Taxus* Sp. cell cultures for production of taxol". *Biotechnol. Lett*. 17 : 1343-1346.
- CLARKSON, D., HANSON, J. 1980. "The mineral nutrition of higher plants". *Annual Review of Physiology*. 31 : 239-298.
- CONCONI, A., MIQUEL, M., BROWSE, J.A., RYAN, C.A. 1996. "Intracellular Levels of Free Linolenic and Linoleic Acids Increase in Tomato Leaves in Response to Wounding". *Plant Physiol*. 111 : 797-803.
- CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. 1997. "Biosynthesis and action of jasmonates in plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 48 : 355-381.

- DELLEDONNE, M., MURGIA, I., EDERLE, D., SBICEGO, P.F., BIODANI, A., POLVERARI, A., LAMB, C. 2002. "Reactive Oxygen Intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease resistance response". *Plant Physiol. Biochem.* 40 : 605-610.
- DIXON, R.A., HARRISON, M.J., LAMB, C.J. 1994. "Early events in the activation of plant defense responses". *Annual Review Phytopathology* 32: 479-501.
- DOREY, S., KOPP, M., GEOFFROY, P., FRITIG, B., KAUFFMANN, S. 1999. "Hydrogen peroxyde from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor". *Plant Physiology*. 119 : 1289-1296.
- DROILLARD, M.J., THIBIVILLIERS, S., CAZALE, A.C., BARBIER-BRYGOO, H., LAURIERE, C. 2000. "Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase". *FEBS Lett.* 474 : 217-222.
- EILERT, U. 1987. "Elicitation: methodology and aspects of application. In: I.K. and Constabel, F. (Eds.), Cell culture and somatic cell genetics of plants.". *Academic press*. 153-167.
- EILERT, U., KURZ, W.G.W., CONSTABEL, F. 1985. "Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors". *Journal of Plant Physiology*. 119:65-76.
- FARMER, E.E. 1994. "Fatty acids signaling and their associated microorganism". *Plant Mol. Biol.* 26 : 1423-1437.
- FARMER, E.E., RYAN, C.A. 1992. " Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors". *Plant Cell*. 4 : 129-134.

- FARRAR, J., POLLOCK, C., GALLAGHER, J. 2000. "Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants". *Plant Science*. 254 : 1-11.
- FELIX, G., GROSSKOPF, D.G., REGENASS, M., BOELLER, T. 1991. "Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 : 8831-8834.
- FEYS, B.J., BENEDITTI, C.E., PENFOLD, C.N., TURNER, J.G. 1994. "Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate and Resistant to a Bacterial Pathogen". *Plant cell*. 6 : 751.
- FORTIER, M. 2004. *Mise à l'échelle de bioréacteurs de 5 litres à 150 litres pour la culture de cellules végétales*. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal.
- GALIPEAU, S. 2004. *Étude de la phase de production d'alcaloïdes indoliques par une suspension cellulaire de Catharanthus roseus*. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal
- GELLI, A., HIGGINS, V.J., BLUMWALD, E. 1997. "Activation of Plant Plasma Membrane Ca^{2+} -Permeable Channels by Race-Specific Fungal Elicitors". *Plant Physiol.* 113 : 269-279.
- GIBSON, S.I. 2000. "Plant sugar-response pathways: part of a complex regulatory web". *Plant Physiology*. 124 : 1532-1539.
- GORENFLOT, R. 1985. *Biologie végétale: plantes supérieures*. Paris. Ed. Masson.
- GUNDLACH, H., MULLER, M., KUTCHAN, T., ZENK, M. 1992. "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89 : 2389-2393.

- HAEHNEL, W. 1984. "Photosynthetic electron transport in higher plants". *Annual Review of Plant Physiology*. 35 : 659-693.
- HAMBERG, M., FAHLSTADIUS, P. 1990. "Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism". *Arch. Biochem. Biophys.* 276 : 518-524.
- HAMERSKI, D., BEIER, R.C., KNEUSEL, R.E., MATERN, U., HIMMELSPACHT, K. 1990. "Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension cultures of *Ammi majus*". *Phytochemistry*. 29 : 1137-1142.
- HARBORNE, JB. 1978. "Biochemical aspects of plant and animal coevolution". *Academic Press. Ann. Proc. Phytochem. Soc. Europe*. London. 15.
- HEPLER, P.K., WAYNE, R.O. 1985. "Calcium and plant development". *Annual Review of Plant Physiology*. 36 : 397-439.
- HUANG, X., KIEFER, E., VON RAD, U., ERNST, D., FOISSNER, I., DURNER, J. 2002. "Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants" *Plant Physiol. Biochem.* 40 : 625-631.
- HUBER, S.C., HUBER, J.L. 1996. "Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47 : 431-444.
- ITO, Y., SHIBUYA, N. 2000. "Receptors for the microbial elicitors of plant defense responses". *Plant Microbe Interactions*. 48 : 93-102
- IVASHIKINA, N., BECKER, D., ACHE, P., MEYERHOFF, O., FELLE, H.H., HEDRICH, R. 2001. "K⁺ channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs". *FEBS Lett.* 508 : 463-469.

- IVASHIKINA, N.V., SOKOLOV, O.A. 1997. "Regulation of nitrate uptake and distribution in maize seedlings by nitrate, nitrite ammonium and glutamate". *Plant Science*. 123 : 29-37.
- JABS, T., TSCHÖPE, M., COLLING, C., HAHLBROCK, K., SCHEEL, D. 1997. "Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essentials components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94 : 4800-4805.
- JUN, L.C., SHENG, H.S. 1998. "Effects of fungal elicitors on the cell growth and the shikonin biosynthesis in *Arnebia euchroma* cells in suspension cultures". *Acta Phytophysiologica Sin.* 24 : 6-10.
- KASPAROVA, M., SIATKA, T. 2001. "Effect of chitosan on the production of anthracene derivatives in tissue culture of *Rheum palmatum* L." *Ceska Slov. Farm.* 50 : 249-253.
- KATZ, V., FUCHS, A., CONRATH, U. 2002. "Pretreatment with salicylic acid primes parsley cells for enhanced ion transport following elicitation". *FEBS Lett.* 520 : 53-57.
- 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 : 385-392.
- KEEN, N.T. 1975. "Effects of *Phytophthora megasperma* (root-rot fungus) culture fluid on soybean (*Glycine max* cv. Harosoy) phytoalexin production". *Science*. 187 : 7-12.
- KELLY, W.B., ESSER, J.E., SCHROEDER, J.I. 1995. "Effects of Cytosolic Calcium and Limited, Possible Dual, Effects of G protein Modulators on Guard Cell Inward Potassium Channels". *Plant J.* 8 : 479-489.

- KLESSIG, D.F., DURNER, J., SHAH, J., YANG, Y. 1998. "Phytochemical Signals and Plant Microbe Interactions". *ed. Romeo et coll. Ch. 7.* 119-137.
- KOBAYASHI, I., MURDOCH, L., KUNOH, H., HARDHAM, A.R. 1995. "Cell biology of early events in the plant resistance response to infection by pathogenic fungi". *Can. J. Bot.* 73 : 418-425.
- KOMBRINK, E., HAHLBROCK, K. 1985. "Dependence of the level of phytoalexin and enzyme induction by fungal elicitor of the growth stage of *Petroselinum crispum* cell cultures". *Plant cell report.* 4 : 277-280.
- KUTCHAN, T.M. 1995. "Alkaloid biosynthesis - the basis for metabolic engineering of medicinal plants". *Plant Cell.* 7 : 1059-1070.
- LALONDE, S., BOLES, E., HELLMANN, H., BARKER, L., PTRICK, J.W., FROMMER, W.B. et coll. 1999. "The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing". *The Plant Cell.* 11 : 707-726.
- LEBRUN-GARCIA, A., BOURQUE, S., BINET, M.-N., OUAKED, F., WENDEHENNE, D., CHILTZ, A., SCHAFFNER, A., PUGIN, A. 1999. "Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco". *Biochimie.* 81 : 663-668.
- LI, F.D., HARRIS, B., URRUTIA, M.M., BEVERIDGE, T.J. 1994. "Reduction of Cr(VI) by consortium of sulfate-reducing bacteria (SRBIII)". *Appl. Env. Microbiol.* 60 : 1525-1531.
- LIECHTI, R., FARMER, E.E. 2002. "The jasmonate pathway". *Science.* 296 : 1649-1650.
- LOW, P.S., MERIDA, J.R. 1996. "The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction". *Physiol. Plant.* 96 : 533-542.

- MACEK, T., KOTRBA, P., SUCHOVA, M., SKACEL, F., DEMNERORA, K., RUMIL, T. 1994. "Accumulation of Cadmium by hairy root cultures of *Salamun nigrum*". *Biotechnol. Lett.* 16 : 621-624.
- MAHADY, G.B., LIU, C., BEECHER, W.W. 1998. "Involvement of protein kinase and G proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis". *Phytochemistry.* 48 : 93-102.
- MATHIEU, Y., KURKDJIAN, A., XIA, H., GUERN, J., KOLLER, A., SPIRO, M.D. O'NEILL, M., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. 1991. "Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells" *Plant J.* 1 : 333-343.
- MEMELINK, J., VERPOORTE, R., KIJNE, J.W. 2001. "ORCAization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism". *TRENDS in Plant Science.* 6.
- MICHAL, G. 1999. *Biochemical Pathways*. New York : John Wiley & Sons inc.
- MIRJALILI, N., LINDEN, J.C. 1996. "Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models". *Biotechnol. Prog.* 12 : 110-118.
- MISAWA, J., GOODBODY, A.E. 1996. "Production of antitumor compounds by plant cultures" *Plant cell culture secondary metabolism toward industrial application*. CRC Press. 123-138.
- MITHOFER, A., DAXBERGER, A., FROMHOLD-TREU, D., EBEL, J. 1997. "Involvement of a NAD(P)H oxidase in the elicitor-inducible oxidative burst of soybean". *Phytochemistry.* 45 : 1101-1107.
- MORENO, P.R.H., POULSEN, C., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1996. "Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G.Don cell suspension cultures" *Enzyme Microb. Technol.* 18 : 99-107.

- MORENO, P.R.H., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1995. "Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: a literature survey II. Updating from 1988-1993.". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 42 : 1-25.
- NAMDEO, A., SHRIDHAR, P., DEVANAND, P.F. 2002. "Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*". *Biotechnol. Prog.* 18 : 159-162.
- NEDELKOSKA, T.V., DORAN, P.M. 2000. "Hyperaccumulation of Cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*". *Biotechnol. Bioeng.* 67 : 607-615.
- NENNSTIEL, D., SCHEEL, D., NUMBERGER, T. 1998. "Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*)" *FEBS Lett.* 431 : 405-410.
- O'KEEFE, B.R., MAHADY, G.B., GILLS, J.J., BEECHER, C.W.W., SCHILLING, A.W. 1997. "Stable vindoline production in transformed cell cultures of *C.roseus*". *Journal of Natural Products.* 60 : 261-264.
- PEDRAS, M.S.C., NYCHOLAT, C.M., MONTAUT, S., XU, Y., KHAN, A.Q. 2002. "Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip". *Phytochemistry.* 59 : 611-625.
- PIEL, J., ATZORN, R., GABLER, R., KUHNEMANN, F., BOLAND, W. 1997. "Cellulysin from the plant parasitic fungus *Trichoderma viride* elicits volatile biosynthesis in higher plants via the octadecanoid signalling cascade". *FEBS Lett.* 416 : 143-148.
- PLAXTON, W.C. 1998. "Metabolic aspects of phosphate starvation in plants". *Phosphorus in Plant Biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes.* American Society of Plant Physiologists : 229-241.

- PREETA, R., NAIR, R.R. 1999. "Stimulation of cardiac fibroblast proliferation by cerium: a superoxide anion-mediated response". *J. Mol. Cell Cardiol.* 31 : 1573-1580.
- PRESCOTT, H.A.K. 1993. *Microbiologie*. W.C Brown Communication, Inc., De Boeck University.
- PUGIN, A., FRACHISSE, J.M., TAVERNIER, E., BLIGNY, R., GOUT, E., DOUCE, R., GUERN, J. 1999. "Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway" *Plant Cell.* 9 : 2077-2091.
- RADMAN, R., SAEZ, T., BUCKE, C., KESHAVARZ, T. 2003. "Elicitation of plants and microbial cell systems". *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 : 91-102.
- 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". *Biotechnol. Prog.* 14 : 442-449.
- RODRIGUEZ, T.J., GIULIETTI, A.M. 1995. "In vitro thiopene production by transformed root cultures of *Tagetes laxa* (Cabrera)". *Biotechnol. Lett.* 17 : 1337-1342.
- ROMEIS, T. 2001. "Protein kinases in the plant defence response" *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 : 407-414.
- ROOS, W., DORDSCHBAL, 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*". *Biochim. Biophys. Acta.* 1448 : 390-402.
- SANDERS, D., BROWNLEE, C., HARPER, J.F. 1999. "Communicating with calcium". *The Plant Cell.* 11 : 691-706.

- SCHOPFER, C.R., KOCHS, G., LOTTSPEICH, F., EBEL, J. 1998. "Molecular characterization and functional expression of dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase, an enzyme specific for pterocarpanoid phytoalexin biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.)". *FEBS Lett.* 432 : 182-186.
- SCHUMACHER, H.M., GUNDLACH, H., FIEDLER, F., ZENK, M.H. 1987. "Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures". *Plant Cell Report.* 6 : 410-413.
- SHARP, J.K., MCNEIL, M., ALBERSTEIN, P. 1984. "The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(beta-D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*". *J. Biol. Chem.* 259 : 11321-11336.
- SMEEKENS, S. 2000. "Sugar-induced signal transduction in plants". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 51 : 49-81.
- SMITH, D.A., BANKS, S.W. 1986. "Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins". *Phytochemistry.* 25 : 979-995.
- SMITH, J.T., SMART, N.J., MISAWA, M., KURZ, W.G.W., TALLER, S.G., DICOSMO, F. 1987. "Increased accumulation of indole alkaloids by some cell lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadyl sulphate". *Plant Cell Report.* 6 : 142-145.
- ST-PIERRE, B., VASQUEZ-FLOTA, F.A., DELUCA, V. 1999. "Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate". *Plant Cell.* 11 : 887-900.
- STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M., FRITIG, B. 1993. "Plant

- pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens" *Biochimie*. 75 : 687-706.
- STURM, A. 1999. "Invertases, primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning". *Plant Physiology*. 121 : 1-7.
- SVOBODA, G.H. 1983. "The role of the alkaloids of *Catharanthus G. Don* and their derivatives in cancer chemotherapy". *Workshop proceedings*.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland : Sinauer Associates Inc. Publishers
- TERRY, N. 1977. "Photosynthesis, growth and the role of chloride". *Plant Physiology*. 60 : 69-75.
- THRELFALL, D.R., WHITEHEAD, I.M. 1988. "Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*". *Phytochemistry*. 27 : 2567-2580.
- TIKHOMIROFF, C. 2001. *Étude des métabolismes primaire et secondaire de racines transformées de Catharanthus roseus en vue du développement d'un modèle cinétique*. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal
- VAN DER FITS, L., MEMELINK, J. 2001. "The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element". *Plant J*. 25 : 23-43.
- VAN DER FITS, L., MEMELINK, J. 2000. "ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism". *Science*. 289 : 295-297
- VAN DER FITS, L., Zhang, H., Menke, F.L.H., Deneka, M., Memelink J.. 2000. "A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region

- of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a jasmonate-independent signal transduction pathway". *Plant Mol. Biol.* 44. 675-685.
- VERPOORTE, R., CONTIN, A., MEMELINK, J. 2002. "Biotechnology for the production of plant secondary metabolites". *Phytochemistry Reviews*. 1 : 13-25.
- VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., MEMELINK, J. 2000. "Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production". *Transgenic Research*. 9 : 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.
- VICK, B.A., ZIMMERMAN, D.C. 1984. "The biosynthesis of jasmonic acid by several plant species". *Plant Physiol.* 75 : 458-461.
- VIJAYAN, P., SHOCKEY, J., LÉVESQUE, C.A., COOK, R.J., BROWSE, J. 1998. "A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*" *Plant biol.* 95 : 7209-7214.
- WILLIAMS, L.E., LEMOINE, R., SAUER, N. 2000. "Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation". *Trends in Plant Science*. 5 (7) : 283-290.
- WILLIAMS, R.D., CHAURET, N., BÉDARD, C., ARCHAMBAULT, J. 1992. "Effect of polymeric adsorbents on the production of sanguinarine by *papaver somniferum* cell cultures". *Biotechnology and Bioengineering*. 40:971-977.
- WINK, M. 1997. "Special Nitrogen Metabolism". *Plant Biochemistry*. San Diego : Academic Press Limited : 439-485.

- WU, J., LIN, L. 2002. "Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (Panax ginseng) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 : 51-57.
- YANG, J., YU, M., JAN, Y.N., JAN, L.Y. 1997. "Stabilization of ion selectivity filter by pore loop ion pairs in an inwardly rectifying potassium channel". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 : 1568-1572.
- ZHAO, J., HU, Q., GUO, Y.Q., ZHU, W.H. 2001b. "Elicitor-Induced Indole Alkaloid Biosynthesis in Catharanthus Roseus Cell Cultures Is Related to Ca²⁺ Influx and the Oxidative Burst". *Plant Science.* 161:3. 423-431.
- ZHAO, J., ZHU, W., HU, Q. 2001a. "Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in catharanthus roseus suspension cell culture". *Enzyme Microb Technol.* 28 : 7-8. 666-672.
- ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q. 2000b. "Promotion of indole alkaloid production in Catharanthus roseus cell cultures by rare earth elements". *Biotechnology Letters.* 22 : 825-828.
- ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q., GUO, Y.Q. 2000c . "Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock". *Biotechnol. Lett.* 22 : 1227-1231.
- ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q., HE, X.W. 2000a. "Improved Alkaloid Production in Catharanthus Roseus Suspension Cell Cultures by Various Chemicals". *Biotechnology Letters.* 22:15. 1221-1226.

ANNEXE A :
COMPOSITION DU MILIEU B5 (GAMBORG ET COLL., 1968)

Macronutriments	mM
KNO ₃	25
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.1
Micronutriments	μM
KI	4.5
H ₃ BO ₃	50
MnSO ₄ .H ₂ O	60
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7.0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1.0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1
EDTA - Ferric salt	100
Vitamines	mg/L
Inositol	100
Nicotinic acid	1.0
Pyridoxine.HCl	1.0
Thiamine.HCl	10.0
Glucides	g/L
Sucrose	30

ANNEXE B :
COMPOSITION DU MILIEU DE PRODUCTION MP-LCR

Macronutriments	mM
KNO ₃	10
CaCl ₂ .2H ₂ O	2
NaCl	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
(NH ₄) ₂ citrate	3
Micronutriments	μM
KI	4.5
H ₃ BO ₃	50
MnSO ₄ .H ₂ O	60
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7.0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1.0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1
EDTA - Ferric salt	100
Vitamines	mg/L
Inositol	100
Nicotinic acid	1.0
Pyridoxine.HCl	1.0
Thiamine.HCl	10.0
Glucides	g/L
Glucose	60

ANNEXE C :
ÉLICITEURS

Éliciteur	Fournisseur	Solvant	Stérilisation
Methyle jasmonate	Bedoukian research	Ethanol 95%	Filtration stérile
Chitine	Sigma-Aldrich	Eau	Autoclave
Acide malique	Sigma-Aldrich	Eau	Filtration stérile
Tetramethyle ammonium bromide	Sigma-Aldrich	Eau	Filtration stérile
Chlorure de cérium (CeCl ₃)	Sigma-Aldrich	Eau	Filtration stérile

ANNEXE D :
EXPÉRIENCE VALIDATION D'ÉLICITEURS EN BIORÉACTEURS

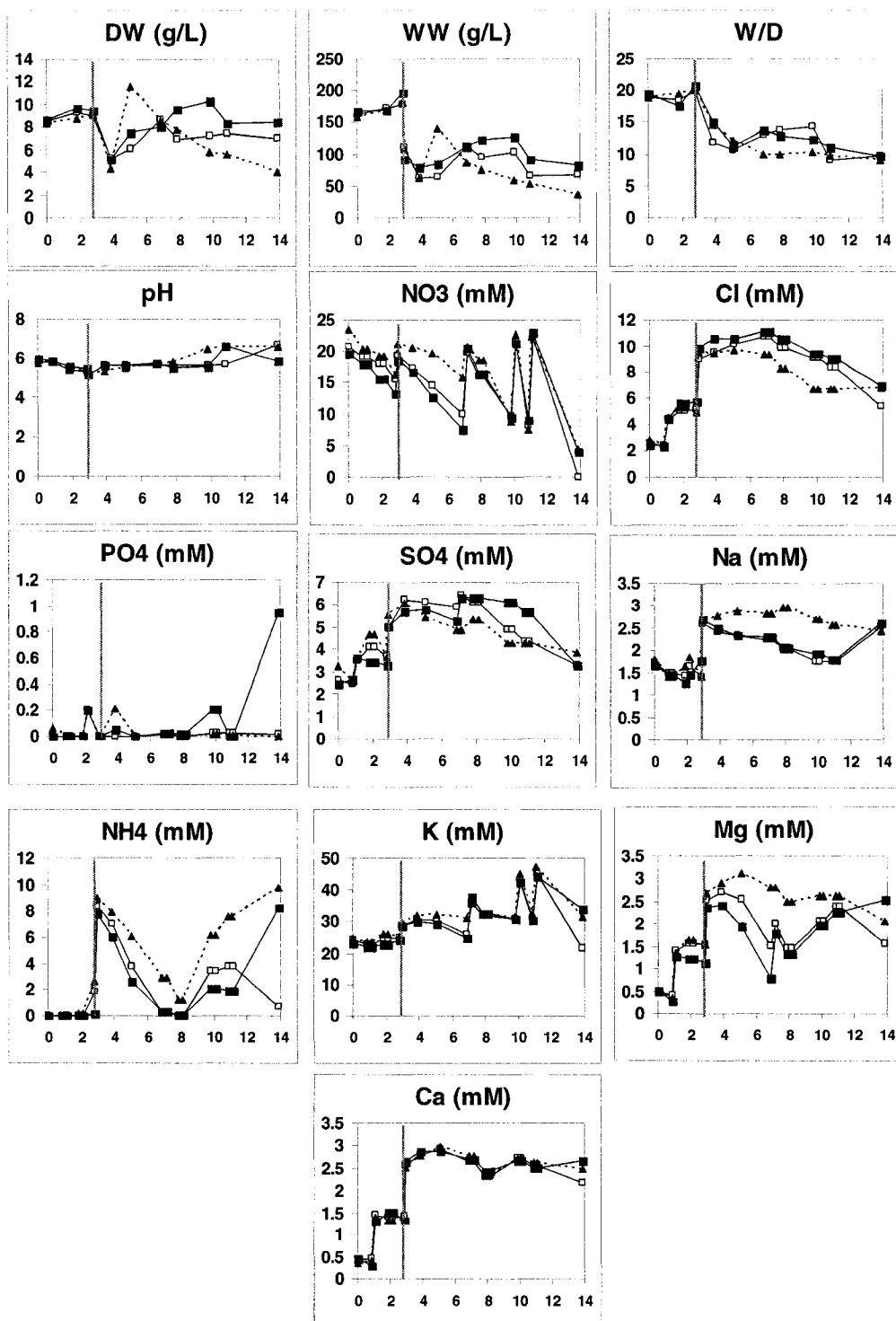


Figure D.1 - Données d'échantillonnage des bioréacteurs ▲ : 100 uM MeJa, □ : 60 mg/L AM, ■ : contrôle. La ligne verticale représente le moment de l'élicitation.

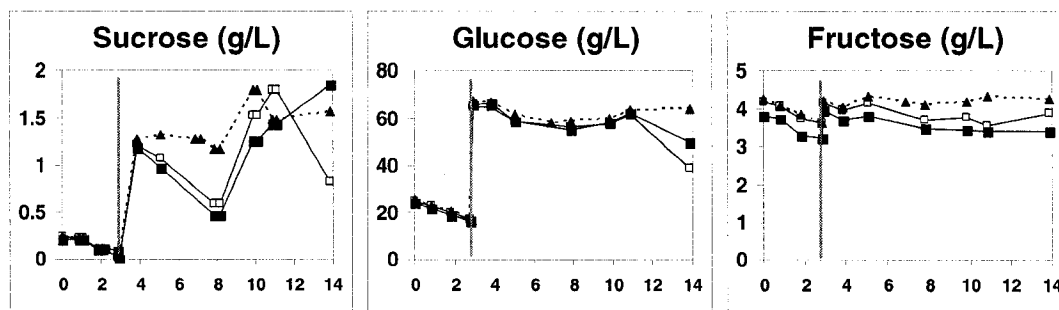


Figure D.2 - Suite des données d'échantillonnage des bioréacteurs élicités avec ▲ : 100 uM MeJa, □ : 60 mg/L AM, ■ : contrôle. La ligne verticale représente le moment de l'élicitation.

ANNEXE E : COMPARAISON DES PARAMÈTRES DE L'ÉTAT DE LA SUSPENSION CELLULAIRE À L'INOCULATION

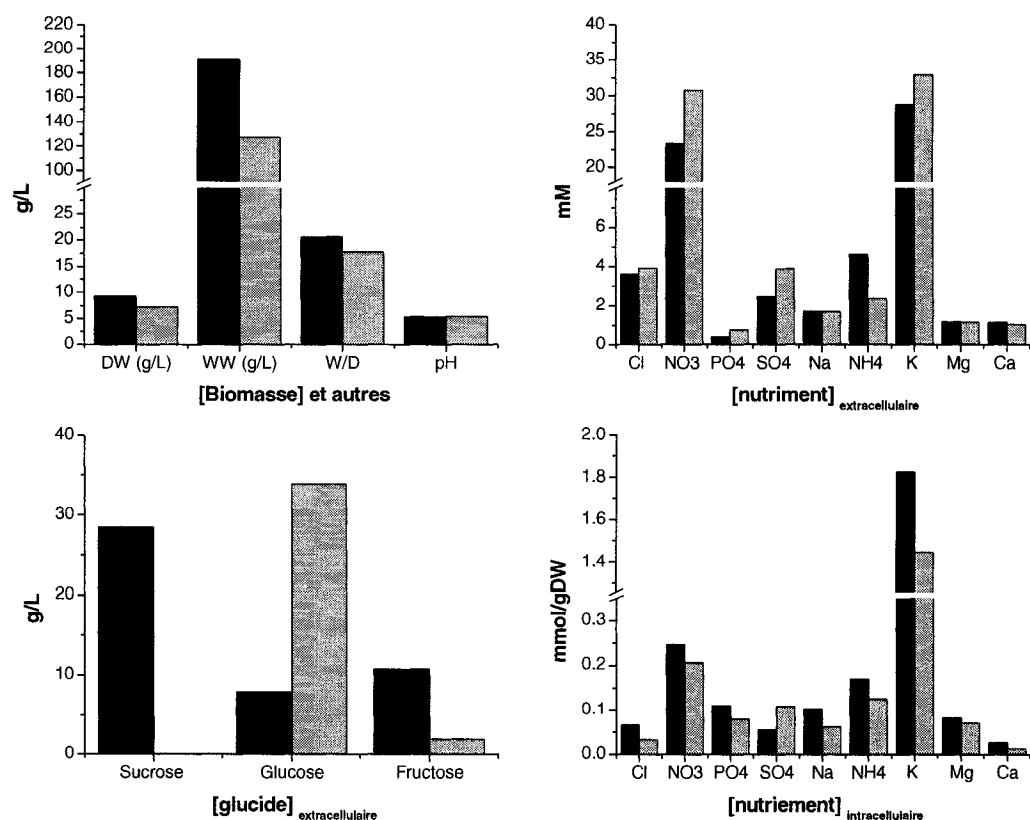


Figure E - État initial de la suspension cellulaire. ■ : Bioréacteur (section 4.4.2) □ : Flacon (section 4.4.1)