

Titre: Étude de la phase de production d'alcaloïdes indoliques par une suspension cellulaire de *Catharanthus Roseus*
Title: suspension cellulaire de *Catharanthus Roseus*

Auteur: Sarah Galipeau
Author: Sarah Galipeau

Date: 2004

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Galipeau, S. (2004). Étude de la phase de production d'alcaloïdes indoliques par une suspension cellulaire de *Catharanthus Roseus* [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8412/>
Citation: Galipeau, S. (2004). Étude de la phase de production d'alcaloïdes indoliques par une suspension cellulaire de *Catharanthus Roseus* [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8412/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/8412/>
PolyPublie URL: <https://publications.polymtl.ca/8412/>

Directeurs de recherche: Michel Perrier, & Joël Sirois
Advisors: Michel Perrier, & Joël Sirois

Programme: Unspecified
Program: Unspecified

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA PHASE DE PRODUCTION D'ALCALOÏDES INDOLIQUES PAR
UNE SUSPENSION CELLULAIRE DE *CATHARANTHUS ROSEUS*

SARAH GALIPEAU
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

©Sarah Galipeau, 2004.



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-47664-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-47664-2

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.

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

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

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


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulée :

ÉTUDE DE LA PHASE DE PRODUCTION D'ALCALOÏDES INDOLIQUES PAR
UNE SUSPENSION CELLULAIRE DE *CATHARANTHUS ROSEUS*

présenté par : GALIPEAU Sarah

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

a été dûment accepté au jury d'examen constitué de :

M. STUART Paul, Ph.D., président

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. SIROIS Joël, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre

*Ce sont rarement les réponses qui apportent la vérité,
mais l'enchaînement des questions.*

Daniel Pennac
La Fée Carabine

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier chaudement M. Joël Sirois, mon codirecteur de recherche, pour son appui, sa disponibilité et sa confiance tout au long de ma maîtrise. Il m'a non seulement transmis sa passion pour la recherche, mais il m'a aussi permis de grandir professionnellement. Je veux aussi exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche M. Michel Perrier pour la confiance qu'il a en moi.

Je suis reconnaissante à M. Jean Archambault de m'avoir permis de réaliser une maîtrise en entreprise. Je remercie tous les employés de Phytobiotech inc. pour leur conseil, leur aide et leur patience et plus particulièrement, mes compagnons de laboratoire : Martin, Dany, Néo, David, Annie, Steve et Stéphane « Ti-cœur » ainsi que Julie, Julie-Andrée et Benoît pour les nombreuses analyses HPLC.

Je ne peux passer sous silence l'apport de mes partenaires phyto-étudiants : Philippe, Sébastien et Matthieu. En plus d'avoir participé activement à mes travaux et d'avoir été un support moral constant, ils ont agrémente ces deux

ans de maintes discussions intéressantes, d'un brin de folie, d'une pointe d'ironie et bien heureusement, d'horrible musique ...

Merci au Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies pour le support financier lors de mes études.

Je tiens à rendre hommage à mes proches sans qui rien de tout cela n'aurait eu la même saveur. À ma mère, mon amie, parce qu'en plus de m'avoir transmis le goût du savoir, elle est une source d'inspiration constante. À mon père, qui me donne une grande leçon de vie. À mes sœurs pour leur amitié et leur réconfort. À Jérôme pour son soutien, sa compréhension et son amour. Merci aussi à Michelle, Berthier, Jonathan, Mélanie, Alexandre, Karine, Catherine.

RÉSUMÉ

Les plantes sont une source de molécules bio-actives très importante. Malheureusement, la plupart des médicaments d'origine végétale sont extraits directement de la plante par des procédés très coûteux. La culture de cellules en suspension est un procédé alternatif permettant la production de métabolites secondaires. Par contre, peu de bioprocédés de production de métabolites secondaires par des suspensions cellulaires sont exploités de façon rentable, à ce jour. La faible productivité en métabolites secondaires des espèces végétales étudiées est partiellement responsable de ce phénomène. La résolution des problèmes de productivité pourrait passer par la caractérisation de la phase de production.

Ce mémoire de maîtrise présente une étude de la phase de production de métabolites secondaires comprenant l'étude de la phase adsorbante et des paramètres hormonaux et nutritionnels. La pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) a été choisie comme espèce modèle. Elle est bien connue de la communauté scientifique pour sa production de métabolites secondaires ayant des propriétés vasodilatatrices et anti-cancérigènes.

Les différents tests réalisés sur la phase adsorbante permettent d'énoncer plusieurs suggestions pour l'établissement du bioprocédé efficace. La

résine XAD-7 comme phase adsorbante du bioprocédé possède une efficacité supérieure et des propriétés physiques qui lui confèrent des avantages par rapport à ses concurrentes (XAD-4, XAD-16, XAD-761, XAD-1180, XAD-1600 et HP-2MG). Le délai optimal d'ajout de la résine dépend de l'inducteur utilisé. Dans le cas de la chitine, un ajout entre 3 et 5 heures après l'élicitation engendre les meilleurs rendements (1.8 mg gDW^{-1}). Quant au méthyle jasmonate, un délai d'ajout de la résine entre 5 min et 3 heures après l'induction génère les meilleurs rendements (15.3 mg gDW^{-1}). L'effet de la concentration de la résine en flacon démontre qu'une concentration de 50 g L^{-1} de XAD-7 semble plus efficace que des concentrations de 100 et 200 g L^{-1} .

L'effet des régulateurs de croissance sur la production a aussi été étudié. La présence de 2,4-D durant la phase de croissance empêche l'accumulation de TIA avant l'induction sans inhiber l'élicitabilité des cellules, contrairement au BA et au NAA.

Le premier paramètre nutritionnel étudié dans ce mémoire est l'influence du type de source de carbone utilisé en production. Cette expérience suggère que l'utilisation de sucrose augmente les rendements d'environ 5X par rapport aux autres sucres (glucose, fructose et maltose), soit de 2.3 à 12.7 mg gDW^{-1} . Selon une étude de l'influence de la concentration de glucides,

les taux de production maximums et les rendements maximums de l'ajmalicine, de la tabersonine et de la tryptamine suivent une tendance sigmoïdale en fonction de la concentration de glucose. Une concentration de glucose entre 30 et 60 g L⁻¹ favorisent les rendements en tabersonine et en ajmalicine.

Les expériences en bioréacteurs ont aussi permis de déterminer la longueur de la période de production. La production des TIA se fait principalement durant les quatre à six premiers jours après l'induction. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer l'arrêt de la production. Premièrement, une limitation au phosphate n'est pas écartée. Deuxièmement, la présence d'un ou des inhibiteur(s) pourrait aussi être la cause de cet arrêt de production. L'inhibiteur pourrait être un TIA ou encore une autre molécule produite lors de la réaction d'induction du métabolisme secondaire. Finalement, l'épuisement en précurseur pourrait aussi expliquer la baisse de production. Une pénurie de sécologanine empêcherait la formation de strictosidine et donc de tous les autres TIA.

L'ajout de 0.3 mM de phosphate en production n'a pas montré d'influence sur les taux de production et les rendements. La stratégie d'ajout en nutriments, quant à elle, semble démontrer qu'une opération de type cuvée serait plus efficace sur les rendements de l'ajmalicine (1,9X), de la

tabersonine (1.4X) et de la catharanthine (1.6X) que les modes cuvées alimentés.

Globalement, la présente étude a permis d'augmenter les rendements en bioréacteurs de 375%, soit de 7.2 à 27.3 mg gDW⁻¹. Elle a aussi permis de mieux comprendre la phase de production des métabolites secondaires et d'établir des pistes de recherches intéressantes pour la conception d'un bioprocédé de production de TIA par *Catharanthus roseus*.

ABSTRACT

Plants are an important source of bio-reactive molecules. Unfortunately, most plant based medicine (or drugs) are extracted directly from plants in very expensive processes. Plant cell suspension offers an alternative solution for the production of secondary metabolites. However, to this day, only a few secondary metabolite production bioprocesses using plant cell suspension are profitably operated. The low secondary metabolites productivity of the plant species studied is partially responsible for this phenomenon. The solution to this problem can be found by characterizing the production phase.

This MScA thesis presents a study of the secondary metabolites production phase including the study of the adsorbent phase as well as the nutritional and hormonal parameters. The Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) was chosen as the model species. This species is well known to the scientific community for its production of secondary metabolites having anti-carcinogenic and vasodilator properties.

Following different tests done on the adsorbent phase, various suggestions may be proposed regarding the establishment of an effective bioprocess. The use of the XAD-7 resin as an adsorbent phase in the bioprocess has a

superior effectiveness and its physical properties gives it a clear advantage in comparison with its competitors (XAD-4, XAD-16, XAD-761, XAD-1180, XAD-1600 and HP-2MG). The optimal delay of resin introduction depends on the inducers employed. With chitin, a delay between 3 to 5 hours after elicitation generates the best TIA yield (1.8 mg gDW^{-1}). As for methyl jasmonate, a delay between 5 minutes and 3 hours after the induction generates the best TIA yield (15.5 mg gDW^{-1}). In flasks, the effect of resin concentration shows that a concentration of 50 g L^{-1} of XAD-7 seems to be more efficient than concentrations of 100 to 200 g L^{-1} .

The effects of growth regulators on the production have also been studied. Contrary to NAA and BA, the presence of 2,4-D during the growth phase inhibits the accumulation of TIA in the cells without inhibiting the inductibility of these same cells.

The first nutritional parameter studied in this thesis is the influence of the carbon source used in the production phase. This experiment suggests that the use of sucrose increases the yield from 2.3 to 12.7 mg gDW^{-1} which is approximately five times that of the other sugars (glucose, fructose and maltose). According to a study on the influence of the concentration of the carbon source, the maximum production rates and the maximum yields of ajmalicine, tabersonine and tryptamine, follow a sigmoid trend as a function

of the concentration of glucose sugar. A concentration of glucose between 30 and 60 g L⁻¹ favours the tabersonine and ajmalicine yields.

The bioreactor experiments also allowed determination of the length of the production period. The production of TIA is primarily done in the first four to six days after the induction. Many hypotheses are proposed to explain this stop in production. First, the presence of phosphate limitations is not ruled out. Second, the presence of one or many inhibitors may also be the cause of the production stop. This inhibitor could be a TIA or else could be a molecule produced during the inhibition reaction of the secondary metabolite. Finally, the exhaustion of the precursor could also explain a decrease in production. A shortage of secologanine could inhibit the strictosidine formation and consequently the formation of all other TIA.

The addition of phosphate (0.3mM) in the production phase did not show any effect on the production rate or the TIA yields. The nutrient adding strategy seems to demonstrate that a batch mode type operation would be more efficient on the yields of ajmalicine (1.9X), tabersonine (1.4X) and catharanthine (1.6X) rather than the two fed-batch type operation that were used in this work.

Globally, the present study has permitted an increase in bioreactor yields from 7.2 to 27.3 mg gDW⁻¹, which is a 375% increase. Also, this study enhanced the knowledge we have of the production phase of the secondary metabolites and offered interesting research avenues for the design of a TIA production bioprocess by *Catharantus roseus*.

TABLE DES MATIERES

DÉDICACE	IV
REMERCIEMENTS.....	V
RESUME	VII
ABSTRACT.....	XI
TABLE DES MATIÈRES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX	XIX
LISTE DES FIGURES	XX
LISTE DES ANNEXES.....	XXIV
NOMENCLATURE.....	XXV
1. INTRODUCTION	1
1.1. Problématique	1
1.2. Objectifs de recherche.....	3
1.3. Méthodologie	3
2. REVUE DE LITTÉRATURE	6
2.1. Métabolisme secondaire.....	6
2.1.1. Classification des métabolites.....	7
2.1.2. Chemins métaboliques de <i>Catharanthus roseus</i>	9
2.1.3. Compartimentation de la biosynthèse des TIA.....	19
2.1.4. Induction du métabolisme secondaire	20
2.1.4.1. Élicitation	20
2.1.4.2. Autres types d'induction.....	22

2.1.4.3.	Stimulation en dirigeant le transport des métabolites secondaire	23
2.2.	Techniques de récupération des métabolites secondaires	25
2.2.1.	<i>In situ</i>	26
2.2.1.1.	Perméabilisation des membranes cellulaires	26
2.2.1.2.	Système à deux phases liquide / liquide	27
2.2.1.3.	Système à deux phases solide / liquide	30
2.2.2.	<i>Ex situ</i>	34
2.2.3.	Récupération des TIA de <i>Catharanthus roseus</i>	35
2.2.4.	Caractéristiques des résines polymérique étudiées	37
2.3.	Paramètres hormonaux et nutritionnels	40
2.3.1.	Effet des régulateurs de croissances	40
2.3.2.	Effet de la source de carbone	42
2.3.2.1.	Effet du type de sucre	42
2.3.2.2.	Effet de la concentration de sucre	44
2.3.3.	Effet des autres nutriments	46
2.3.4.	Effet d'un maintien des concentration en nutriments durant la phase de production	48
3.	MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE	49
3.1.	Résultats et maintien de suspensions cellulaires	49
3.2.	Culture en flacons	50
3.3.	Culture en bioréacteur de 4 L	51
3.4.	Culture mixte	54
3.5.	Conditions d'opération	54
3.5.1.	Cuvée en production	55
3.5.2.	Cuvée alimentée en production	55
3.6.	Échantillonnage	56
3.6.1.	pH	57
3.6.2.	Ions extracellulaires et intracellulaires	57

3.6.3.	Masse humide et masse sèche.....	59
3.6.4.	Alcaloïdes	59
3.7.	Production	61
3.7.1.	Milieu	61
3.7.2.	Inducteurs.....	62
3.7.2.1.	Méthyle Jasmonate.....	62
3.7.2.2.	Chitine.....	63
3.7.3.	Manutention de la résine.....	63
3.7.4.	Test d'adsorption des alcaloïdes sur la résine	64
3.7.5.	Calculs des rendements et des taux de production moyens.....	65
4.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	68
4.1.	Étude de la phase adsorbante.....	68
4.1.1.	Choix de la résine.....	69
4.1.1.1.	Adsorption de la vincamine	69
4.1.1.2.	Adsorption des alcaloïdes recherchés.....	71
4.1.1.3.	Efficacité des résines en culture.....	74
4.1.2.	Identification du temps d'ajout de la résine	80
4.1.2.1.	Problématique.....	80
4.1.2.2.	Délais d'ajout de la résine.....	83
4.1.3.	Effet de la concentration de l'adsorbant	90
4.2.	Régulateurs de croissances et nutriments.....	92
4.2.1.	Effet des régulateurs de croissance	93
4.2.2.	Effet du type de sucre.....	96
4.2.3.	Productivité en bioréacteur.....	99
4.2.4.	Cinétiques de production en fonction de la concentration de glucose	104
4.2.5.	Ajout de phosphate en production.....	113
4.2.6.	Comparaison de stratégies d'ajouts de nutriments.....	119
4.3.	Étude comparative.....	124

4.3.1. Comparaison des différentes expériences.....	124
5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	132
BIBLIOGRAPHIE.....	136
ANNEXES	159

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1 : CLASSIFICATION DES MÉTABOLITES SECONDAIRES.....	8
TABLEAU 2.2 : ÉLICITEURS DE CELLULES DE PLANTES	22
TABLEAU 2.3 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DE L'UTILISATION DES PHASES EXTRACTIVES.....	30
TABLEAU 2.4 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DE L'UTILISATION DES PHASES ADSORBANTES.....	33
TABLEAU 2.5 : PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DES RÉSINES ÉTUDIÉES	39
TABLEAU 2.6 : RÉGULATEURS DE CROISSANCE.....	40
TABLEAU 4.1 : PARAMÈTRES DE L'ÉQUATION SIGMOÏDALE POUR LES TAUX DE PRODUCTION MAXIMUM	108
TABLEAU 4.2 : PARAMÈTRES DE L'ÉQUATION SIGMOÏDALE POUR LES RENDEMENTS MAXIMUM	108
TABLEAU 4.3 : COMPARAISON DE CULTURES RÉALISÉES LORS DE DIFFÉRENTES EXPÉRIENCES.	127
TABLEAU 4.4 : COMPARAISON DE CULTURES RÉALISÉES LORS DE DIFFÉRENTES EXPÉRIENCES.	127
TABLEAU 4.5 : COMPARAISON DE CULTURES EN FLACONS RÉALISÉES DANS DIFFÉRENTES EXPÉRIENCES.	130
TABLEAU A.1 : COMPOSITION DE LA SOLUTION D'AJOUT D'AMONIUM.....	161
TABLEAU B.1 : COMPOSITION DU MILIEU DE PRODUCTION	163

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1 : VOIE DE SYNTHÈSE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE ET BIOSYNTHÈSE DE LA TRYPTAMINE.	11
FIGURE 2.2 : BIOSYNTHÈSE DE LA SÉCOLOGANINE	13
FIGURE 2.3 : BIOSYNTHÈSE DE LA VINDOLINE À PARTIR DE LA TABERSONINE..	16
FIGURE 2.4 : CHEMINS MÉTABOLIQUES DES TIA	18
FIGURE 2.5 : COMPARTIMENTATION DE LA BIOSYNTHÈSE DES TIA.....	19
FIGURE 2.6 : MÉCANISME RÉACTIONNEL DE L'ÉLICITATION.....	21
FIGURE 3.1 : BIORÉACTEUR DE 4L.....	53
FIGURE 4.1 : RÉCUPÉRATION DE LA VINCAMINE PAR DES RÉSINES POLYMÉRIQUES.....	70
FIGURE 4.2 : RÉCUPÉRATION À FROID DE LA TRYPTAMINE ET DES TIA PAR QUATRE RÉSINES POLYMÉRIQUES.	73
FIGURE 4.3: RENDEMENTS POUR LE TAMISAGE <i>IN VITRO</i>	75
FIGURE 4.4 : POURCENTAGE D'ADSORPTION DE LA TRYPTAMINE ET DES TIA SUR LES DIFFÉRENTES RÉSINES POUR LE TEST DE TAMISAGE <i>IN VITRO</i> . .	78
FIGURE 4.5 : ANALYSE DU MÉTHYLE JASMONATE.	81
FIGURE 4.6: ABSORPTION DU MÉTHYLE JASMONATE PAR LES CELLULES DANS LE MILIEU DE CULTURE.	82
FIGURE 4.7 : INFLUENCE DU TEMPS D'INTRODUCTION DE LA RÉSINE APRÈS INDUCTION SUR LES RENDEMENTS.....	86
FIGURE 4.8 : INFLUENCE DU TEMPS D'INTRODUCTION DE LA RÉSINE APRÈS ÉLICITATION SUR LES RENDEMENTS.....	88
FIGURE 4.9 : ÉVOLUTION DES RENDEMENTS EN PRÉCURSEURS ET DES TIA DANS LA BIOMASSE EN BIORÉACTEUR LORSQU'IL N'Y A PAS D'AJOUT DE RÉSINE.....	89
FIGURE 4.10: RENDEMENTS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE RÉSINE.....	91
FIGURE 4.11: RENDEMENTS EN FONCTION DES HORMONES DE CROISSANCE.	95
FIGURE 4.12: RENDEMENTS EN FONCTION DU TYPE DE SUCRE.	98
FIGURE 4.13: PROFILS DE PRODUCTION.	100

FIGURE 4.14: POURCENTAGE RELATIF DE CHACUN DES TIA LORS DE LA RÉCOLTE DU BIORÉACTEUR.	101
FIGURE 4.15 : PROFILS D'OD, DES DÉBITS GAZEUX ET DU TAUX DE TRANSFERT DU CO ₂	103
FIGURE 4.16: TAUX DE PRODUCTION MAXIMUM EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE.	106
FIGURE 4.17: RENDEMENT MAXIMUM EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE.	109
FIGURE 4.18 : PROFILS DES TAUX DE TRANSFERT DE CO ₂ POUR LES TROIS CONCENTRATIONS EN GLUCOSE.	111
FIGURE 4.19: CINÉTIQUE DE PRODUCTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE.	112
FIGURE 4.20: TAUX DE PRODUCTION MAXIMUM EN FONCTION DES STRATÉGIES D'AJOUTS DE PHOSPHATE.	115
FIGURE 4.21: RENDEMENTS MAXIMUM EN FONCTION DES STRATÉGIES D'AJOUT DE PHOSPHATE.	116
FIGURE 4.22: CINÉTIQUES DE PRODUCTION EN FONCTION DE LA STRATÉGIE D'AJOUT DE PHOSPHATE.	117
FIGURE 4.23 : PROFIL DE PHOSPHATE INTRACELLULAIRE	118
FIGURE 4.24: TAUX DE PRODUCTION MAXIMUM EN FONCTION DE LA STRATÉGIE D'AJOUT DE NUTRIMENTS.	121
FIGURE 4.25: RENDEMENTS MAXIMUM EN FONCTION DE LA STRATÉGIE D'AJOUT EN NUTRIMENTS	122
FIGURE 4.27 : COMPARAISON DES RENDEMENTS MAXIMUM EN BIORÉACTEURS ..	124
FIGURE 4.28 COMPARAISON DES RENDEMENTS MAXIMALES EN FLACONS	126
FIGURE 4.29 : COMPARAISON DES TAUX DE TRANSFERT DE CO ₂ POUR DIFFÉRENTES CULTURES.....	129

FIGURE C.1 : PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS : PREMIER TEST DE PRODUCTION EN BIORÉACTEUR.	165
FIGURE C.2 : PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS : MAINTIEN GLUCOSE 30 G L ⁻¹	166
FIGURE C.3 : PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS: MAINTIEN GLUCOSE 60 G L ⁻¹	167
FIGURE C.4: PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS: MAINTIEN GLUCOSE 90 G L ⁻¹	168
FIGURE C.5: PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS: AUCUN AJOUT DE PHOSPHATE.	169
FIGURE C.6: PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS: AJOUT DE PHOSPHATE 6,7 ET 8 ^E JOURS.	170
FIGURE C.7: PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS: AJOUT DE PHOSPHATE 8,9 ET 10 ^E JOURS	171
FIGURE C.8: PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS: CUVÉE.	172
FIGURE C.9: PARAMÈTRES DE CROISSANCE ET NUTRIMENTS EN FONCTION DU TEMPS: AJOUT PONCTUEL ET UNE POMPE DE NH ₄ ⁺	173
FIGURE D.1: PROFIL DE RESPIRATION POUR L'EXPÉRIENCES DE CONCENTRATION DE GLUCOSE : 30 G L ⁻¹	176
FIGURE D.2: PROFIL DE RESPIRATION POUR L'EXPÉRIENCES DE CONCENTRATION DE GLUCOSE : 60 G L ⁻¹	177
FIGURE D.3: PROFIL DE RESPIRATION POUR L'EXPÉRIENCES DE CONCENTRATION DE GLUCOSE : 90 G L ⁻¹	178
FIGURE D.4: PROFIL DE RESPIRATION POUR L'EXPÉRIENCES D'AJOUT DE PHOSPHATE : AUCUN AJOUT.....	179
FIGURE D.5: PROFIL DE RESPIRATION POUR L'EXPÉRIENCES D'AJOUT DE PHOSPHATE : AJOUTS AUX 6 ^E , 7 ^E ET 8 ^E JOURS.....	180

FIGURE D.6: PROFIL DE RESPIRATION POUR L'EXPERIENCES D'AJOUT DE PHOSPHATE : AJOUTS AUX 8 ^E , 9 ^E ET 10 ^E JOURS.....	181
FIGURE D.7 : PROFIL DE RESPIRATION ET CTR POUR LE BIORÉACTEUR CUVÉE..	182
FIGURE E.1 : IONS CL ⁻ ET NO ₃ ⁻ INTRACELLULAIRE POUR LES BIORÉACTEURS D'AJOUT DE PHOSPHATE	184
FIGURE E.2 : IONS SO ₄ ²⁻ , NA ⁺ ET NH ₄ ⁺ INTRACELLULAIRE POUR LES BIORÉACTEURS D'AJOUT DE PHOSPHATE.....	185
FIGURE E.3 : IONS K ⁺ , MG ²⁺ ET CA ²⁺ INTRACELLULAIRE POUR LES BIORÉACTEURS D'AJOUT DE PHOSPHATE	186

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A : COMPOSITION DE LA SOLUTION D'AJOUT D'AMMONIUM	160
ANNEXE B : COMPOSITION DU MILIEU DE PRODUCTION	162
ANNEXE C : MESURE DES NUTRIMENTS EXTRACELLULAIRES ET DES PARAMÈTRES DE CROISSANCES POUR LES EXPÉRIENCES EN BIORÉACTEURS	164
ANNEXE D : PROFIL DE RESPIRATION POUR LES EXPÉRIENCES EN BIORÉACTEURS	175
ANNEXE E : NUTRIMENTS INTRACELLULAIRES POUR L'EXPÉRIENCE D'AJOUT DE PHOSPHATE EN PRODUCTION.....	183

NOMENCLATURE

C_{HPLC}	Concentration en alcaloïdes dans l'échantillon HPLC	mg mL^{-1}
C_s	Concentration en glucose	g L^{-1}
CTR	Taux de transfert de du gaz carbonique de la culture vers les gaz de sortie	$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
DMO	Débit Massique d'Oxygène à l'entrée du bioréacteur	cc min^{-1}
DMTot	Débit Massique Total (Oxygène et air)	cc min^{-1}
DW	Masse de cellules sèche (Dry Weight)	g L^{-1}
$K_{s,p}$	Concentration d'inhibition du glucose	g L^{-1}
n	Exposant sigmoïdal	--
OD	Pourcentage d'oxygène dissous	%
P	Poids d'un extrait de résine, biomasse ou résine et biomasse	g
q_p	Taux de production	$\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$\overline{q_p}$	Taux de production (moyenne sur trois points)	$\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
q_p^{max}	Taux de production maximum obtenu pour une culture	$\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$\overline{q_p^{\text{max}}}$	Taux de production (moyenne sur trois points) maximum obtenu pour une culture	$\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$
V_{MeOH}	Volume de méthanol de l'extrait	L

WW	Masse de cellules humide	g L^{-1}
WWc	Concentration de l'extrait en biomasse, résine ou biomasse et résine	g L^{-1}
Y	Rendement de production	mg g^{-1}

1. INTRODUCTION

Le développement de nouveaux médicaments et de nouveaux principes actifs est le facteur ayant le plus contribué au développement de la médecine dans le siècle dernier. Par contre, la recherche de nouveaux médicaments se complexifie dramatiquement de sorte qu'une pénurie de nouveaux principes actifs guette l'industrie pharmaceutique. L'industrie de la biotechnologie s'est imposée, par son caractère multidisciplinaire, comme une solution aux problèmes des compagnies pharmaceutiques. La biotechnologie permet de diminuer l'écart entre la recherche académique et industrielle en apportant un niveau académique aux recherches industrielles.

1.1. Problématique

Les plantes sont une source de molécules bio-actives très importante. Plus d'une centaine de molécules d'origine végétale sont utilisées aujourd'hui comme produits pharmaceutiques. La plupart de ces médicaments sont extraits directement de la plante ou synthétisés chimiquement. Ces méthodes requièrent des procédés chimiques complexes qui sont très coûteux. Cependant, une nouvelle voie s'implante tranquillement dans la recherche de composés bio-actifs végétaux : la culture de cellule végétale en suspension. Cette technique permet de contrôler la croissance des cellules,

d'induire la production de métabolites secondaires et de récupérer les molécules biosynthétisées.

Par contre, à ce jour, peu de bioprocédés de production de métabolites secondaires par des suspensions cellulaires sont exploités de façon rentable. La faible productivité en métabolites secondaires des espèces végétales étudiées est partiellement responsable de ce phénomène. La résolution des problèmes de productivité pourrait passer par la caractérisation de la phase de production.

L'étude du métabolisme secondaire comporte plusieurs défis. Pour contourner certains de ces problèmes, la culture de *Catharanthus roseus* a été choisie comme système modèle. Cette espèce est bien connue de la communauté scientifique pour sa production d'alcaloïdes indoliques terpenoïques (TIA) ayant des propriétés vasodilatatrices et anti-cancérigènes. La croissance des cellules est relativement rapide et les voies de biosynthèse du métabolisme secondaire ont été déchiffrées. Ces caractéristiques en font une espèce parfaite pour le développement d'un bioprocédé modèle.

1.2. Objectifs de recherche

L'objectif général de ce projet est de caractériser la phase de production de façon à identifier les paramètres d'opération d'un bioprocédé efficace de production de métabolites secondaire. La réalisation de cet objectif passe par la compréhension de la biosynthèse des métabolites cibles de façon à augmenter leurs rendements. Trois objectifs spécifiques doivent être atteints afin de rencontrer l'objectif général. En premier lieu, une étude sur l'effet de la phase adsorbante lors de la période de production doit être exécutée. Cette étape est cruciale afin d'optimiser la récupération des métabolites et de diminuer les étapes subséquentes de purifications. En deuxième lieu, une étude sur l'effet des paramètres hormonaux et nutritionnels en production est nécessaire. Cet objectif permettra de déterminer certaines des conditions d'opération afin d'optimiser la production de métabolites secondaires. Finalement, une comparaison des rendements de chacune des expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire permettra d'apporter les conclusions globales sur l'apport des différents paramètres étudiés.

1.3. Méthodologie

Afin de répondre à l'objectif global de recherche, une revue de littérature adéquate est effectuée. Les principaux thèmes abordés dans cette revue sont le métabolisme secondaire, la récupération des métabolites

secondaires ainsi que les paramètres hormonaux et nutritionnels. Suite à cette revue, le détail de l'expérimentation est développé. Premièrement dans l'établissement des protocoles expérimentaux, puis en présentant les principaux résultats et conclusions de cette étude.

Suite à la revue de littérature, plusieurs expériences sont effectuées. La réalisation d'une étude sur l'effet de la phase adsorbante est la première étape afin de répondre aux objectifs spécifiques. Pour ce faire, trois étapes permettent d'établir un protocole optimal en ce qui a trait à l'utilisation de la phase adsorbante :

- Le choix de la phase adsorbante;
- L'identification du délai d'ajout de la résine;
- L'étude de l'effet de la concentration de la résine sur les rendements en TIA.

L'expertise de l'équipe de recherche de Phytobiotech inc. ainsi qu'une revue de littérature ont permis d'identifier une technique de récupération efficace pour les TIA. L'utilisation d'une résine polymérique *in situ* a été choisie pour cette étude. Sept résines (XAD-4, XAD-7, XAD,16, XAD-780, XAD-1180, XAD-1600 et HP-2MG) sont étudiées. Deux tests à froid sont effectués pour caractériser l'adsorption des TIA. Ensuite, l'effet des différentes résines est évalué lors d'une culture en flacons. La résine est choisie selon deux critères :

- L'efficacité d'adsorption des TIA;
- La facilité de manipulation.

La prochaine étape consiste à déterminer le délais optimal d'ajout de la résine suite à l'induction du métabolisme secondaire. Finalement, l'effet de la concentration de la résine sur la production est étudié.

L'étude de l'effet des hormones et des nutriments sur la production de TIA est abordée sous plusieurs angles. Premièrement, une étude de l'effet du type d'hormones utilisé en croissance sur la production est effectuée. Deuxièmement, l'effet du type de source de carbone et de la concentration en sucres sont étudiées. Finalement, l'effet de l'ajout de nutriments durant la période de production est expérimenté. Plusieurs tests sont réalisés dans cet optique. D'une part, l'effet de l'ajout de phosphate durant la période de production est examiné. D'autre part, une comparaison de différentes stratégies d'ajouts de nutriments est réalisée. Les différents tests sur les hormones et les nutriments permettent d'identifier certaines lignes de d'opération du bioprocédé.

Finalement, une comparaison des différents résultats en flacons et en bioréacteurs est effectuée. Cette approche est réalisée dans le but d'apporter des conclusions globales à l'étude.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

Une revue de littérature sur trois grands sujets a été effectuée dans le cadre de cette étude. Le premier sujet est le métabolisme secondaire. Cette section comprend une description de ce métabolisme, une classification des métabolites secondaires, la description des chemins métabolites et de leur compartimentation pour l'espèce étudiée ainsi qu'une description des phénomènes d'induction du métabolisme secondaire. Le second sujet traite des techniques de récupération des alcaloïdes. Les techniques appliquées *ex situ* et *in situ* sont décrites puis les techniques de récupérations spécifiques aux alcaloïdes de *Catharanthus roseus* sont énumérés. Enfin, le dernier sujet traite de l'influence des hormones et des nutriments durant la période de production.

2.1. Métabolisme secondaire

On entend par métabolisme primaire tous les procédés biochimiques nécessaires pour les activités normales d'anabolisme et de catabolisme. Ces activités comprennent l'assimilation, la respiration, le transport et la différenciation et sont communes à toutes les espèces de cellules végétales. Par opposition, le métabolisme secondaire engendre des molécules qui n'ont pas de fonction directe dans le métabolisme primaire des cellules et qui diffèrent grandement d'une espèce végétale à l'autre. Ces molécules, les

métabolites secondaires, ont un rôle important à jouer dans l'interaction de la plante avec son environnement. Le système immunitaire des plantes n'étant pas très développé, les métabolites secondaires ont un rôle protecteur très important. Cinq principales fonctions du métabolisme secondaire sont reconnues : la protection contre des attaques microbiennes, la protection contre des herbivores, la protection contre l'environnement (rayon UV, choc osmotique...), la production d'agents allomones (transmettent des signaux entre espèces) et l'attraction d'insecte pollinisateur et d'herbivores jouant un rôle dans la dispersion des graines (Spalding, M., 2002).

2.1.1. Classification des métabolites

Il est possible de classer les métabolites secondaires en trois grandes familles : les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés. Le Tableau 2.1 (adapté de Tikhomiroff, 2001) présente des exemples de métabolites secondaires appartenant à ces trois familles.

Tableau 2.1 : Classification des métabolites secondaires. (Adapté de Tikhomirow, 2001).

Familles	Sous-Familles	Exemples
Composés Phénoliques	Phénols simples	Carvacrol par <i>Monarda fistulosa</i> L.
	Hydroxybenzoates	4-hydrobenzoate dans plusieurs espèces
	Acetophenones	Picein par <i>Picea abies</i>
	Phenyl acetates	4-hydroxyphenylacetate par <i>Taxacum officinale</i>
	Hydroxycinnamates	Chlorogénate par les <i>Solanaceae</i>
	Phénylpropènes	Eugénol par <i>Eugenia Caryophyllata</i>
	Coumarines	Psoralen par <i>Petroselinum crispum</i>
	Chromones	Aloésine E par <i>Aloe Vera</i>
	Naphtoquinones	Shikonin par <i>Lithospermum erythrorhizon</i>
	Xanthones	Mangiférine par <i>Mangifera indica</i>
	Stilbenes	Resvératrol par <i>Arachis hypogaea</i>
	Anthraquinones	Emodine par <i>Rheum palmatum</i>
	Flavonoïdes	Rutine et anthocyanines dans plusieurs familles
	Lignanes	Pinosésinol par <i>Picea</i> et <i>Pinus</i>
	Biflavonoïdes	Amentoflavone dans les gymnospermes
	Catechol melanines	Polymères de naphthalène par <i>Daldinia concentrica</i>
	Tannins hydrolysables	Tannin chinois par <i>Rhus semialata</i>
Lignines	Lignines guaiacyl dans les gymnospermes	
Tannins condensés	Gallotannine par <i>Quercus robur</i>	
Isoprenoïdes	Monoterpénoïdes	Loganin et sécologanine par <i>Catharanthus roseus</i>
	Sesquiterpénoïdes	β -farnésène par <i>Fusarium sambucinum</i>
	Diterpénoïdes	Gibberellines dans toutes les plantes
	Triterpénoïdes	bryonolique acide par <i>Luffa cylindrica</i>
	Caroténoïdes	β -carotène dans <i>Daucus carota</i>
	Polyterpénoïdes	Caoutchouc dans <i>Hevea brasiliensis</i>
Composés azotés	Acides aminés non protéiques	Nopaline par <i>Arabidopsis thaliana</i>
	Amines	Tryptamine par <i>Catharanthus Roseus</i>
	Glucosides cyanogéniques	Amygdalin par <i>Prunus armeniaca</i>
	Glycosinolates	Glucocapparin par <i>Capparis rheedii</i>
	Alcaloïdes	Ajmalicine, tabersonine, catharanthine par <i>Catharanthus roseus</i>

2.1.2. Chemins métaboliques de *Catharanthus roseus*

Les métabolites secondaires biosynthétisés par *C. roseus* sont essentiellement des alcaloïdes indoliques terpenoïques (TIA). Ces molécules sont composées d'un noyau indole provenant de la tryptamine ainsi que d'un noyau terpène dérivant de la sécologanine.

La tryptamine est dérivée de la voie de synthèse de l'acide shikimique. Cette voie est présentée à la Figure 2.1. Ce chemin débute par la réunion de deux molécules : le phosphoénolpyruvate (PEP) provenant de la glycolyse et l'érythrose phosphate provenant de la voie des pentoses-phosphates). La molécule formée grâce aux enzymes DAHP synthase et 3-dehydroquinate synthase est l'acide dehydroquinique. La perte d'une molécule d'eau catalysée par l'enzyme dehydroquinate déhydrase suivi de l'ajout d'un hydrogène de NADH via l'enzyme shikimate deshydrogenase résultent en la formation de l'acide shikimique. Trois réactions, impliquant chacune une enzyme (shikimate kinase, enoylpyruvylshikimate phosphate synthase et chorismate synthase) vont permettre la formation de l'acide chorismique. Cinq autres réactions sont nécessaires à la formation du tryptophane. Ces réactions impliquent les enzymes suivantes : anthranilate synthetase, anthranilate phosphoribosyl transférase, phosphoribosylanthranilate isomérase, indole-3-glycerol phosphate synthase et tryptophane synthase. La décarboxylation du tryptophane est finalement

réalisée pour obtenir la tryptamine à l'aide de l'enzyme tryptophane décarboxylase (TDC) (De Luca et *al.*, 1989).

L'accumulation de la TDC peut être induite par les rayons UV (Ouwerkerk et *al.*, 1999b) et par une élicitation aux champignons (Ouwerkerk et *al.*, 1999a). Par contre, une surexpression de cette enzyme n'est pas nécessairement bénéfique pour l'augmentation de la productivité en TIA (Canel et *al.*, 1998).

La sécologanine est biosynthétisé à partir de l'isopenthényl diphosphate (IPP). Il est actuellement accepté que l'IPP puisse être dérivée de deux sources : la voie de biosynthèse du mévalonate et la voie des pentoses phosphate et du pyruvate (Contin et *al.*, 1998). La voie du mévalonate comprend plusieurs réactions enzymatiques requérant de l'ATP.

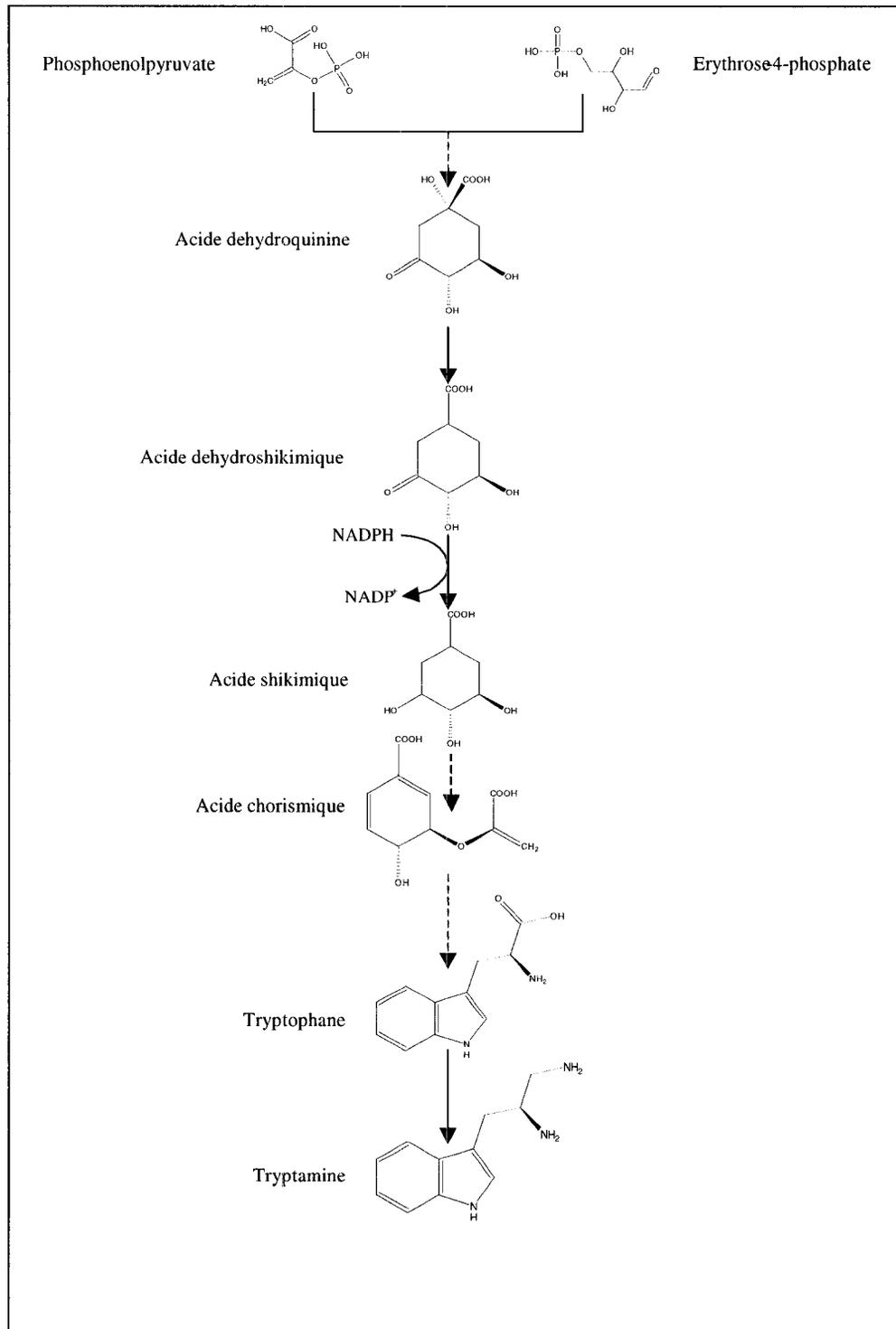


Figure 2.1 : Voie de synthèse de l'acide shikimique et biosynthèse de la tryptamine. ↓ : plusieurs réactions. Tiré de De Luca et *al.*, 1989.

La voie des pentoses phosphate et du pyruvate proposée par Contin et al. (1998), pointe le 1-deoxy-D-xylulose comme étant le précurseur de l'IPP. Le mécanisme complet de cette voie reste pour l'instant relativement incompris. Peu importe la provenance de l'IPP, il est ensuite transformé en géranyl pyrophosphate, en géraniol puis en 10-hydroxygéraniol à l'aide de l'enzyme géranyl-10-hydrolase (G10H). Cette enzyme semble être dépendante d'un cytochrome P450 (Collu et al., 2001). La transformation du 10-hydroxygéraniol en loganin requiert 5 réactions (Contin et al., 1998) comme indiqué à la Figure 2.2.

La strictosidine synthase (STR) permet la condensation de la tryptamine et de la sécologanine par une réaction de type Pictet-Spengler (Withmer et al., 2002). Cette réaction permet la formation de l'intermédiaire universel des TIA : la strictosidine. La strictosidine est donc le précurseur des trois types de TIA produit par *Catharanthus roseus* : coryanthe (ex : ajmalicine), iboga (ex : catharanthine) et pluméra (ex : vindoline). L'expression de STR peut être induite par l'ajout d'éliciteur fongique (Pasquali et al., 1992), un messenger secondaire (i.e : acide jasmonique) (Menke et al., 1999) ou par un traitement aux rayons UV (Ouwerkerk et al., 1999). De plus, sa surexpression paraît bénéfique à l'augmentation de production des TIA (Canel et al., 1998).

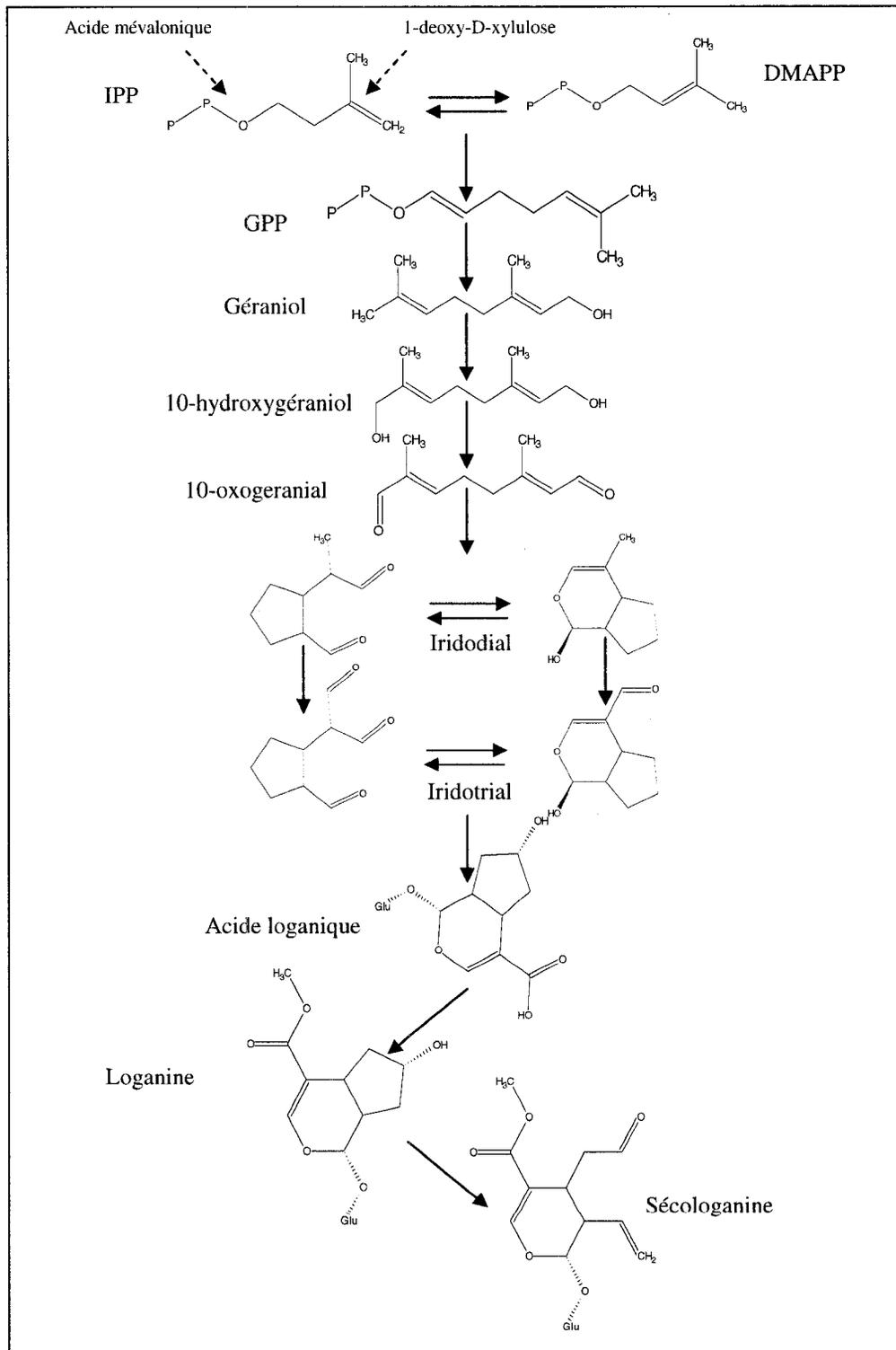


Figure 2.2 : Biosynthèse de la sécologanine. IPP : isopentényl diphosphate; DMAPP : diméthylallyl diphosphate; GPP : géranyl diphosphate. (Adapté de Contin

et al., 1998 et Tickhomiroff, 2001).

La strictosidine est ensuite transformé en 4,21-dehydrogeissoschizine un alcaloïde pivot précurseur de quatre chemins métaboliques dont deux sont interreliés. En fait, le 4,21-dehydrogeissoschizine est instable et forme un complexe de trois molécules très semblables qui sont le véritable point de départ. Les deux autres molécules sont la cathénamine et l'épécathénamine. La cathénamine engendre l'ajmalicine qui peut s'oxyder en serpentine. La cathénamine peut aussi donner naissance à une autre branche métabolique par l'akuammidine. Cette branche peut aussi être initiée par la stemmadénine, dérivant de la 4,21-deshydrogeissoschizine, ensuite transformée en sécodine. Les autres alcaloïdes de cette branche sont la vindolinine résultant d'une réaction de la sécodine ou de la akuammidine et la périvine découlant de l'akuammidine. Le dernier chemin métabolique dérivant ce complexe est la transformation de l'épécathénamine en tétrahydroalstonine puis en alstonine (Verpoorte et al., 2002). La biosynthèse de la tabersonine s'initie à partir de la stemmadénine grâce à un mécanisme encore inconnu aujourd'hui. La tabersonine subit une série de 5 réactions incluant une hydroxylation à C-16, une 16-O-méthylation, une hydratation du double lien entre les carbones en position 2 et 3, une N-méthylation, une hydrolation du carbone 4, et une 4-O-acétylation (De Luca et al., 1986) pour obtenir la vindoline (Figure 2.3). Plusieurs enzymes impliquées dans ces réactions ont été caractérisées. Il y a, tout d'abord, l'enzyme O-méthyl transférase (OMT) catalysant la deuxième réaction (Fahn

et *al.*, 1985), puis la O-acétyl transférase (DAT) pour la dernière réaction (De Luca et *al.*, 1985). Deux ans plus tard, la N-méthyl transférase (NMT) a été identifiée pour la catalyse de la quatrième réaction menant à la vindoline (De Luca et *al.*, 1987). La même année, la désacétoxyvindoline 4-hydrolysase (D4H), une 2-oxoglutarate-dépendante dioxygénase a été identifiée (De Carolis et *al.*, 1990) comme enzyme permettant la cinquième réaction de ce chemin. La première enzyme nécessaire, la tabersonine 16-hydroxylase (T16H) a quant à elle été caractérisée en 1995 par St-Pierre et De Luca. Ces réactions requièrent au moins deux différents types de cellules (St-Pierre et *al.*, 1999), ce qui pourrait expliquer pourquoi la vindoline est très rarement observée lors de culture de cellule en suspension. Certains auteurs affirment tout de même avoir obtenu une faible quantité (entre 0.015 et 0.19 mg/gDW) de cet alcaloïde lors de culture *in vivo* (O'Keefe et *al.*, 1997; Zhao et *al.*, 2001b).

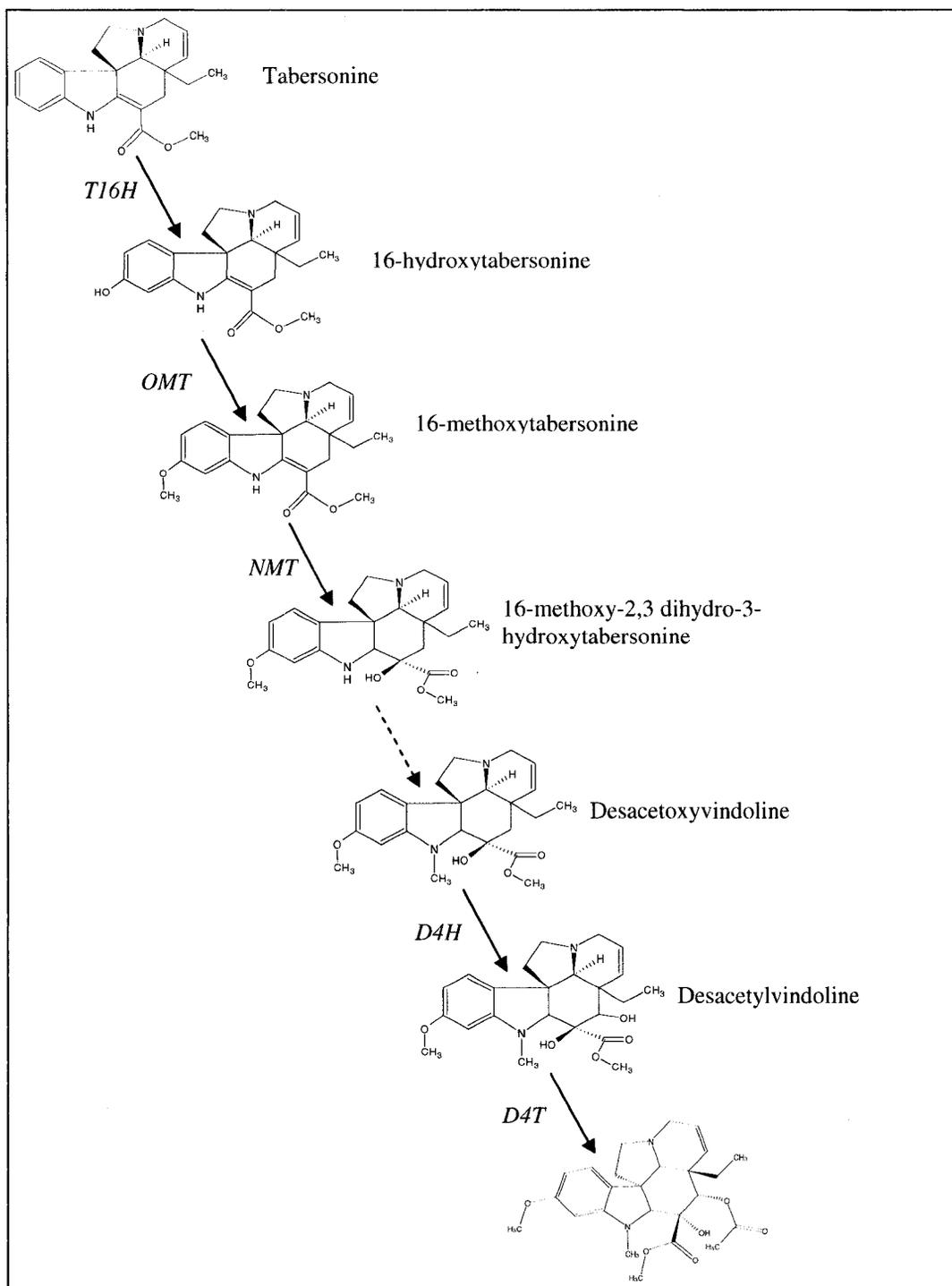


Figure 2.3 : Biosynthèse de la vindoline à partir de la tabersonine. T16H : tabersonine 16-hydroxylase; OMT : O-méthyl transférase; NMT : N-méthyl transférase; D4H : désacétoxyvindoline 4-hydrolyase; D4T : O-acétyl transférase. ↓ : mécanisme connu; ↓ : mécanisme inconnu.

La tabersonine est aussi un intermédiaire menant à la formation de la lochnéricine et de l'horhaméricine. Les mécanismes permettant ces réactions sont toutefois encore inconnus (Rijhwani et Shanks, 1998).

La catharanthine est elle aussi dérivée de la stemmadenine. Elle est ensuite condensée avec la vindoline grâce à une peroxydase (Sottomayor et *al.*, 1998) pour donner l'intermédiaire iminium puis la vinblastine et la vincristine. La Figure 2.4 présente une vue d'ensemble du mécanisme des TIA.

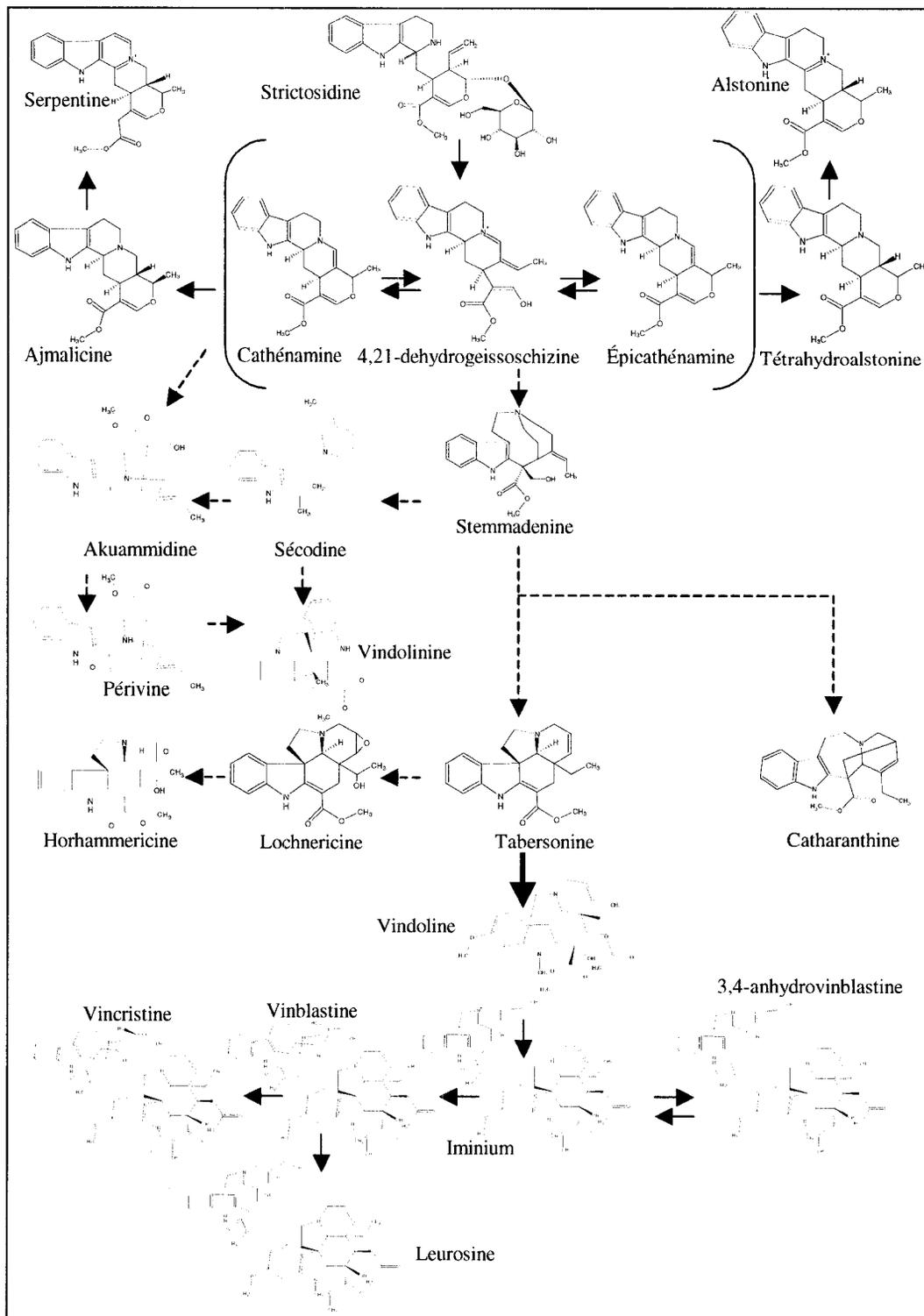


Figure 2.4 : Chemins métaboliques des TIA. ↓ : mécanisme connu; ↓↓ : mécanisme inconnu; ↓↓ : plusieurs étapes

2.1.3. Compartimentation de la biosynthèse des TIA

La biosynthèse des TIA est complexe sous plus d'un aspect. Aux voies métaboliques complexes se rajoute une compartimentation des réactions dans la cellule (Verpoorte et al., 1999; Verpoorte et al., 2000) telle qu'illustrée à la Figure 2.5

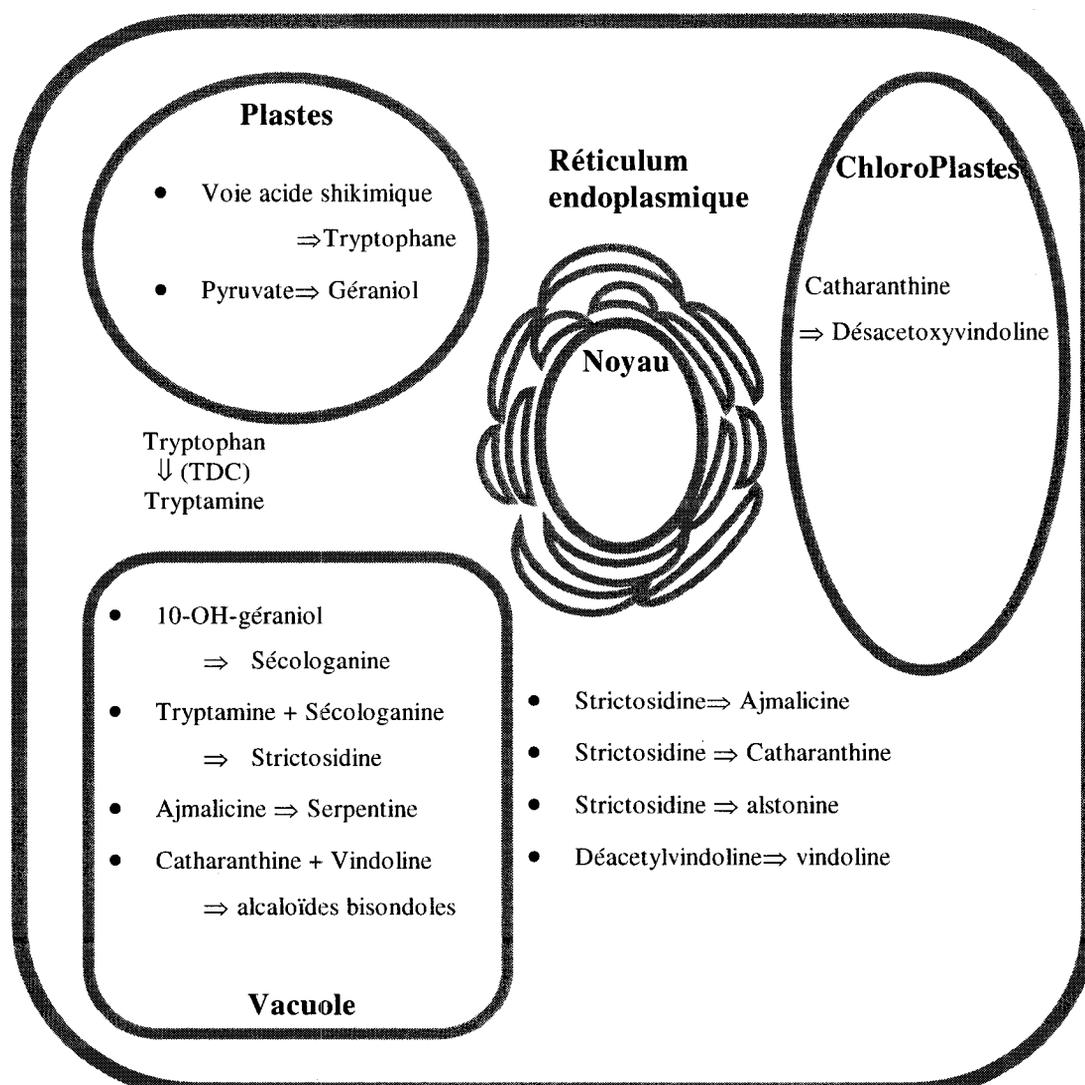


Figure 2.5 : Compartimentation de la biosynthèse des TIA. (Adapté de Verpoorte et al., 1999 et 2000).

2.1.4. Induction du métabolisme secondaire

La recherche sur l'induction du métabolisme secondaire remonte au début des années 1970. À cette époque, la communauté scientifique travaille sur l'activation de la biosynthèse de phytoalexines à l'aide de petites molécules de polysaccharides et de protéines placées autour d'un site d'infection (Radman et *al.* 2003). Depuis ce temps, les recherches ont permis de mieux comprendre le mécanisme de défense des plantes et de cibler plusieurs molécules pouvant activer ce mécanisme.

2.1.4.1. Élicitation

On nomme éliciteur toute molécule qui induit le mécanisme de défense complet de la cellule (Radman et *al.*, 2003) (Figure 2.6). Ceux-ci peuvent être classifiés selon leur provenance (biotique ou abiotique) et selon leur composition (complexe et définie). Le Tableau 2.2 montre un aperçu des éliciteurs utilisés sur les cellules de plantes. On y trouve aussi les types d'éliciteurs utilisés dans la littérature pour l'espèce *Catharanthus roseus*.

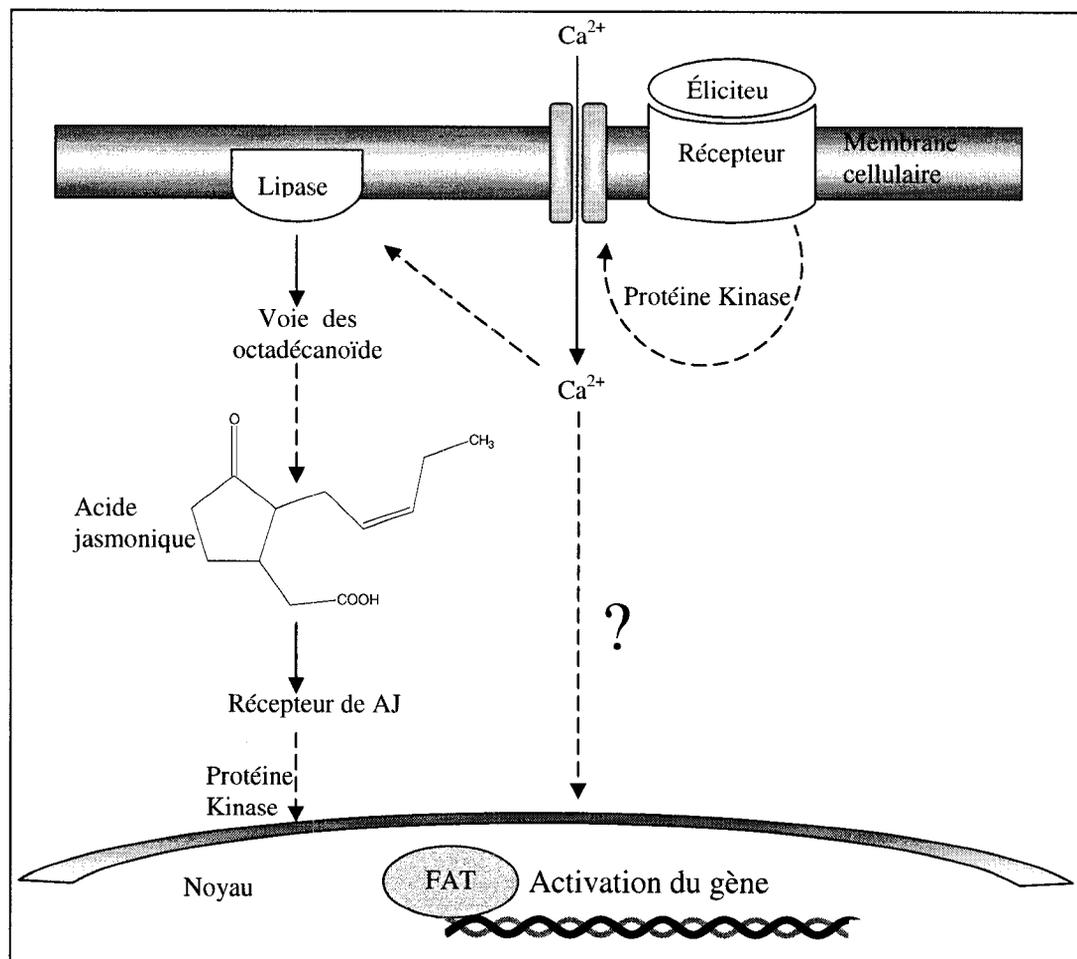


Figure 2.6 : Mécanisme réactionnel de l'élicitation (adapté de Memelink et al, 2001). \dashv : plusieurs étapes. FAT : facteur d'activation de transfert.

Tableau 2.2 : Éliciteurs de cellules de plantes (adapté de Radman et al., 2003)

Éliciteurs				Références de <i>Catharanthus roseus</i>	
Abiotique	Ions métalliques (lanthanum, césium, Yttrium, argent, cadmium), oxalate...			Zhao et al., 2000b	
Biotique	Composition Complexe	Spores de champignons, membrane cellulaire de levures et de micelles		Asada et al., 1989 Sim et al., 1994a Zhao et al., 2001d Namdeo et al., 2002	
	Composition définie	Carbohydate	Polysaccharide	Alginate LBG Pectin Chitosan Chitine Gomme de guar	Aoyagi et al., 1998
			Oligosaccharide	Mannuronate Guluronate Mannana Galacturonide	--
		Protéique	Peptide	Glutathione	--
			Protéine	Cellulase Elicitrine Oligandrin	Rijhwani et al., 1998 Contin et al., 1999
			Lipide	Lipopolysaccharide	--
		Glycoprotéine	Non caractérisé		--
		Volatile	C6-C10		--

2.1.4.2. Autres types d'induction

Le choc osmotique est un stress physique qui est réputé pour son effet inducteur (Godoy-Hernandez et al., 2000; Zhao et al., 2000c,d; Kim et al., 2001; Zhao et al., 2001f). L'effet de l'ajout de mannitol à une concentration de 250 mM augmente la production d'ajmalicine de 4 fois pour atteindre

42.3 mg L⁻¹ (Zhao et al., 2001f). En ce qui a trait à la catharanthine, un ratio de 4 fois la production sans inducteur été obtenu avec le sodium alginate 1.5% v/v (Zhao et al., 2000c). L'ajout de messenger secondaire peut aussi permettre l'induction du métabolisme secondaire. Sans être considéré comme des éliciteurs, les messagers secondaires comme les jasmonates ou l'acide linoléiques (voie des octadécanoïdes) peuvent induire la production de métabolites secondaires (Memelink et al., 2001). Plus spécifiquement, plusieurs études prouvent l'influence positive du méthyle jasmonate sur la production de taxanes (Mirjalili et al., 1996; Furmanowa et al., 1997; Ketchum et al., 1999; Phislapong 1999; Luo et al., 2001). L'induction des TIA par ce messenger secondaire est aussi rapportée (Dymov et al., 1997; Vasquez-Flota et al., 1998,; Morgan et al., 1999; Van der Fitz et al., 2000; Vasquez-Flota et al., 2002).

2.1.4.3. Stimulation en dirigeant le transport des métabolites secondaire

Les chemins métaboliques secondaires sont aussi influencés par l'application du principe d'équilibre des réactions. En effet le principe de Le Châtelier stipule que :

« Si une réaction chimique à l'équilibre est sujette à une modification de certains paramètres qui fait que celle-ci est déplacée par rapport à sa position d'équilibre, il s'en suit que ladite réaction cherche à se réajuster à un nouvel état

d'équilibre. La réaction évolue dans la direction qui –au moins en partie- contrebalance la modification imposée.»

Henri Le Châtelier

Plusieurs auteurs ont appliqué ce principe par l'ajout de précurseurs afin de pousser les réactions vers les produits. Ce phénomène a été utilisé afin de promouvoir la production de taxanes et en particulier du taxol (Srinivasan et al., 1996; Yuan et al., 2001). La stimulation des alcaloïdes terpenoïdes indoliques biosynthétisés par *Catharanthus roseus* a aussi été effectuée par l'ajout de précurseurs (Moreno et al., 1993; Contin et al., 1999). Malheureusement le succès de cette méthode est quelque peu mitigé. En effet, le coût onéreux des précurseurs ainsi que la complexité des flux métaboliques augmentent la difficulté des recherches dans ce sens.

L'ajout d'inhibiteur de certaines voies métaboliques s'inscrit aussi dans ce genre de stimulation. Dans plusieurs publications, Zhao et al., rapportent un effet positif d'inhibiteur de peroxydase comme le tétra méthyle ammonium bromide (Zhao et al., 2000d, 2001e,f).

Plusieurs auteurs appliquent le principe de Le Châtelier avec une toute autre méthode. Effectivement, au lieu de pousser les réactions vers les produits en ajoutant des précurseurs ou en inhibant d'autres voies métaboliques, ils créent une rareté de produits en permettant la sécrétion des métabolites secondaires. La perméabilisation ainsi que l'ajout d'une phase extractive

(*ex* ou *in situ*) sont de bons exemples de méthodes pouvant rediriger les flux métaboliques (Brodellius et Pedersen, 1993). Les détails de ces méthodes sont présentés dans la prochaine section.

2.2. Techniques de récupération des métabolites secondaires

Les plantes emmagasinent généralement les métabolites secondaires dans les vacuoles. De faibles niveaux de métabolites peuvent être observés dans le milieu dus au relargage de ceux-ci ou à la lyse cellulaire (Choi et *al.*, 2001). Dans certains cas un transport actif permet aux plantes de réguler les concentrations extra et intracellulaire en réponse à divers stimuli (Byun et *al.*, 1990). Il est possible de modifier l'équilibre déterminé par la cellule grâce à différentes techniques de récupération des métabolites secondaires.

Les techniques de récupération des métabolites ont beaucoup été étudiés depuis les 20 dernières années. La première raison est le fait que plusieurs auteurs rapportent que ces techniques augmenteraient les rendements en produits d'intérêts (Kurata et *al.*, 1993; Corry et *al.*, 1993). La seconde raison est qu'une récupération efficace des métabolites pendant la culture facilite les étapes ultérieures de séparation et de purification dans le bioprocédé. Comme les rendements de ces étapes sont généralement assez bas et que

les coûts sont au contraire assez élevés, beaucoup d'efforts sont investis pour améliorer la récupération à la source.

2.2.1. *In situ*

La récupération des métabolites *in situ* est la technique majoritairement utilisée. Elle est donc abondamment présente dans la littérature. Cette technique peut être divisée en trois classes : la perméabilisation des membranes cellulaires, les systèmes à deux phases liquides et les systèmes à deux phases liquide/solide. La perméabilisation cellulaire mise sur la libération mécanique des produits intracellulaires. Les systèmes à deux phases, quant à eux, misent sur l'atteinte d'un équilibre dépendant des propriétés physico-chimiques de la seconde phase.

2.2.1.1. Perméabilisation des membranes cellulaires

Une perméabilisation ou une altération des membranes cellulaires permet la sécrétion des produits dans le milieu de culture et en facilite ainsi la récupération. Plusieurs méthodes sont rapportées dans la littérature : le choc osmotique (Tanaka et *al.*, 1985), un changement de pH (Bouyssou et *al.*, 1987), l'électroporation (Brodelius et *al.*, 1988), l'iontophoresis (Pu et *al.*, 1989) et l'utilisation de solvant organique (Brodelius et *al.*, 1983; Felix et *al.*, 1981). Un des solvants organiques les plus efficaces est le diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui a été utilisé pour plusieurs espèces végétales dont *Chinchona*

ledgeriana (Parr et al., 1984), *Coleus Blumei* (Park et Martinez, 1992), *Chenopodium robrum* (Brodelius et Pedersen, 1993), *Thalictrum rugosum* (Brodelius et Pedersen, 1993), *Lithospermum erythrorhizon* (Sim et al., 1994) et *Catharanthus roseus* (Sim et al., 1994a). Par contre, plusieurs de ces méthodes affectent la viabilité des cellules et ne peuvent donc pas être utilisées dans un procédé en continu.

2.2.1.2. Système à deux phases liquide / liquide

Plusieurs phases lipophiliques liquides ont été testées expérimentalement avec succès dans les années 90 et cela, sur plusieurs types de métabolites secondaires. L'ajout de la phase extractive permet non seulement la récupération des composés ciblés mais aussi une augmentation de leur production totale. L'effet de l'hexadécane sur la production de shikonin, une naphthoquinone produite par *Lithospermum erythrorhizon*, a été étudié (Kim et Chang, 1990a,b,c; Sim et al., 1994b). Une augmentation maximale du taux de production de 7,4 fois a été observé par Kim et Chang (1990c). L'hexadécane est aussi connu pour son effet positif sur la récupération des monoterpènes produits par *Thuja occidentalis* (Berlin et Witte, 1987). L'extraction des alcaloïdes par des trappes lipophiliques a aussi été testée. L'huile de silicone permet une augmentation de la production d'alcaloïdes benzophenanthridines par *Eschscholtzia californica* d'un facteur de 3,4 par rapport au contrôle (Byun et al., 1990). La sanguinarine peut aussi être

extraite de façon efficace par un dérivé du glycérol, le tricapylin (Dutta et *al.*, 1994).

Plusieurs phases extractives ont un effet sur la récupération et la production de taxanes. Une légère augmentation de la production de paclitaxel produit par *Taxus brevifolia* a été réalisée grâce à l'ajout de tricapylin entre 5-15% v/v (Collins-Pavao et *al.*, 1996). La comparaison des solvants hexadécane, décanol et dibutylphthalate apporte plusieurs conclusions (Wang et *al.*, 2001). Les trois solvants stimulent la récupération et les rendements du taxol. Le plus efficace est le dibutylphthalate à une concentration de 10% v/v qui produit une augmentation de 2 fois le standard. Une augmentation de paclitaxel de 3 fois le contrôle a été observée avec *Taxus chinensis var. marei* avec l'acide oléique par Yuan et *al.* (2001). L'acide oléique a été comparé à deux autres solvants (le terpinéol et le dibutylphthalate) lors d'une étude menée par Zhang et *al.* (2001). Chacun de ces solvants augmente la production du taxol; le dibutylphthalate et l'acide oléique par un facteur 4 et le terpinéol par un facteur 4.5. Un mélange de terpinéol et d'acide oléique est utilisé pour obtenir les plus hautes augmentations (50X) permettant une concentration en taxol finale de 27 mg/L (Zhang et *al.*, 2001).

Une action synergique de la phase d'extraction liquide avec un éliciteur est parfois rapportée (Zhang et *al.*, 2001,). Le même phénomène se produit lors de la combinaison d'une phase extractive et d'une immobilisation au calcium alginate (Kim et *al.*, 1990c).

Plusieurs hypothèses sont proposées dans la littérature pour expliquer le fait que l'ajout d'une phase adsorbante augmente, non seulement la récupération mais également les rendements en métabolites secondaires. Une de ces hypothèses énonce la possibilité que la phase extractive agisse comme un puits métabolique et de ce fait, augmente les rendements en produits (Kim et Chang, 1990c; Collins-Pavao et *al.*, 1996; Tikhomiroff et *al.*, 2002). Une autre explication est que la phase extractive diminue l'inhibition du métabolisme par les produits (Brodelius et Pedersen 1993; Freeman et *al.*, 1993). Une diminution de la dégradation intra et extracellulaire pourrait aussi expliquer le phénomène (Kim et Chang, 1990c; Freeman et *al.*, 1993; Brodelius et Pedersen 1993). Finalement, l'extraction d'autres molécules inhibitrices par le solvant est aussi une hypothèse proposée (Kim et Chang, 1990c).

Malheureusement, il existe plusieurs inconvénients lors de l'utilisation *in situ* de solvants extractifs. En effet, ces solvants ne permettent pas de bon transfert de matière provenant du milieu extracellulaire et la manipulation de

ces solvants est laborieuse (Williams et al., 1992). Finalement, de larges quantités de solvant doivent être évaporés afin de récupérer les produits (Berlin et Witte, 1988).

Un tableau récapitulatif de l'utilisation des phases extractives peut être visualisé au tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Tableau récapitulatif de l'utilisation des phases extractives

Phase extractive	Espèce	Références
Hexadécane	<i>Lithospermum erhythrorhizon</i>	Kim et Chang, 1990a,b,c Sim et al., 1994b
	<i>Thuja occidentalis</i>	Berlin et Witte, 1987
	<i>Taxus chinensis</i>	Wang et al., 2001
Huile de silicone	<i>Eschscholtzia californica</i>	Byun et al., 1990
	<i>Catharanthus roseus</i> ¹	Tikhomiroff et al., 2002
Tricaprylin	<i>Eschscholtzia californica</i>	Dutta et al., 1994
	<i>Taxus brevifolia</i>	Collins-Pavao et al., 1996
Décanol	<i>Taxus chinensis</i>	Wang et al., 2001
Dibutylphthalate	<i>Taxus chinensis</i>	Wang et al., 2001 Yuan et al., 2001
Acide oléique	<i>Taxus chinensis</i>	Yuan et al., 2001
Terpineol	<i>Taxus chinensis</i>	Yuan et al., 2001

2.2.1.3. Système à deux phases solide / liquide

Plusieurs adsorbants ont été examinés pour leur potentiel à augmenter les rendements en métabolites secondaires. Certains adsorbants sont ajoutés

¹ Voir section 2.4.3

librement au milieu de culture (Robins et Rhodes, 1986; Berlin et Witte, 1988; Williams et *al.*, 1992) et d'autres dans un sac (Rhodes et *al.*, 1986; Green et *al.*, 1991; Kwon et *al.*, 1998; Komaraiah et *al.*, 2003).

En sachet, de petites augmentations de productions (jusqu'à 70%) d'alcaloïdes cinchona ont été observées pour les résines Amberlite XAD-4, XAD-7, IRA-958, IRA-458 et Amberlyst A-26 (Rhodes et *al.*, 1986). La résine Amberlite XAD-4 a démontrée un effet sur la promotion de l'accumulation extracellulaire de la nicotine par *Nicotiana rustica* (Rhodes et *al.*, 1986). Lors d'une étude comparative entre les résines XAD-4 et XAD-7 sur la production de nicotine par *Nicotiana glauca*, la plus efficace s'est avérée être XAD-4 (Green et *al.*, 1991). La résine XAD-4 s'est aussi révélée efficace pour l'augmentation de la production du Taxol par *Taxus cuspidata* (Kwon et *al.*, 1998). Un effet synergique des sachets de résine Amberlite XAD-7 avec une élicitation et une immobilisation a été observé sur la production de plumbagin par *Plumbago rosea* (Komaraiah et *al.*, 2003). L'utilisation de sachets facilite la récupération de la phase adsorbante mais les cinétiques d'adsorption sont faibles dû au manque de surface de contact entre les cellules et l'adsorbant (Rhodes et *al.*, 1986).

L'ajout de XAD-2, de XAD-4, de XAD-7, de mousse de polyether de type D ou de mousse T60 filtren à une culture de *Cinchona ledgeriana* démontrent

que ces adsorbants ont tous un effet favorable sur la productivité en anthraquinone (Robins et Rhodes, 1986). Entre toutes, la résine XAD-7 se révèle être la plus efficace. L'utilisation de résine polymérique est positive sur la production de plusieurs autres métabolites secondaires. La production et la sécrétion de mono et diterpénoïdes par l'espèce *Thuja occidentalis* se trouvent grandement améliorée par l'ajout de XAD-2 (Berlin et Witte, 1988). Une étude réalisée par Galipeau (2001) démontre que la résine XAD-16 est efficace pour augmenter la production de taxanes par *Taxus canadensis*. Une étude complète de l'effet des résines polymériques sur la production de sanguinarine par *Papaver somniferum* révèle que la résine XAD-7 est considérablement plus efficace que la résine XAD-4 (Williams et al., 1992). Cette étude relate aussi une influence de la concentration en résine sur la production en culture. Il en résulte une meilleure production lorsque 50 g L⁻¹ de résine sont ajoutés en comparaison à 100 et 200 g L⁻¹. De plus, les recherches de ce groupe démontrent une efficacité supérieure des résines polymérique par rapport à l'huile de silicone.

Les mêmes hypothèses de puits métabolique (Robins et Rhodes, 1986; Williams et al., 1992), d'inhibition du métabolisme par les produits (Robins et Rhodes, 1986; Green et al., 1991), et de dégradation (Rhodes et al; 1986) peuvent expliquer l'efficacité des résines et autres phases adsorbantes.

Un procédé utilisant des résines polymériques comporte certains avantages. En plus de démontrer une plus grande efficacité pour l'augmentation de la production ces résines sont très faciles à manipuler (Williams et al., 1992). De plus, il est possible de désorber les produits dans un volume très petit de solvant facilitant ainsi les étapes ultérieures de récupération (Berlin et Witte, 1988).

Le Tableau 2.4 récapitule l'utilisation des résines polymériques.

Tableau 2.4 : Tableau récapitulatif de l'utilisation des phases adsorbantes

Phase extractive	Espèce	Références
XAD-2	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Robins et Rhodes, 1986
	<i>Thuja occidentalis</i>	Berlin et Witte, 1988
	<i>Catharanthus roseus</i> ²	Sim et al., 1994a
XAD-4	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Rhodes et al., 1986
	<i>Nicotiana rustica</i>	Rhodes et al., 1986
	<i>Nicotiana glauca</i>	Green et al., 1991
	<i>Papaver somniferum</i>	Williams et al., 1992
	<i>Catharanthus roseus</i> ²	Sim et al., 1994a
XAD-7	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Rhodes et al., 1986
	<i>Nicotiana rustica</i>	Rhodes et al., 1986
	<i>Nicotiana glauca</i>	Green et al., 1991
	<i>Papaver somniferum</i>	Williams et al., 1992
	<i>Catharanthus roseus</i> ²	Payne et al., 1988 Asada et Shuler, 1989 Sim et al., 1994a Lee-Parsons et Shuler, 2002
XAD-16	<i>Taxus canadensis</i>	Galipeau, 2001

² Voir section 2.4.3

2.2.2. *Ex situ*

Quoi que moins populaire que les techniques *in situ*, l'ajout d'un agent extractif à l'extérieur de l'enceinte de la culture est utilisé par quelques auteurs. Une phase extractive ou adsorbante, extérieure à la culture, peut être efficace pour la récupération du paclitaxel et pourrait permettre une production à grande échelle (Seki et Furusaki, 1996).

Kurata et *al.* (Kurata et *al.*, 1993), rapportent que l'utilisation d'une méthode *in situ* n'augmente pas la production d'alcaloïdes de *Coffea arabica*. Selon eux, l'adsorption des hormones ou d'autres composés essentiels par les résines hydrophobiques serait responsable de cet échec. La mise en place d'une colonne d'adsorption externe ainsi que l'ajout de milieu frais ont permis une augmentation de production de caféine d'environ 140%.

L'ajout d'une phase extractive sous forme de solvant organique est efficace pour la récupération de solavétinone produite par *Hyoscyamus muticus* (Corry et *al.*, 1993). L'hexane est utilisé comme phase extractive. Une boucle de recirculation du milieu extracellulaire permet la mise en contact avec la phase extractive. À des fins de comparaisons, des colonnes de XAD-7 et 16 ont été utilisées comme phase adsorbante. Sans augmenter la production globale, les résines polymériques démontrent une plus grande

capacité d'adsorption. Ceci facilite la récupération de la solavétinone. Par contre, la sélectivité des adsorbants XAD-7 et XAD-16 est plus faible ($53\% \pm 2$ et $46\% \pm 3$ respectivement) que celle de l'hexane ($80\% \pm 6$). Malgré tout, les deux types de techniques permettent d'empêcher une inhibition rétroactive par les produits et d'augmenter la production de solavétinone.

2.2.3. Récupération des TIA de *Catharanthus roseus*

Pour ce qui est des métabolites biosynthétisés par *Catharanthus roseus*, l'huile de silicone est rapportée comme étant une bonne phase adsorbante dans le cas des racines transformées (Tikhomiroff et al., 2002). Des augmentations des rendements spécifiques de tabersonine entre 100 et 400% et de löchnericine entre 14 et 200% ont été observées. Par contre, l'ajout de cette phase d'extraction n'a pas eu d'effet sur les rendements en catharanthine et en serpentine.

Un système de récupération des alcaloïdes indoliques de *Catharanthus roseus* comprenant une colonne de résine polymérique neutre est aussi utilisé (Yuan et al., 1999). Ce système permet d'augmenter la production globale des alcaloïdes de 4,5 fois en comparaison avec un système sans adsorbant. Malheureusement, aucune spécification n'est donnée sur la nature des alcaloïdes produits lors de ces expériences.

L'utilisation de résine polymérique pour la récupération des TIA est très répandue dans la littérature. Une étude réalisée par Payne et *al.* (1988) démontre que l'utilisation de XAD-7 permet d'augmenter la production de TIA. Les auteurs suggèrent aussi que la résine XAD-7 pourrait favoriser la formation d'ajmalicine plutôt que de serpentine. Une autre étude prouve que XAD-7 permet à l'ajmalicine d'être mieux relargué des cellules tout en augmentant la productivité total d'ajmalicine d'environ 40% (Asada et Shuler, 1989). Une étude comparative des résines XAD-2, XAD-4 et XAD-7 démontre l'efficacité de ces trois résines pour augmenter la production totale (Sim et *al.*, 1994a). Cette étude révèle que la résine XAD-2 semble aussi efficace que la résine XAD-7 en ce qui a trait à la productivité de l'ajmalicine. Par contre, la résine XAD-7 est nettement supérieure pour la productivité de catharanthine. La résine augmentant le plus le relargage des TIA en dehors des cellules est la résine XAD-7. Malgré plusieurs études effectuées au cours durant des 20 dernières années, la quantité de résines testées est petite et l'effet de celle-ci est rarement testé sur plusieurs TIA simultanément.

Une des principales hypothèses permettant à la résine d'augmenter la productivité des TIA est la diminution de l'inhibition par les produits. Cette hypothèse serait justifiée par le fait que deux enzymes importantes dans la

synthèse des TIA pourraient être régulé par la concentration de TIA (Payne et al., 1988). En effet, la tryptophane décarboxylase serait régulé par la concentration de tryptamine (Skinner et al., 1987) et la catharanthine inhiberait une monooxygénase dépendante d'un P-450 utilisée dans le chemin des monoterpènes menant aux alcaloïdes indoliques (McFarlane et al., 1975).

Quelques expériences sur le temps optimal d'introduction de la résine sont effectuées dans la littérature (Asada et Shuler, 1989; Lee-Parson et Shuler, 2002). Un ajout de résine vers la fin de la croissance semble favorable autant pour la production d'ajmalicine que de catharanthine. Par contre, aucune étude ne porte sur l'étude du délai d'introduction de la résine après une élicitation.

2.2.4. Caractéristiques des résines polymériques étudiées

Les molécules peuvent être attirées sur une surface par deux forces :

- Force de dispersion-répulsion (Van der Waals);
- Force électrostatique.

Les forces de dispersion-répulsion sont toujours présentes et en l'absence de forces plus importantes, elles vont déterminer l'équilibre. Par contre, en présence d'une surface polaire, un champ magnétique induira un moment

dipolaire. Cette polarisation peut augmenter l'attraction entre la surface et la molécule. Pour une surface polaire et des molécules ayant des moments dipolaires permanents, l'attraction est très forte. Les résines utilisent les forces électrostatiques afin d'augmenter l'adsorption des molécules à leur surface.

Pour cette étude, sept résines polymérique ont été choisies (Tableau 2.5) pour leurs potentiel à adsorber les molécules d'intérêts.

Tableau 2.5 : Propriétés physiques des résines étudiées. Tiré des fiches de produits Rohm et Haas. PDS 0556 (2001), PDS 0529 (2001), PDS 0170 (2001), PDS 0103 (2001), PDS 0205 (2001) et PDS 0297 (2002).

	Matrice	Humidité Max (%)	Densité	∅ des particules (mm)	Coefficient d'uniformité	Aire de surface (m ² g ⁻¹)	Porosité (mL mL ⁻¹)
XAD-4	Polymère aromatique macroréticulé	54-60	1.01-1.03	0.46-0.69	≤2.0	≥750	≥0.5
XAD-7	Polymère aliphatique macroréticulé	61-69	1.06-1.08	0.56-0.71	≤2.0	≥380	≥0.5
XAD-16	Polymère aromatique macroréticulé	62-70	1.015-1.025	0.56-0.71	≤2.0	≥800	≥0.55
XAD-761	Poly-condensé de phénol-formaldéhyde	62-70	1.07-1.13	0.56-0.76	≤1.8	150-250	0.95-1.18
XAD-1180	Polymère aromatique macroréticulé	61-67	1.015-1.025	0.35-0.60	≤1.8	≥500	≥0.60
XAD-1600	Polymère aromatique macroréticulé	66-73	1.015-1.025	0.40 ± 0.05	≤1.25	≥500	≥0.55
HP-2MG	N/D	N/D	1.09	0.25-0.50	N/D	≥500	1.20 (mL g ⁻¹)

2.3. Paramètres hormonaux et nutritionnels

2.3.1. Effet des régulateurs de croissances

Les régulateurs de plantes sont des composés endogènes actifs à de très faibles concentrations. Ces molécules sont produites dans un tissu et redirigées vers un autre où elles auront un effet sur la croissance et le développement de la plante. Il existe plusieurs classes de régulateurs dont les deux plus communes sont les auxines et les cytokinines. Le Tableau 2.6 résume le lien entre le type d'hormone, les régulateurs endogènes, les synthétiques et leurs principaux effets dans la plante.

Tableau 2.6 : Régulateurs de croissance

Classes	Endogènes	Synthétiques	Principaux effets dans la plante
Auxines	Indoleacetic acid (IAA)	Naphthaleneacetic acid (NAA) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) Etc.	Élongation et expansion de la cellule Suppression des bourgeons latéraux Initiation de racines adventives Implication dans les phénomènes de tropism (photo-, gravi-, thigmo-)
Cytokinines	Zeatin Zeatin ribosine	Kinetin Benzylaminopurine (BA) Etc...	Division cellulaire Promotion des bourgeons latéraux Ralentissement de la sénescence Promotion de certains stades de développement racinaire

Les régulateurs sont nécessaires afin d'induire la division cellulaire (Gamborg, 1982). Le 2,4-D est un régulateur particulièrement efficace pour le maintien des suspensions ainsi que pour optimiser les facteurs de croissance (Gamborg, 1982). Par contre, plusieurs études démontrent son effet négatif sur la production de métabolites secondaires et en particulier sur les TIA (Kim et Chang, 1990; van der Plas et *al.*, 1995; Withmer et *al.*, 1998; Zhao et *al.*, 2001a,b; Magdi El-Sayed et Verpoorte, 2002). Whitmer et *al.* (1998), observent la chute des TIA intracellulaires en phase de croissance lorsque des cellules de *Catharanthus roseus* passent d'un milieu avec du NAA à un milieu avec du 2,4-D. Ils posent l'hypothèse que comme le 2,4-D augmente grandement la division cellulaire, il crée ainsi une rareté en précurseur intracellulaire qui inhibe la production de métabolites secondaires. De bons résultats de production ont été observés lorsque les cellules sont en présence de NAA et IAA en croissance (Kim et Chang, 1990; van der Plas et *al.*, 1995; Zhao et *al.*, 2001a,b; Magdi El-Sayed et Verpoorte, 2002). Par contre, dans des systèmes de production à deux phases, certains auteurs rapportent des productions de shikonin (Kim et Chang, 1990) ou de TIA (Asada et Shuler, 1989; Lee-Parsons et Shuler, 2000) malgré une croissance en présence de 2,4-D. L'effet du 2,4-D sur la capacité de production de métabolites secondaires par les cellules de plantes n'est donc pas encore entièrement compris par la communauté scientifique.

2.3.2. Effet de la source de carbone

2.3.2.1. Effet du type de sucre

La littérature rapporte une influence du type de sucre sur la production de métabolite secondaire. En 1994, Mori et Sakurai présentent des tests sur 8 types de source de carbone (xylose, D-mannose, L-rhamnose, D-arabinose, D-galactose, D-glucose, sucrose et fructose) sur la production d'anthocyanines par des cellules de *Fragaria ananassa*. Ils démontrent que le xylose, le D-mannose, le L-rhamnose ainsi que le D-arabinose ne sont pas métabolisés par cette espèce végétale puisqu'aucune croissance ou production n'est observée dans les cultures avec un milieu contenant ces sucres. Par contre, ils observent une faible production d'anthocyanines avec le D-galactose et une production nettement plus grande avec le D-glucose, le sucrose et le fructose. La même année, Oksman-Caldentey et al. (1994), publient les effets de quatre sources de carbone (le lactose, le sucrose, le fructose, et le glucose) sur la production d'hyoscyamine par des cellules d'*Hyscymus muticus*. Ils démontrent d'abord que cette espèce ne métabolise pas le lactose et le fructose. Ils arrivent aussi à la conclusion que le sucrose est plus efficace que le glucose pour la production de leur molécule d'intérêt puisque qu'ils obtiennent 1.25 fois plus d'hyoscyamine dans les cultures contenant du sucrose que dans celles contenant du glucose. Le maltose est aussi une source de carbone intéressante pour

l'aspect production de métabolites secondaire. En effet, il est rapporté dans la littérature que ce sucre augmenterait les rendements en paclitaxel des cellules de *Taxus chinensis* en comparaisons avec le sucrose, le glucose et le fructose (Choi et *al.*, 2000).

Pour ce qui est de *Catharanthus roseus*, une étude comparant le glucose, le fructose et le sucrose démontre que le fructose augmente nettement les rendements en catharanthine (Jung et *al.* 1991). Les rendements de catharanthine obtenus avec le fructose sont d'environ 1,25 fois ceux obtenus avec le glucose et 2 fois ceux obtenus avec le sucrose. Par contre, peu de tests permettent d'étudier l'effet du type de sucre sur la production de plusieurs TIA simultanément.

L'hypothèse du choc osmotique pouvant stimuler le métabolisme secondaire a d'abord retenu l'attention des scientifiques pour expliquer les différences de production de chacun des sucres (Merillon et *al.*, 1984; Rudge et *al.*, 1986). En effet, l'osmolalité d'un poids égale de monosaccharides (glucose et fructose) est deux fois supérieure à celle d'un disaccharide (sucrose, maltose). Par contre cette hypothèse est contredite par plusieurs auteurs (Jung et *al.*, 1992, Schlatmann et *al.* 1995b).

Selon des recherches en physiologie végétale (Knoch, 1996; Jang et Sheen, 1997; Salzman et al., 1998; Roitsch, 1999; Smeejens, 2000), l'interaction entre un sucre et une protéine de détection génère un signal qui déclenche une cascade de signaux de transduction résultant en une réponse cellulaire comme un changement dans l'expression d'un gène ou le déclenchement d'activités enzymatiques (Smeejens, 2000). Plus particulièrement, des concentrations élevées de sucre peuvent induire des gènes et créer une résistance à une attaque pathogène (Roitsch, 1999; Salzman et al., 1998). Certaines études révèlent une induction spécifique de l'expression d'un gène en fonction du type de sucre. Par exemple, le sucrose induit plus efficacement le promoteur du gène codant pour le patatin que le glucose et le fructose (Wenzler et al., 1989; Jefferson et al., 1990). Cette hypothèse pourrait aussi expliquer la différence de production en présence de différents type de sucres.

2.3.2.2. Effet de la concentration de sucre

Augmenter la concentration de sucrose dans un système de production à une phase semble augmenter les rendements de shikonin par *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita et al., 1981), de diosgenin par *Dioscorea deltoidea* (Tal et al., 1982), d'antraquinone par *Galium mollugo* (Wilson et al., 1985) , d'anthocyanine par *Fragaria ananassa* (Sato et al., 1996) et de taxol par *Taxus chinensis* (Wang et al., 2001). Plus précisément, une cloche est

souvent observée entre des concentrations de 20-120 g L⁻¹ avec un optimum aux alentours de 30-50 g L⁻¹ (Panda et *al.*, 1991; Mori et Sakurai, 1994; Oksman-Caldentey et *al.*, 1994) et ce pour différents métabolites secondaires.

En ce qui a trait aux systèmes à deux phases, plusieurs publications relatent l'utilisation de concentrations en sucre jusqu'à 80 g L⁻¹ (Gertlowski et Petersen, 1993; Schlatmann et *al.*, 1993 1994, 1995a,c.). En 1995, Schlatmann et *al.*, démontrent que l'activité de deux enzymes reliées au métabolisme secondaire est plus élevée lorsque le niveau de sucre est d'environ 40 g L⁻¹. De plus, ils prouvent que le taux de production spécifique varie en fonction de la concentration de glucose en production. Un modèle de sigmoïde inversé est donc proposé :

$$q_p = q_p^{\max} \left(1 - \frac{C_s^n}{C_s^n + K_{s,p}^n} \right) \quad 2.1$$

Où :

q_p = taux de production maximum pour une concentration de glucose

q_p^{\max} = taux de production maximum toutes concentrations confondues

C_s = concentration de glucose

$K_{s,p}$ = concentration de glucose quand q_p est la moitié de q_p^{\max}

n = exposant sigmoïdal

Les paramètres de $K_{s,p}$ et n optimal trouvés lors de cette expérience sont respectivement 49 g L^{-1} et 4. Ce modèle est valide lorsque la concentration de glucose est maintenue constante pendant la période de production. Pour une concentration constante de glucose, les niveaux optimaux de production ($25\text{-}35 \text{ g L}^{-1}$) sont plus faibles que ceux rapportés dans la littérature (Schlatmann et al., 1993, 1994, 1995a,c; Zhao et al., 2001a). Par contre, ces expériences abondent dans le même sens que Gertlowski et Petersen (1993) montrent qu'une concentration constante de 20 g L^{-1} de sucrose pendant la période de production donne de haut rendement en acide rosmarinique. Les expériences effectuées dans ces études ne permettent pas de bien comprendre l'effet du maintien d'un niveau de sucre constant sur la production des TIA.

2.3.3. Effet des autres nutriments

La production des métabolites secondaires par des cellules de plantes peut être influencée par plusieurs autres nutriments. Certains auteurs rapportent un effet non négligeable du phosphate sur la production des métabolites secondaires (Dunlop et Curtis, 1991; Panda et al., 1991; Sato et al., 1996). En effet, un arrêt de croissance dû à une limitation en phosphate pourrait

induire le métabolisme secondaire (Dunlop et Curtis, 1991; Panda et al., 1991; Sato et al., 1996). Ce type de comportement est observé par Sato et al. (1996) pour la production d'anthocyanin par *Fragaria ananassa* et par Dunlop et Curtis (1991) pour la production de solvanetinone par des racines transformées d'*Hyoscyamus muticus*. Panda et al. (1991) mentionnent que la production d'alcaloïdes par *Holarhena antidysenterica* est inhibée à haute concentration de phosphate. Par contre, le phosphate est nécessaire pour plusieurs activités métaboliques de la cellule incluant la voie de formation des alcaloïdes. Malgré ce fait, aucun article ne mentionne l'utilisation d'ajout de phosphate après l'induction du métabolisme secondaire.

L'influence de l'azote préoccupe aussi quelques auteurs. Green et Thomas (1991), Mori et al. (1994) ainsi Sato et al. (1995) révèlent une influence du ratio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ sur la production de nicotine et d'anthocyanine. Par contre, Sirois (2000) prouve que l'effet du ratio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ n'est dû qu'au changement de pH.

2.3.4. Effet d'un maintien des concentrations en nutriments durant la phase de production

On retrouve peu d'articles traitant d'un maintien de la concentration des nutriments durant la phase de production en mode cuvée. Seul Schlatmann et *al.*(1995) expérimentent le maintien du glucose durant la phase de production (section 2.3.2.2). En ce qui a trait aux autres nutriments, peu de recherche publiées ont permis de vérifier l'influence de leur maintien durant la phase de production.

3. MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE

3.1. Résultats et maintien de suspensions cellulaires

Les différentes lignées cellulaires utilisées dans le cadre de cette étude ont été développées par le Dr. Robert Williams et son équipe de recherche de Phytobiotech Inc. Les trois lignées sont de l'espèce *Catharanthus roseus* et ont été initialisées à partir de graines. Les principales étapes de développement sont la germination, la formation de calles sur Agar solide et le transfert des calles en milieu liquide. Après plusieurs sous-cultures, les calles forment une suspension cellulaire plus ou moins uniforme. Une expérience comparative en flacons a permis de déterminer la lignée la plus productive (Sarrailh, 2004).

Les suspensions cellulaires sont cultivées dans des flacons de culture de 500 mL contenant un volume de 240 mL de suspension. Trois milieux de culture sont utilisés : un milieu B5 standard (Gamborg et *al.* 1968) avec 1 mg L^{-1} de 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D), 0.1 mg L^{-1} de kinétine et 30 g L^{-1} de sucrose, un milieu B5 modifié dans lequel les régulateurs de croissances standards sont remplacée par 1 mg L^{-1} de NAA ainsi qu'un milieu B5 modifié dans lequel le régulateur de croissance est le BA (1 mg L^{-1}). Le pH de ces milieux est ajusté à 5.5 à l'aide d'une solution de KOH 1 N.

Ces milieux sont ensuite stérilisés (modèle 3053, Steris) pendant 25 minutes à 121°C et 1 bar.

Les sous-cultures sont effectuées à une fréquence de 7 à 10 jours lorsque la masse sèche (DW) a au minimum doublé. La proportion de l'inoculum par rapport au volume total varie de 25 à 50% selon la croissance des cellules. Une fois sous-cultivés, les flacons sont installés sur un agitateur orbital (Innova 5000, New Brunswick sc.) à 100 rpm dans une pièce à température contrôlée ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) et à lumière continue.

3.2. Culture en flacons

Les cultures en flacons requièrent moins d'inoculum et, en ce sens, elles sont pratiques pour réaliser des tests comparant plusieurs facteurs. Tous ces tests ont été réalisés dans des flacons de 250 mL avec un volume final de suspensions de 100 mL. Des flacons sources sont échantillonnés la veille de l'inoculation afin de connaître les niveaux des divers nutriments ainsi que la masse sèche de la suspension. Si le phosphate extracellulaire est nul, un ajout de 0.1 à 0.3 mM de NaH_2PO_4 est fait. Le lendemain, peu avant l'inoculation, un échantillon du liquide est recueilli afin de s'assurer que la totalité du phosphate extracellulaire a été consommé. Si plusieurs flacons sont requis, ils sont d'abord homogénéisés dans un flacon de plus grand volume. La suspension cellulaire est ensuite filtrée stérilement sur

miracloth (Calbiochem) et une masse constante est pesée dans chacun des flacons contenant le milieu de production et l'éliciteur. Ces flacons sont ensuite agités pendant 1 à 5 heures avant d'être transférés dans des flacons contenant de la résine. Les flacons sont finalement remis sur un agitateur orbital (Innova 5000, New Brunswick sc.) à 100 rpm dans une pièce à température contrôlée ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) et à lumière continue. Les productions en flacons sont d'une durée de 7 jours. Lors de la récolte, le pH, les ions extracellulaires ainsi que les alcaloïdes contenus dans le mélange biomasse/résine sont analysés.

3.3. Culture en bioréacteur de 4 L

Le bioréacteur de 4 L possède une hélice à simple ruban hélicoïdale et trois chicanes afin de s'assurer d'une agitation efficace à faible taux de cisaillement. Sa configuration a été déterminée selon la configuration d'un bioréacteur de 11 L originalement conçu par Jolicoeur et *al.*(1992). Ce bioréacteur (Figure 3.1) est composé d'un réservoir en verre sur lequel repose un couvercle d'acier inoxydable (SS-316) fixé par des brides et un joint d'étanchéité.

Le bioréacteur est équipé d'une sonde à oxygène (322756702, Metler Toledo) permettant de suivre en continue l'oxygène dissous. La sortie des gaz est reliée à un moniteur infrarouge pour la mesure de la concentration

de dioxyde de carbone (Modèle 880A, Rosemount Analytical). L'utilisation de vanne 3 voies permet d'établir un cycle d'analyse de 15 minutes par bioréacteur. L'agitation de la suspension est assurée par un moteur (Modèle 4554-10, Cole-Palmer) dont la vitesse est ajustée manuellement. L'ensemble de l'instrumentation est relié au système de commande et d'acquisition de données Virgo (Altersys).

Le bioréacteur possède un port d'échantillonnage, un port d'inoculation/élicitation, un port d'ajouts ponctuels et un port d'ajouts en continu. Les ajouts en continu sont réalisés grâce à une pompe péristaltique (Modèle 7503-01, MasterFlex) à débit variable. L'équipement est stérilisé (Modèle 3053, Steris) pendant 50 minutes (121°C et 1 bar).

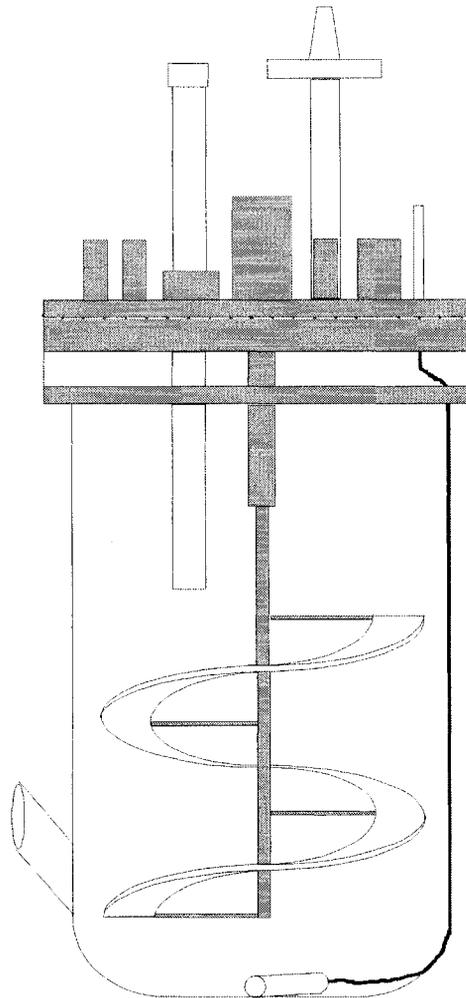


Figure 3.1 : Bioréacteur de 4L. Adapté de Sirois (2000)

L'inoculation d'un bioréacteur se fait le lendemain d'une sous-culture. Entre 6 et 8 flacons de 1 L sont utilisés pour l'inoculation d'un bioréacteur. La vitesse d'agitation est fixée à 60 rpm. Une courte période de croissance (2-4 jours) permet de vérifier la santé des cellules avant d'induire le métabolisme secondaire. L'inducteur et le milieu de production sont ajoutés dans le bioréacteur par le flacon d'ajout ponctuel. La résine est ajoutée par

le port d'inoculation/élicitation à l'aide d'un ballon de 1L. Les bioréacteurs sont échantillonnés à tous les 1 ou 2 jours pour le suivi des nutriments, de la croissance et de la production.

3.4. Culture mixte

On entend par culture mixte une culture se déroulant en partie en bioréacteur et en partie en flacon. Le but de cette méthode est d'obtenir un inoculum homogène pour chacun des flacons. De plus, cette méthode de culture facilite les manipulations et le suivi de l'inoculum. Cette technique est utilisée pour l'étude du délai optimal d'introduction de la résine.

La première étape est l'élicitation classique en bioréacteur. Par la suite, des échantillons stériles sont recueillis à divers temps après l'élicitation et transférés dans des flacons contenant de la résine stérile. Ces flacons sont ensuite déposés sur un agitateur orbital (Innova 5000, New Brunswick sc.) à 100 rpm dans une pièce à température contrôlée ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) et lumière continue pendant 7 jours.

3.5. Conditions d'opération

Avant le départ d'un bioréacteur, un inoculum cellulaire est bâti en flacons de 1 L avec un volume de suspension de 480 mL. Ces sous-cultures sont effectuées selon la même méthode que celles en flacons de 500 mL. Lors

de l'inoculation, entre 6 et 8 de sous-culture de 1 L sont ajoutés dans le bioréacteur.

La vitesse d'agitation est maintenue à 60 rpm et le débit d'aération varie de 20 à 200 mL min⁻¹ (bioréacteur de 3L) selon la demande afin de maintenir l'oxygène dissous à 120% de saturation ainsi que le CO₂ dissous à 4% de saturation.

La source d'ammonium présente dans le milieu est sous forme de citrate d'ammonium ((NH₄)₂HCH₆H₅O₇) de façon à limiter les changements de pH extracellulaire. En effet, le citrate est un tampon efficace permettant de diminuer les changements de pH.

3.5.1. Cuvée en production

Le mode cuvée est utilisé pour les productions en flacons et pour certaines cultures comparatives en bioréacteur. Cette technique ne requiert aucun ajout de nutriments pendant cette période.

3.5.2. Cuvée alimentée en production

Dans cette étude, trois types de cuvée alimentée ont été utilisés. Pour le premier type, une solution de NH₄⁺ concentrée (annexe A en appendice) est

ajoutée grâce à une pompe (7503-01, Masterflex). Cette pompe permet de contrôler le niveau de NH_4^+ entre 3 et 8 mM. Les autres ions majeurs sont ajoutés de manière ponctuelle.

Dans le cas du deuxième type de cuvée alimentée, le niveau de glucose est maintenu grâce à une seconde pompe (7503-01, Masterflex) ajoutant une solution de 400 g L^{-1} de glucose. Les niveaux de contrôle varient entre 30-90 g L^{-1} selon l'expérience. Les autres ions sont ajustés de manière ponctuelle.

Un dernier type de cuvée alimentée est testé lors de cette étude. Ce type est identique au premier à l'exception d'ajout de KH_2PO_4 dans ce cas-ci à la fin de la période de production.

3.6. Échantillonnage

La fréquence d'échantillonnage d'un bioréacteur varie généralement entre 1 à 3 jours. Lors de la période de croissance, les échantillons permettent de suivre la variation du pH, des ions extra et intracellulaires, des glucides extra et intracellulaires, des masses humides et sèches ainsi que de la prolifération cellulaire. Lors de la période de production, les contenus en alcaloïdes de la biomasse et de la résine sont également suivis.

3.6.1. pH

Le pH est mesuré à l'aide d'une sonde Accumet ® pH meter modèle 805mp de Fisher Scientific.

3.6.2. Ions extracellulaires et intracellulaires

Afin d'analyser le contenu du milieu en ions et en glucides extracellulaires, celui-ci est filtré (filtre stérile 0.45 µm, Fischer Scientific) pour analyse par HPLC.

Afin de suivre le contenu intracellulaire en ions et glucides, environ 5-10 g de biomasse humide est recueillie et filtrée (microfibre 691, VWR brand). Cette biomasse est ensuite séchée à l'azote liquide puis broyée dans un mortier (60316, Coortek). Environ 0.5 g de cette poudre est alors pesé dans un tube d'extraction de 10 mL et extraite avec 8 mL d'eau déionisée. Le tube est placé dans un agitateur orbital (676 D, New Brunswick) à 250 rpm pour 1 heure. La solution est finalement filtrée (filtre stérile 0.45 µm, Fischer Scientific) pour analyse au HPLC.

Les concentrations en sucrose, glucose, fructose et citrate intra et extracellulaire sont mesurées à l'aide d'un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC). La séparation des hydrates de carbone est

réalisée par une colonne de séparation (Aminex HPX87C, Biorad©) maintenue à une température constante de $80^{\circ}\text{C} \pm 3$. Le système comporte aussi une pompe volumétrique (501, Waters), un injecteur automatique (231/401, Gilson), un réfractomètre (7515-A, ERC inc.), un élément chauffant (7980, ManTech) et un logiciel d'acquisition des données (Peaknet 5.3, Dionex). Le volume de milieu injecté est de $20 \mu\text{L}$ et la phase mobile (eau distillée filtrée) est alimentée à un débit de 0.25 mL min^{-1} .

Lorsque la mesure du glucose est requise rapidement, une méthode alternative est utilisée. Après dilution, le milieu extracellulaire est analysé à l'aide d'un glucosimètre (Accutrend® Instant™, Boehringer Mannheim) couramment utilisé par les diabétiques.

La concentration des ions intra et extracellulaires est analysée grâce à un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC). Le détecteur utilisé est de type électrochimique et il est opéré en mode conductivité (Dionex). Une pompe (Dionex) et un injecteur automatique (3500, Spectra System) complète l'appareil. Le logiciel d'acquisition des données est le Peaknet 5.2 (Dionex) et il sert au contrôle du HPLC.

Une colonne $4 \times 250 \text{ mm}$ (IONPAC AS4A-SC, Dionex) et un supprimeur cationique (ASRS-1, Dionex) sont utilisés pour séparer les cations. La

phase mobile est une solution aqueuse de bicarbonate (35 mM Na₂CO₃ et 1.0 mM de NaHCO₃) alimentée à 1.0 mL min⁻¹. Pour ce qui est des anions, ils sont séparés par une colonne 4 x 250 mm (IONPAC CS-12, Dionex) et par un supprimeur anionique (CSRS-1, Dionex). La phase mobile est une solution aqueuse d'acide méthanosulfonique (20 mM) alimentée à 0.9 mL min⁻¹.

3.6.3. Masse humide et masse sèche

De façon à suivre l'évolution de la masse humide (WW), de la masse sèche (DW) ainsi que le rapport poids humide/poids sec, un échantillon uniforme de suspension est d'abord filtré (microfibre 691, VWR brand), pesé, séché (Despatch, 80°C, 24h), puis pesée à nouveau.

3.6.4. Alcaloïdes

Lors de la période de production, les concentrations en alcaloïdes de la biomasse et de la résine sont aussi suivies. En flacons, un échantillon uniforme de biomasse et de résine est extrait avec du méthanol acidifié puis agité (676D, New Brunswick) à 250 rpm pendant 24h. La solution de méthanol est ensuite filtrée (Nylon 0.45 µm, Millipore) pour analyse HPLC.

En bioréacteur, afin d'obtenir une plus grande compréhension de la répartition des différents alcaloïdes, la résine et la biomasse sont extraites

séparément. Pour ce faire, le mélange biomasse-résine est séparé manuellement par sédimentation. Cette méthodologie est aussi effectuée lors de l'expérience sur l'effet des résines en culture. L'extraction des TIA et des précurseurs se fait de la même façon que pour le mélange biomasse résine.

Les concentrations d'alcaloïde contenu dans les cellules et dans la résine sont mesurées grâce à un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC). Ce système comprend un injecteur automatique (série 1100, Agilent) et une colonne de type C18 (LUNA 18(2), Phenomenex). Deux types de détecteurs sont utilisés : un détecteur de type UV (DAD 225nm, série1100, Agilent) et un détecteur de type MS quadrupôle à balayage positif (API-ES 150-1500 amu, modèle 1100SL, Agilent). La durée de la détection est de 56 minutes pour le détecteur UV et de 60 minutes pour le détecteur MS. La phase mobile est un gradient d'un tampon d'ammonium formate à 5mM (hydroxyde d'ammonium, pH=9) et d'acétonitrile. Le débit de cette dernière est de 1.0 mL min⁻¹. L'acquisition des spectres UV et MS est réalisée grâce au logiciel Chemstation (Rev. A.0901, Agilent). L'analyse de 9 standards à diverses concentrations permet d'identifier et de quantifier la tryptamine (T2891Sigma), l'ajmalicine (R751618, Aldrich), la serpentine (NRC-CNRC), la tabersonine (NRC-CNRC), la catharanthine (NRC-CNRC), la vindoline (NRC-CNRC), la

vinblastine (V1377, Sigma), la vincristine (V8879, Sigma) et la vincamine (V2127, Sigma).

Dans le cas d'un mélange biomasse-résine, le pourcentage d'adsorption est calculé à partir de l'équation suivante :

$$\% \text{ adsorption} = \left(\left(\frac{[\text{molécule}]_{\text{résine}}}{[\text{molécule}]_{\text{résine}} + [\text{molécule}]_{\text{biomasse}}} \right) \right) * 100 \quad 3.1$$

Où :

$[\text{molécule}]_{\text{résine}}$ = concentration de la molécule dans la résine

$[\text{molécule}]_{\text{biomasse}}$ = concentration de la molécule dans la biomasse

3.7. Production

La phase de production est induite par l'ajout de milieu de production, d'un inducteur et de la résine. Cette section décrit les différentes manipulations requises pour induire la phase de production et les calculs requis pour la caractériser.

3.7.1. Milieu

Le milieu de production (Annexe B) est inspiré d'un milieu développé pour des cultures de pervenche (Zenk et *al.* 1977) et du milieu de production développé par l'équipe de recherche de Phytobiotech Inc.

La réalisation de ce milieu est divisée en trois solutions afin d'éviter la précipitation de certains composés durant le cycle de stérilisation. La première est une solution comprenant uniquement le CaCl_2 , la seconde est une solution de glucose et la troisième comprend la balance des produits. Ces solutions sont ensuite placées à l'autoclave (modèle 3053, Steris) pendant 25 minutes (121°C et 1 bar). Une fois refroidies, ces solutions sont mélangées pour former le milieu de production.

3.7.2. Inducteurs

3.7.2.1. Méthyle Jasmonate

Une solution de méthyle jasmonate (Bedoukian research inc.) est d'abord réalisée en diluant celui-ci dans de l'éthanol 95% (10 mg mL^{-1}). Cette solution est ensuite filtrée stérilement ($0.22 \mu\text{m}$, Millex) avant d'être ajoutée dans les flacons ou les bioréacteurs.

La concentration de méthyle jasmonate est mesurée grâce à un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC). Ce système comprend un injecteur automatique (série 1100, Agilent) et une colonne de type C18 (LUNA 18(2), Phenomenex). Deux type de détecteurs sont utilisés : un détecteur de type UV (DAD 225nm, série1100, Agilent) et un détecteur de type MS quadrupôle à balayage positif (API-ES 150-1500 amu, modèle 1100SL, Agilent). La durée de la détection est de 15 minutes

pour les deux détecteurs. La phase mobile est un gradient d'eau et d'acétonitrile. Le débit de cette dernière est de 1.2 mL min^{-1} . L'acquisition des spectres UV et MS est réalisée grâce au logiciel Chemstation (Rev. A.0901, Agilent). L'analyse d'un standard de méthyle jasmonate à diverses concentrations permet d'identifier et de quantifier sa concentration dans les échantillons.

3.7.2.2. Chitine

La chitine est d'abord pesée et diluée dans un peu d'eau déionisée. Cette solution est stérilisée à l'autoclave (modèle 3053, Steris) pendant 25 minutes (121°C et 1 bar).

3.7.3. Manutention de la résine

Les différentes résines (XAD-4, XAD-7, XAD-16, XAD-780, XAD-1180, XAD-1600 et HP-2MG de Sigma-Aldrich) subissent d'abord une étape de nettoyage. Cette étape débute par deux passes d'extraction dans du méthanol. Lors des deux passes, le mélange résine-méthanol est agité à 150 rpm (G10, New brunswick co.) pendant 1 h. La résine est ensuite rincée à l'eau pendant une dizaine de minutes à l'aide d'un système de fluidisation. La résine filtrée sur miracloth (Calbiochem) est pesée puis stérilisée (modèle 3053, Steris) pendant 50 minutes (121°C et 1 bar).

3.7.4. Test d'adsorption des alcaloïdes sur la résine

Les tests d'adsorption à froid permettent d'observer l'adsorption spécifique des métabolites étudiés sur les différentes résines. Deux tests à froid ont été réalisés dans le cadre de cette recherche. Le premier est un test d'adsorption de la vincamine sur les sept résines disponibles. Lors de ce test, une solution de concentration connue de vincamine dans du méthanol a d'abord été effectuée et séparée dans plusieurs tubes de 50 mL. L'évaporation du méthanol sous une hotte à solvant a ensuite été réalisée. L'adsorption est réalisée en ajoutant 20 mL d'eau déionisée puis 2 g de résine dans chacune des éprouvettes. Chaque résine a été testée en duplicats afin de pouvoir estimer l'erreur sur les rendements en flacons. Les éprouvettes sont ensuite déposées sur un agitateur orbital (676D, New Brunswick) à 250 rpm pendant 2 à 3 jours. La résine est ensuite filtrée sur miracloth et extraite selon la même méthode que celle décrite dans la section 3.6.5.

Le second test consistait en l'étude de l'adsorption de plusieurs métabolites secondaires simultanément. Pour ce faire, un extrait de culture avec des concentrations connues en chacun des alcaloïdes a été utilisé comme solution standard. La même méthode que celle décrite dans le dernier paragraphe a été utilisée pour la réalisation de ce test.

Un pourcentage de récupération peut donc être calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ récupération} = \left(1 - \left(\frac{[\text{molécule}]_{std} - [\text{molécule}]_{\text{extrait}}}{[\text{molécule}]_{std}} \right) \right) * 100 \quad 3.2$$

Où :

$[\text{molécule}]_{std}$ = Concentration en TIA dans la solution standard

$[\text{molécule}]_{\text{extrait}}$ = Concentration en TIA dans l'extrait de chacune des résines testées

3.7.5. Calculs des rendements et des taux de production moyens

Les rendements de production sont utilisés pour comparer les données dans toutes les expériences présentées dans cette étude. Cette mesure de la production tient compte de la masse sèche de cellules lors de l'élicitation et est calculée comme suit :

$$Y = \frac{c_{\text{HPLC}} \cdot V_{\text{MeOH}} \cdot \text{WWc}}{P \cdot \text{DW}} \quad 3.3$$

où :

Y = Rendement [mg g^{-1}]

c_{HPLC} = Concentration d'alcaloïdes mesurés au HPLC [mg g^{-1}]

V_{MeOH} = Volume de méthanol dans l'extrait [L]

$\text{WWc} = \begin{cases} \text{Somme du WW et de la concentration de résine si l'extrait est un} \\ \text{mélange de cellule et résine [g L}^{-1}\text{]} \\ \text{WW si l'extrait est contient seulement des cellules [g L}^{-1}\text{]} \\ \text{Concentration de la résine si l'extrait contient de la résine} \\ \text{seulement [g L}^{-1}\text{]} \end{cases}$

P = Poids de l'extrait [g]

DW = Masse sèche lors de l'élicitation [gDW L^{-1}]

Les taux de production entre deux échantillons sont utilisés pour comparer les expériences réalisées en bioréacteurs et pour sont calculés selon la méthode proposée par Sirois (2000).

$$q_p = \frac{(Y_{t+1} - Y_{t-1})}{((t+1) - (t-1))} \quad 3.4$$

où :

q_p = Taux de production [$\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$]

Y_{t+1} = Rendement au temps t+1 [mg g^{-1}]

Y_{t-1} = Rendement au temps t-1 [mg g^{-1}]

La valeur obtenue est attribuée aux échantillons précédents, actuel et suivant. Le taux de production moyen est obtenu par la moyenne des trois taux pour chaque échantillon.

Les erreurs sur les rendements en bioréacteur sont estimés par l'erreur intra-groupe. Une erreur relative est donc calculée à partir des données de trois bioréacteurs opérés dans des conditions identiques. Cette erreur relative est ensuite appliquée aux rendements de toutes les cultures en bioréacteur. Le calcul des erreurs sur les taux de production est réalisé par la méthode basée sur le développement de Taylor.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'établissement des bases d'un bioprocédé efficace pour la production des TIA est un procédé long et exhaustif. Mains paramètres doivent être étudiés pour bien cerner toutes les dimensions de la phase de production.

Le présent mémoire couvre principalement deux groupes de paramètres :

- les paramètres de la phase absorbante;
- les paramètres concernant les nutriments et les régulateurs de croissance.

Chacun des paramètres doit être étudié non seulement dans l'optique d'une augmentation des rendements, mais aussi en regard à la simplicité du bioprocédé.

4.1. Étude de la phase adsorbante

L'expertise de l'équipe de recherche de Phytobiotech inc. ainsi qu'une revue de littérature ont permis d'identifier une technique de récupération efficace pour les TIA. L'utilisation d'une résine polymérique *in situ* a été choisie pour cette étude. Par contre, plusieurs tests doivent être réalisés afin de mettre au point un bioprocédé efficace. Premièrement, une variété de résines doivent être comparées afin d'identifier la résine la plus efficace pour augmenter les rendements en TIA. Deuxièmement, le délai d'ajout optimal

de la résine suite à l'élicitation est identifié. Finalement, l'effet de la concentration de la résine sur la production est caractérisé.

4.1.1. Choix de la résine

Le choix d'une résine efficace pour la récupération des TIA est une étape cruciale lors du développement du bioprocédé. En plus d'être efficace pour l'adsorption des molécules d'intérêts, il importe que cette résine facilite les étapes ultérieures d'extraction et de purification. Dans cette étude, sept résines sont en compétition : XAD-4, XAD-7, XAD-16, XAD-761, XAD-1180, XAD-1600 et HP-2MG. Les caractéristiques de ces résines sont présentées à la section 2.2.5. Trois tests sont utilisés afin d'identifier la meilleure résine : un test d'adsorption de la vincamine, un test d'adsorption de plusieurs TIA d'intérêts puis un test sur l'effet de chacune des résines sur la production des TIA en culture.

4.1.1.1. Adsorption de la vincamine

Le but de cette expérience est d'effectuer un tamisage de résines en caractérisant l'adsorption d'un alcaloïde type, la vincamine. Celle-ci a un faible coût et permet la tenue de plusieurs expériences d'adsorption, dont certaines à concentration élevée (130 mg L^{-1}). L'adsorption est réalisée en milieu aqueux afin de représenter le plus fidèlement possible l'environnement d'adsorption en culture. La Figure 4.1 présente les

pourcentages de récupération de la vincamine pour chacune des résines testées.

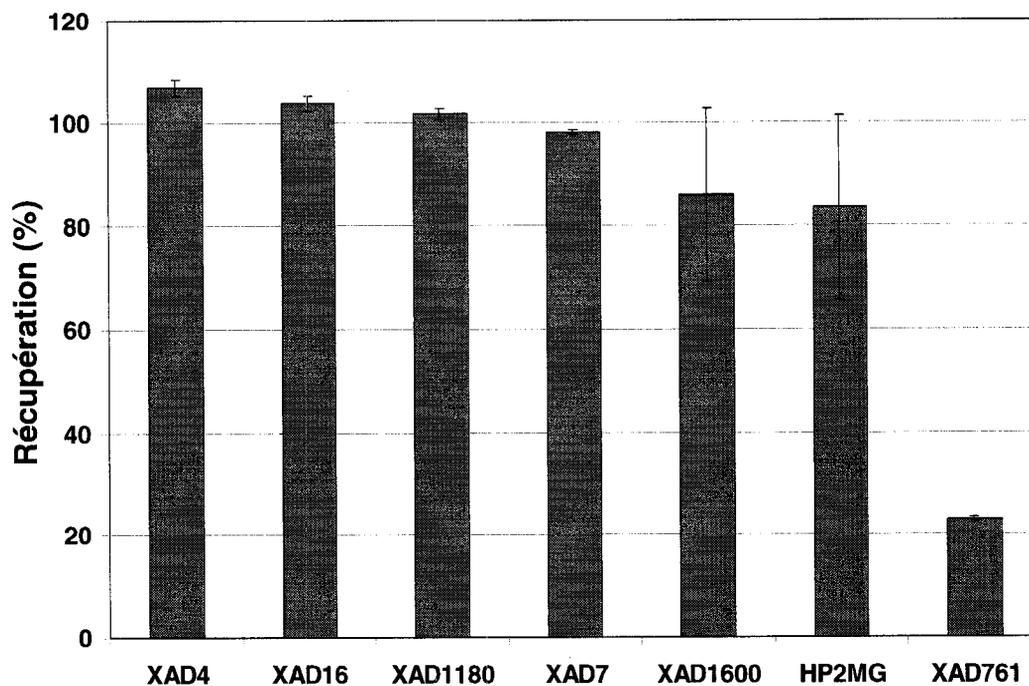


Figure 4.1 : Récupération de la vincamine par des résines polymériques

La première conclusion de cette expérience est l'inefficacité de la résine XAD-761 à adsorber la vincamine. Cette résine est donc rejetée. Les résines XAD-1600 et HP-2MG ont un taux de récupération moyen d'environ 85% et de grandes erreurs sur la mesure. Ces erreurs sont principalement dues aux propriétés physiques de ces résines. En effet, la récupération de la résine XAD-1600 est très difficile à cause de la finesse des billes. La résine HP-2MG est plus dense que les autres résines (1.09 vs 1.03-1.05). La mise en suspension de cette résine est donc plus difficile ce qui entraîne

une diminution de la surface de contact entre la résine et les TIA. Ces inconvénients permettent d'exclure ces deux résines du reste de l'étude. Pour ce qui est des résines, XAD-4, XAD-16, XAD-1180 et XAD-7, elles permettent toutes une extraction d'environ 100%. Ce test a donc permis d'éliminer 3 des 7 résines.

4.1.1.2. Adsorption des alcaloïdes recherchés

L'objectif de cette expérience est de caractériser l'adsorption à froid de TIA sur les résines retenues suite au test précédent. Pour ce faire, un extrait de culture de *Catharanthus roseus* en bioréacteur a été utilisé comme standard. Ce test permet aussi de préciser le comportement d'adsorption des résines en présence de plusieurs molécules. Les concentrations en tryptamine, ajmalicine, tabersonine et catharanthine de cet extrait ont été d'abord quantifiées. La Figure 4.2 présente les pourcentages de récupération de la tryptamine et des TIA (ajmalicine, tabersonine et catharanthine) par les quatre résines retenues.

Les pourcentages de récupération de la tryptamine, de l'ajmalicine et de la catharanthine se situent entre 75 et 100%. Pour ces trois molécules, il n'y a pas une résine statistiquement plus efficace que les autres. Il est tout de même intéressant de remarquer que les barres d'erreur de la résine XAD-16 sont généralement plus grandes que celles des autres résines. Cette

variabilité est vraisemblablement due à la difficulté de manipulation de cette résine. En effet, sa récupération est plus difficile lors des manipulations de filtration. Pour ce qui est de l'adsorption de la tabersonine, la résine XAD-7 semble plus efficace que les autres. Alors que l'adsorption de la tabersonine par XAD-7 dépasse 80%, celles des autres résines ne s'élèvent pas au-delà de 60%. De plus, cette différence se situe au delà de l'erreurs relative de chacune des résine.

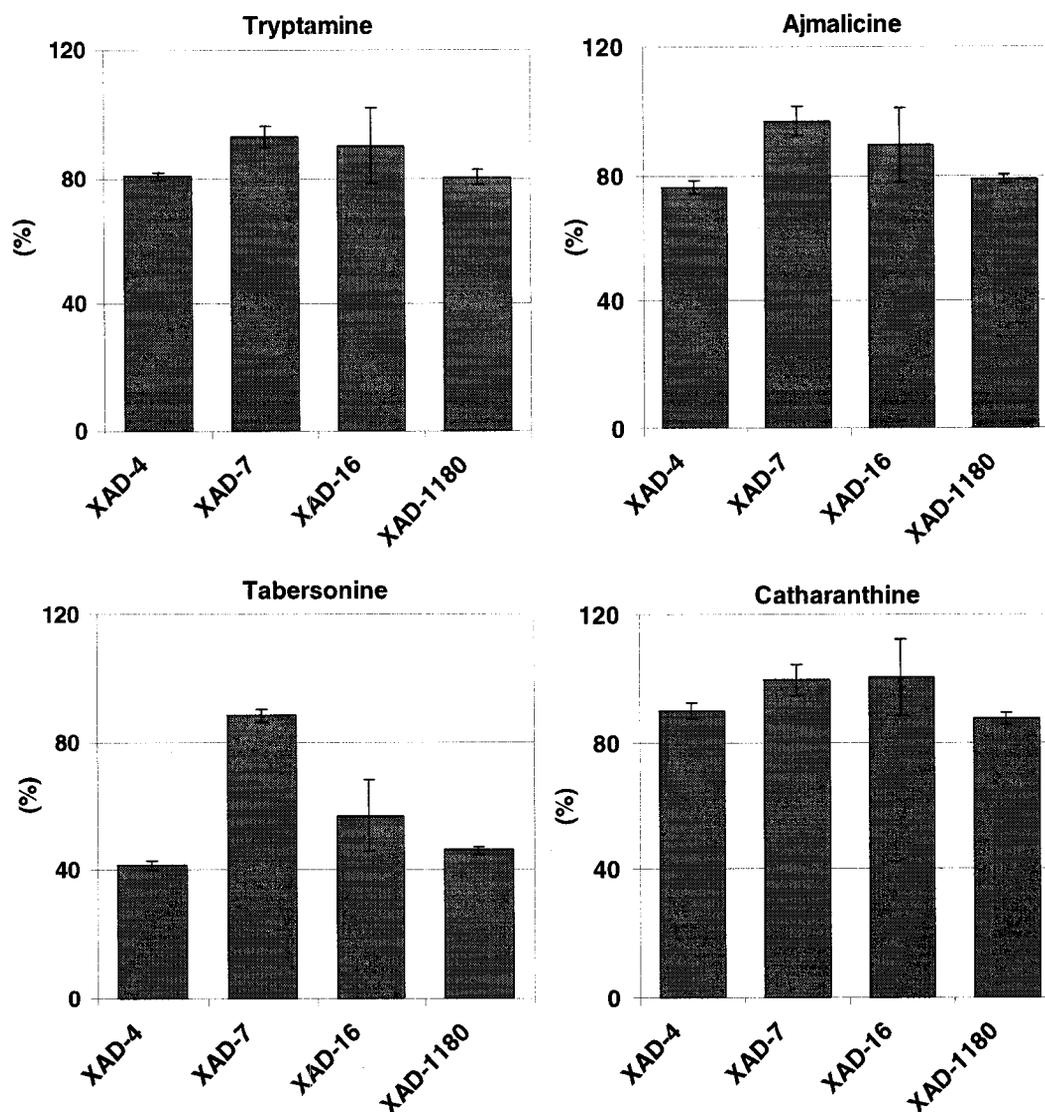


Figure 4.2 : Récupération à froid de la tryptamine et des TIA par quatre résines polymériques.

Cette expérience ne nous permet pas de faire une distinction nette entre chaque résine. Par contre, elle suggère une légère supériorité de la résine XAD-7 pour l'adsorption de la tabersonine.

4.1.1.3. Efficacité des résines en culture

Le principal but de cette expérience est d'identifier la résine la plus efficace lors d'une production en flacon. Deux séries de flacons sont réalisées afin de rencontrer cet objectif. L'effet de l'ajout de la résine comme seul inducteur est étudié lors de la première série. Dans la seconde série, l'ajout de la résine suit l'ajout du méthyle jasmonate, un messenger secondaire. L'efficacité d'une résine est jugée selon deux critères : l'augmentation des rendements de production et la capacité d'adsorption des TIA. La résine doit en effet favoriser l'augmentation des rendements des TIA par rapport à une production sans résine. La résine doit aussi favoriser l'adsorption des TIA afin de faciliter leur récupération. Par contre, la résine devra adsorber le moins possible la tryptamine puisque ce précurseur doit demeurer dans les cellules afin de favoriser la production des TIA. La Figure 4.3 illustre les résultats de cette expérience. Les contrôles sur cette figure représentent des flacons avec milieu de production mais sans résine. Des contrôles avec et sans méthyle jasmonate ont aussi été réalisés.

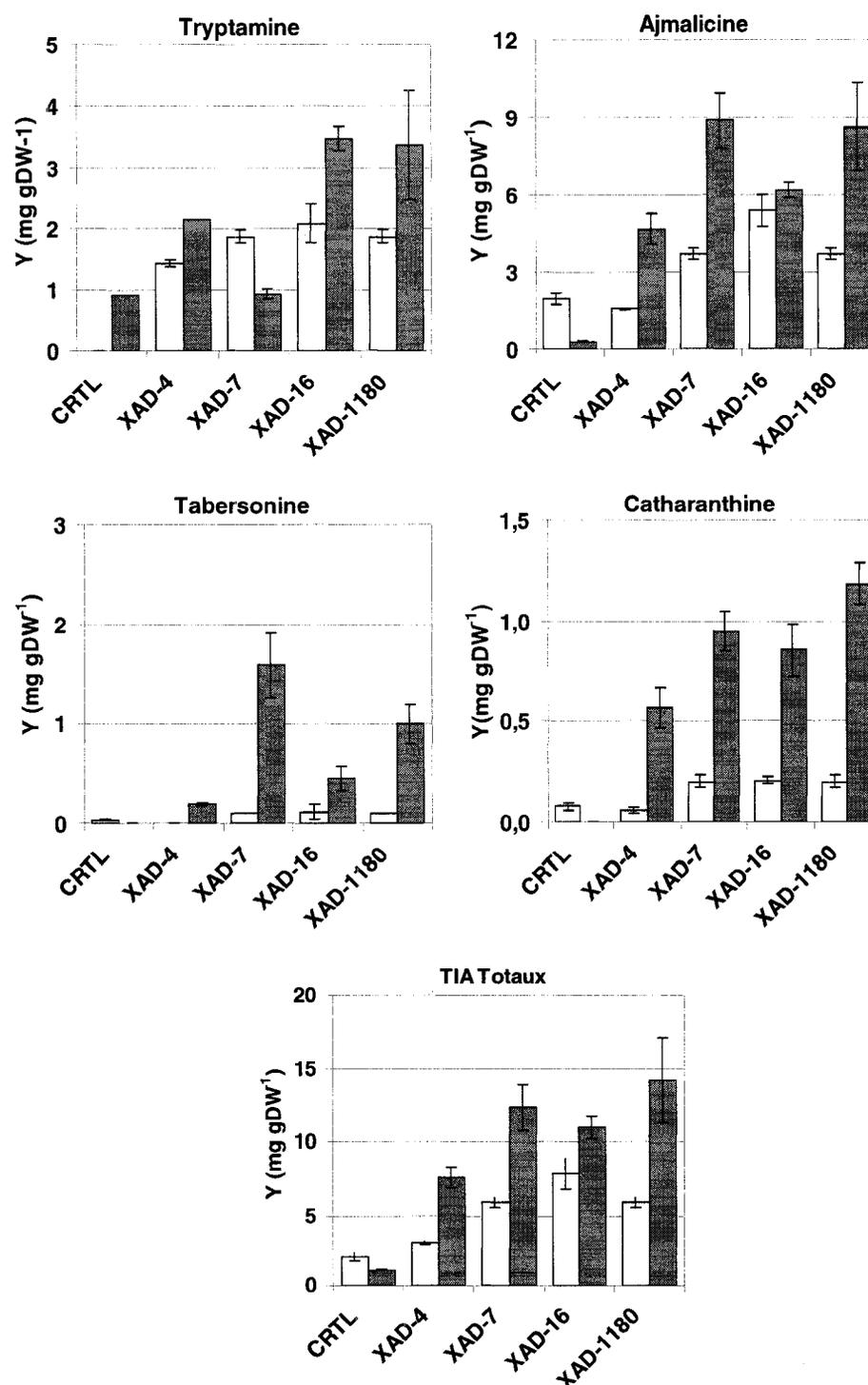


Figure 4.3: Rendements (Y) pour le tamisage *in vitro*. □ : Sans inducteur; ■ : avec inducteur (méthyl jasmonate, 100 μM). Le contrôle représente des flacons sans résine

Cette figure permet de voir que toutes les résines semblent avoir un effet positif sur la production avec ou sans méthyle jasmonate et ce pour chacune des molécules identifiées. En effet, les rendements en TIA obtenus sont plus élevés avec l'ajout de n'importe quelle résine que dans les contrôles.

La tryptamine étant un précurseur des TIA recherchés, l'objectif n'est pas nécessairement d'en améliorer les rendements mais plutôt d'en favoriser la formation pour que l'équilibre de ces réactions soit dirigé vers les molécules se retrouvant plus bas dans les voies métaboliques. Il existe peu de différences entre les rendements en tryptamine pour chacune des résines en absence de méthyle jasmonate. Par contre, en présence de méthyle jasmonate, la résine XAD-7 est celle qui engendre le plus faible rendement en tryptamine, c'est-à-dire celle qui extrait le moins de tryptamine de la culture. Cet aspect est favorable si et seulement si la production des TIA est identique ou plus élevée que celles des autres résines.

Pour ce qui est de la production d'ajmalicine, les résines XAD-7 et XAD-1180 se distinguent légèrement. La résine XAD-16 semble avoir un effet certain sur les rendements de tabersonine sans méthyle jasmonate. Par contre, lorsque le méthyle est présent, la résine XAD-7 est nettement la favorite. Les résines XAD-7, XAD-16 et XAD-1180 ont sensiblement le

même effet sur la production de catharanthine. Globalement, deux résines se distinguent des autres, soient XAD-7 et XAD-1180.

Il est aussi important de caractériser la distribution des alcaloïdes dans le système, soit dans la biomasse ou sur la résine. En effet, le premier rôle d'une résine est de favoriser l'adsorption des TIA du milieu extracellulaire ce qui, à son tour, favorise l'expulsion des TIA de la cellule. La Figure 4.4 présente le pourcentage d'adsorption sur les différentes résines pour chacune des molécules.

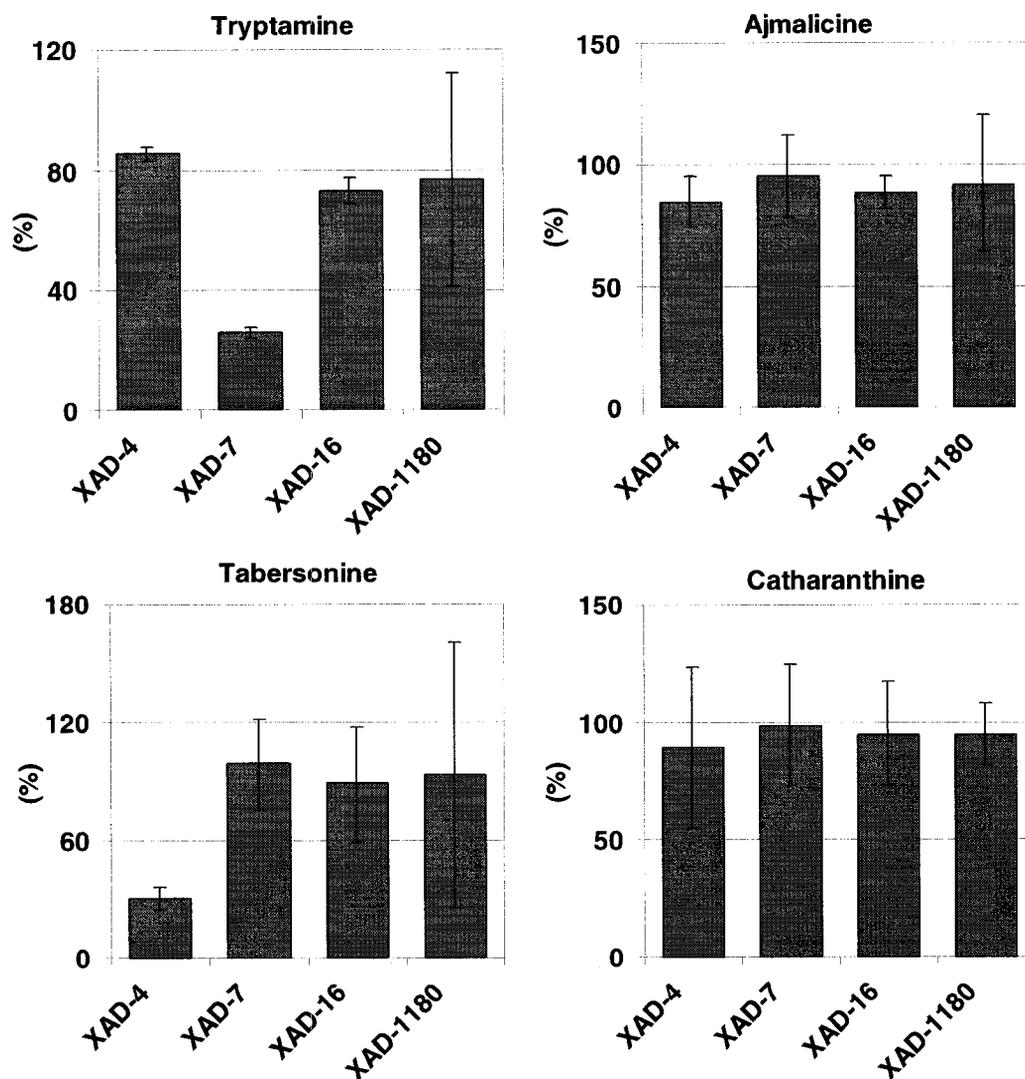


Figure 4.4 : Pourcentage d'adsorption de la tryptamine et des TIA sur les différentes résines pour le test de tamisage *in vitro*.

La plupart des molécules se retrouvent principalement sur les résines. Deux exceptions sont toutefois notables. La première est la tryptamine qui semble demeurer dans la biomasse en présence de la résine XAD-7. Ceci est un net avantage puisque la tryptamine restant à l'intérieur de la cellule peut réagir et former d'autres TIA intéressants. La seconde

exception est le faible pourcentage d'adsorption de la tabersonine par la résine XAD-4. Celle-ci ne semble donc pas être très efficace pour la récupération de ce TIA. Les autres résines ne peuvent être discriminées en se basant sur l'adsorption de l'ajmalicine et de la catharanthine.

Les propriétés physiques de la XAD-7 (densité, diamètre moyen des particules, etc.) permettent une meilleure séparation lorsque mélangée à la biomasse comparée aux résines XAD-16 et XAD-1180. Cet aspect confère un avantage à la résine XAD-7 dans l'optique d'un bioprocédé avec séparation continue. Cela facilite aussi les étapes ultérieures de récupération des produits. De plus, la résine XAD-7 minimise l'adsorption de la tryptamine. Cette dernière est donc retenue pour son efficacité et pour ses propriétés physiques.

4.1.2. Identification du temps d'ajout de la résine

4.1.2.1. Problématique

Il a été démontré que la résine pouvait influencer les flux métaboliques des cellules végétales afin d'augmenter les rendements en métabolites secondaires (sections 2.2.1.3 et 2.2.3). Par son fort caractère adsorbant, elle peut aussi adsorber quantité d'autres molécules comme le méthyle jasmonate, un messager secondaire cellulaire utilisé comme inducteur du métabolisme secondaire. Les recherches poursuivies pour le présent mémoire ont permis de vérifier que le méthyle jasmonate était bel et bien adsorbé par la résine XAD-7. Le pic encerclé sur le premier chromatographe de la Figure 4.5 représente une concentration de 100 μM de méthyle jasmonate dans la solution ajoutée à la culture avant l'introduction de la résine. Le cercle sur le second chromatographe représente la même molécules dans la même solution une heure après l'introduction de résine XAD-7 à 100 g L^{-1} . Le méthyle jasmonate qui a un poids moléculaire de 224.3 g mol^{-1} est identifié par spectroscopie de masse à un temps de rétention autour de 8.3 min avec cette méthode. Selon ces résultats, il est donc complètement adsorbé sur la résine XAD-7.

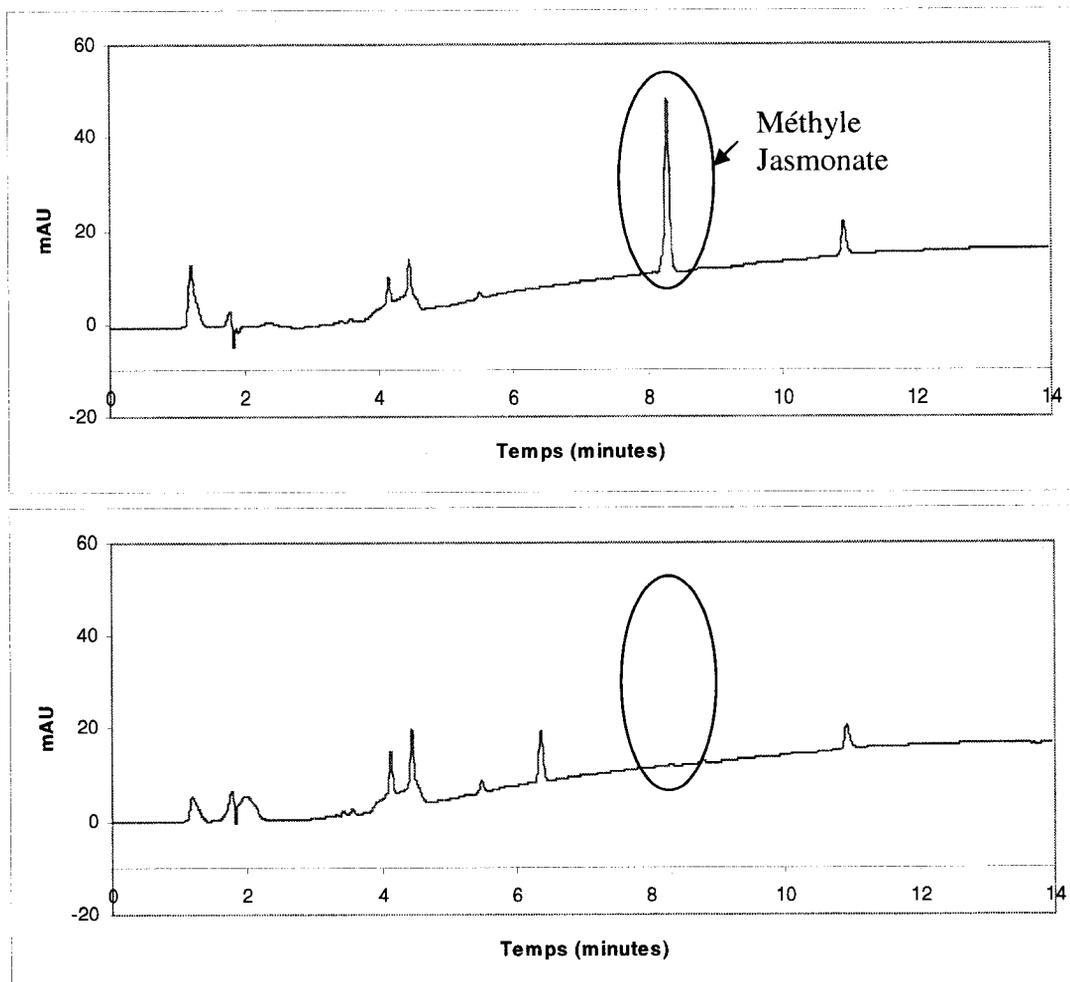


Figure 4.5 : Analyse du méthyle jasmonate. En haut : sans résine; En bas : une heure après l'ajout de la résine.

Cette constatation soulève un certain problème puisque l'ajout de la résine en même temps que l'inducteur pourrait nuire à la réaction d'induction du métabolisme secondaire. La deuxième étape consiste donc à évaluer la cinétique d'absorption du méthyle jasmonate par la biomasse. Ceci permettra de cibler une plage pour le délais d'introduction de la résine suite à une induction. Cette cinétique très rapide peut être visualisée à la Figure 4.6

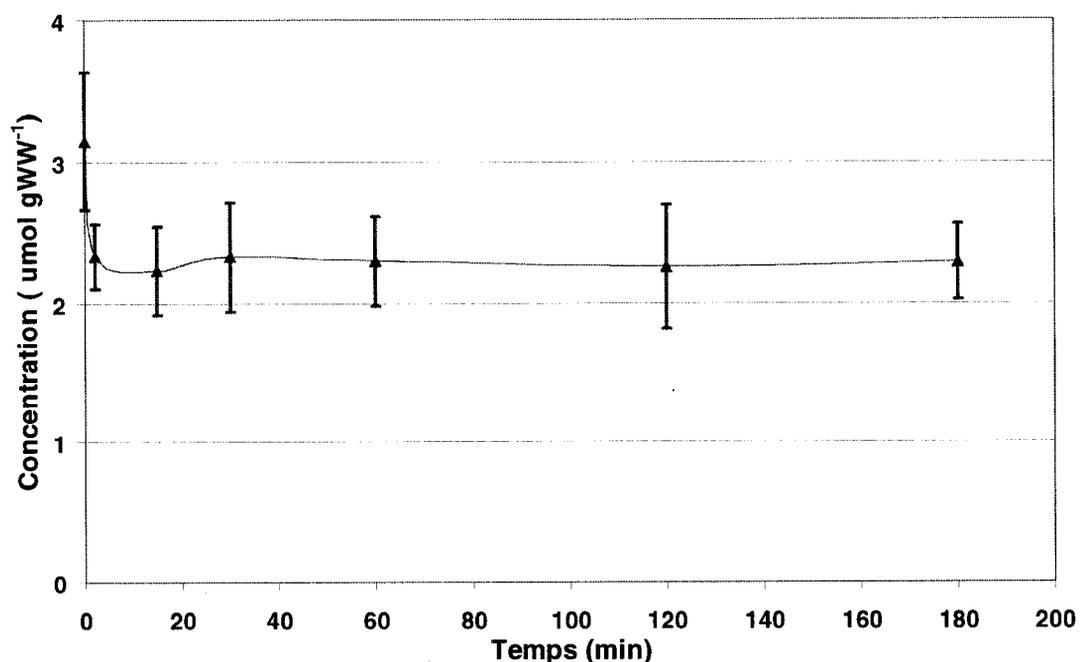


Figure 4.6: Absorption du méthyle jasmonate par les cellules dans le milieu de culture.

En effet, environ 25% du méthyle jasmonate est absorbé dans les premières minutes après son ajout puis, un état stationnaire est atteint et la concentration de l'inducteur reste constante. Le méthyle jasmonate représente un signal produit par les cellules soumises à un mécanisme d'induction du métabolisme secondaire. Selon le modèle proposé par Memelink et al. en 2001, la cellule compterait des récepteurs de méthyle jasmonate qui provoqueraient l'enchaînement des réactions d'induction. L'état stationnaire observé dans cette cinétique d'absorption pourrait peut-être être expliqué par l'occupation de tous les récepteurs présents. Des essais à différentes concentrations en méthyle jasmonate pour une même

concentration en cellules pourraient être effectués pour confirmer cette hypothèse.

Selon cette cinétique, l'ajout de la résine pourrait se faire 5 à 10 minutes suivant l'induction au méthyle jasmonate. Cette hypothèse doit cependant être validée en culture.

4.1.2.2. Délai d'ajout de la résine

Le laps de temps entre l'induction et l'ajout de la résine a un effet certain sur la production globale d'une culture. Comme démontré, la résine risque de nuire à la réaction d'induction du métabolisme secondaire si elle est ajoutée trop tôt après l'induction. Par contre, si elle est ajoutée trop tard, il peut y avoir apparition d'une inhibition rétroactive des produits ce qui diminuerait les rendements en TIA (section 2.2.1.3). L'identification du laps de temps optimal est donc une étape déterminante dans l'élaboration d'un bioprocédé efficace.

À des fins comparatives, le test est effectué avec deux inducteurs : la chitine et le méthyle jasmonate. Le métabolisme secondaire a été induit en bioréacteur. Ensuite, les bioréacteurs ont été échantillonnés stérilement à des laps de temps prédéterminés (0, 1h, 3h, 5h, 12h, 24h et 48h). Par la suite, la suspension cellulaire de l'échantillon a été transférée dans des

flacons contenant de la résine XAD-7. La description détaillée de la méthodologie utilisée lors de la réalisation de ce test est décrite dans la section 3.4. Il est important de préciser que le premier échantillon représente un échantillon pris tout de suite après l'induction, puis transféré dans la résine. Comme le délai de transfert est d'environ 5 minutes, le premier échantillon représente un ajout de résine 5 minutes après l'induction.

La Figure 4.7 représente les cinétiques de production en fonction du temps d'ajout de la résine suivant l'élicitation à la chitine. Comme cet éliciteur est peu efficace pour cette lignée (Sarrailh, 2004) les rendements sont assez faibles. Par contre, il est possible d'identifier une tendance en forme de cloche ayant son sommet autour de 5 heures pour les TIA et autour de 12 heures pour la tryptamine. Selon ces données, le temps d'ajout de la résine maximisant la production de TIA serait 3-5 heure après l'élicitation.

Une question importante se pose quant à l'interaction entre la résine et la chitine. En effet, s'il n'existait aucune interaction entre la résine et la chitine, un ajout de résine tout de suite après l'élicitation ne diminuerait pas les rendements. L'adsorption de petits saccharides libérés par la chitine pourrait expliquer ce phénomène de cloche. Cela diminuerait l'effet éliciteur de la chitine lorsque la résine est ajoutée rapidement après l'élicitation. Par

contre, si la résine n'est pas présente à moyen terme (>10-12 h) après l'élicitation, les rendements en TIA chutent. Cette réaction pourrait être expliquée par une inhibition rétroactive des produits (Robins et Rhodes, 1986; Green et al., 1991).

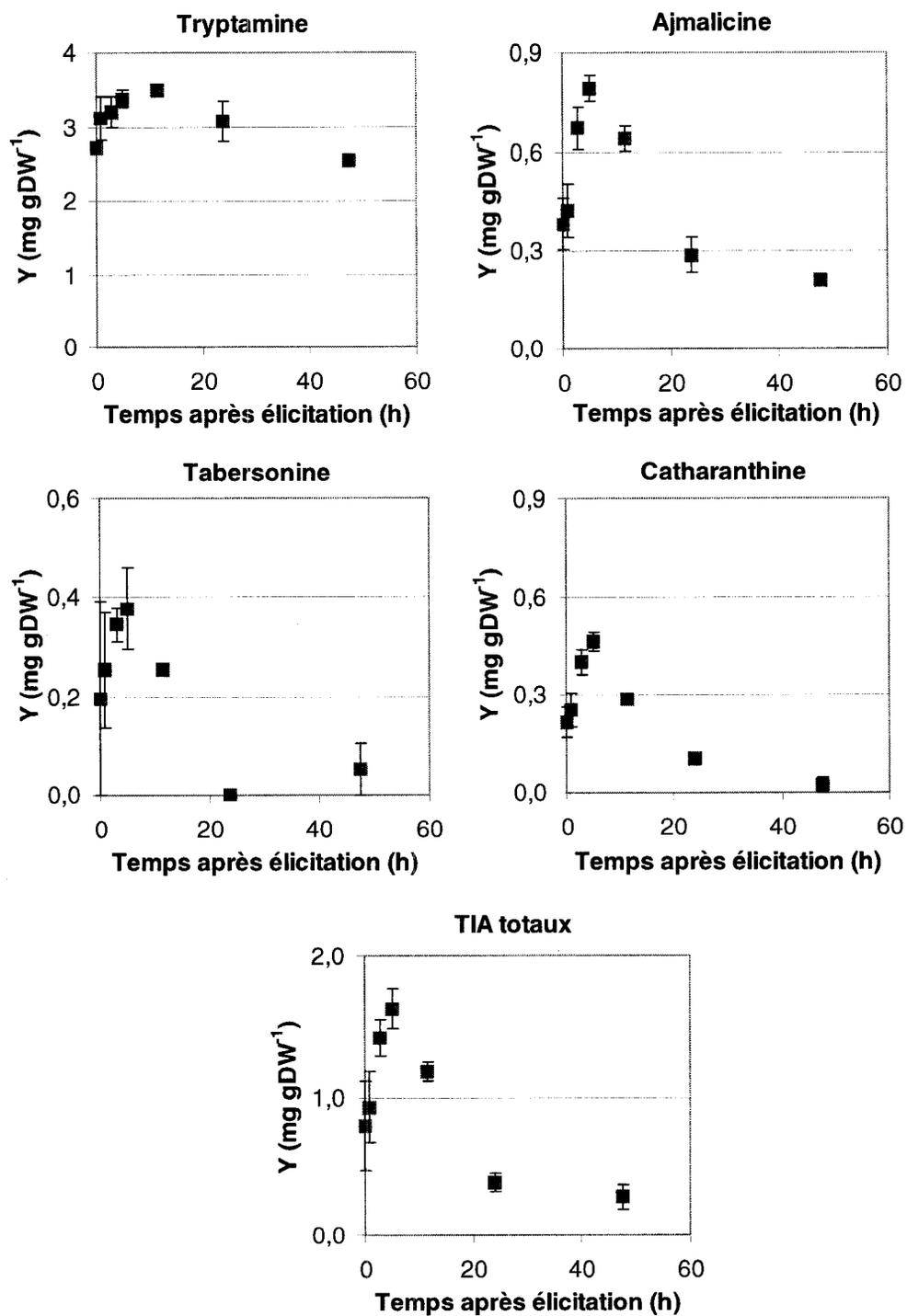


Figure 4.7 : Influence du temps d'introduction de la résine après élicitation sur les rendements (Y) (chitine, 0.9 g L⁻¹).

La Figure 4.8 montre les cinétiques de production en fonction du temps d'introduction de la résine suivant l'induction au méthyle jasmonate. La production de tryptamine ne semble pas influencée par le délai d'ajout de la résine. Par contre, ce dernier a une influence clair sur la production des TIA. La relation entre le délais d'introduction de la résine et les rendements semble linéairement décroissante. La baisse de rendement pourrait être attribuable à une inhibition rétroactive par les produits (Robins et Rhodes, 1986; Green et al., 1991). Puisque l'absorption du méthyle jasmonate par les cellules est très rapide (entre 0 et 5 minutes) (section 4.1.2.1), l'ajout de résine doit donc être fait entre 5 minutes et 5 heures après l'ajout du méthyle jasmonate.

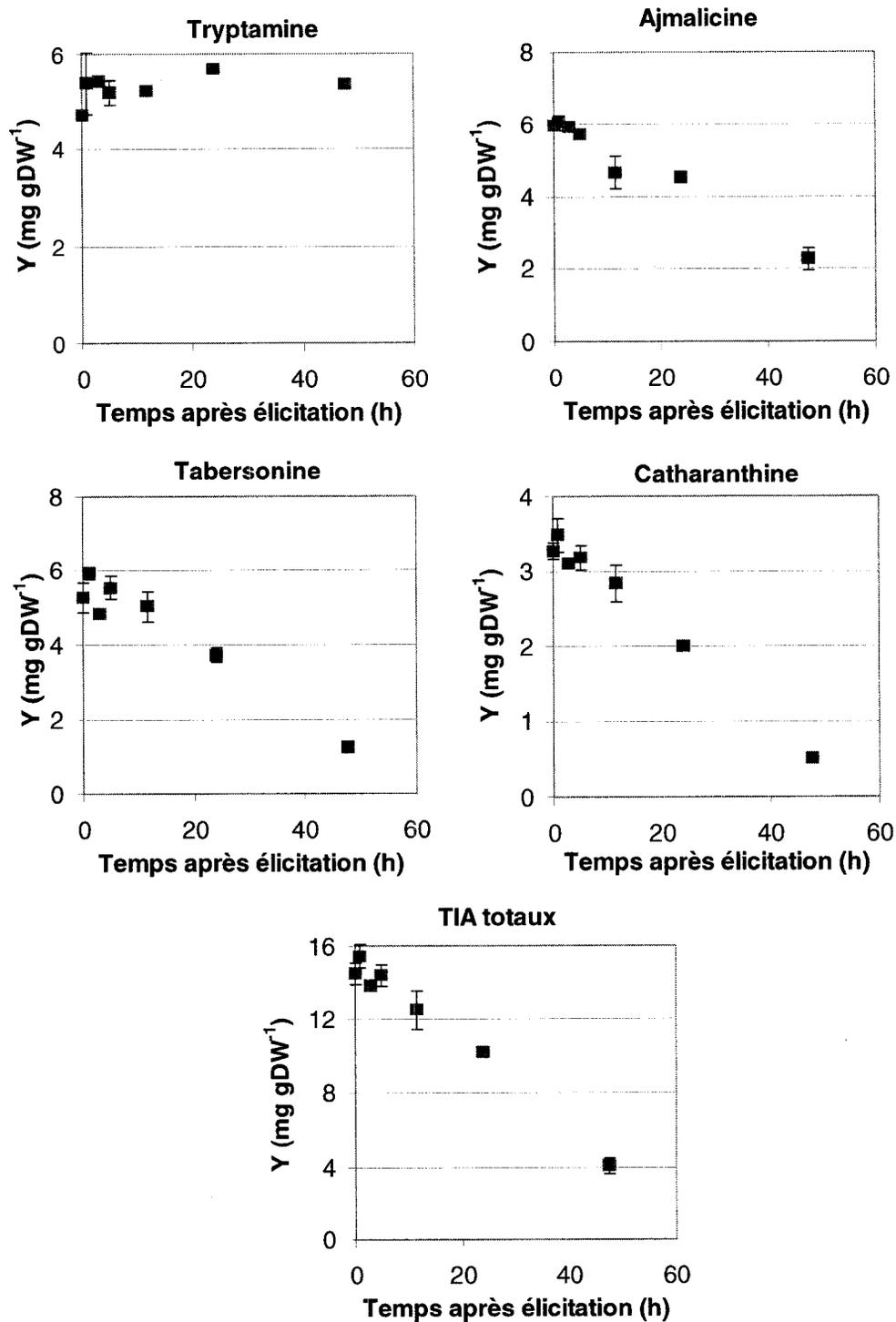


Figure 4.8 : Influence du temps d'introduction de la résine après élicitation sur les rendements (Y) (méthyle jasmonate, 100 μ M).

La Figure 4.9 présente l'évolution des précurseurs et des TIA dans la biomasse lorsqu'il n'y a pas d'ajout de résine. En ce qui a trait aux TIA, leur concentration est quasi inexistante dans la biomasse. Au contraire, il y a une accumulation significative de tryptamine (3.5 à 4 mg gDW^{-1}). Les tendances des concentrations en tryptamine dans la biomasse sont inverses à celles des rendements en TIA des Figures 4.7 et 4.8. Cette accumulation de tryptamine dans la biomasse avant l'ajout de la résine semble donc être un facteur qui influence négativement les rendements en TIA par une inhibition de la production en TIA. Ce phénomène pourrait indiquer que l'accumulation de tryptamine dans la biomasse pourrait inhiber la production de TIA.

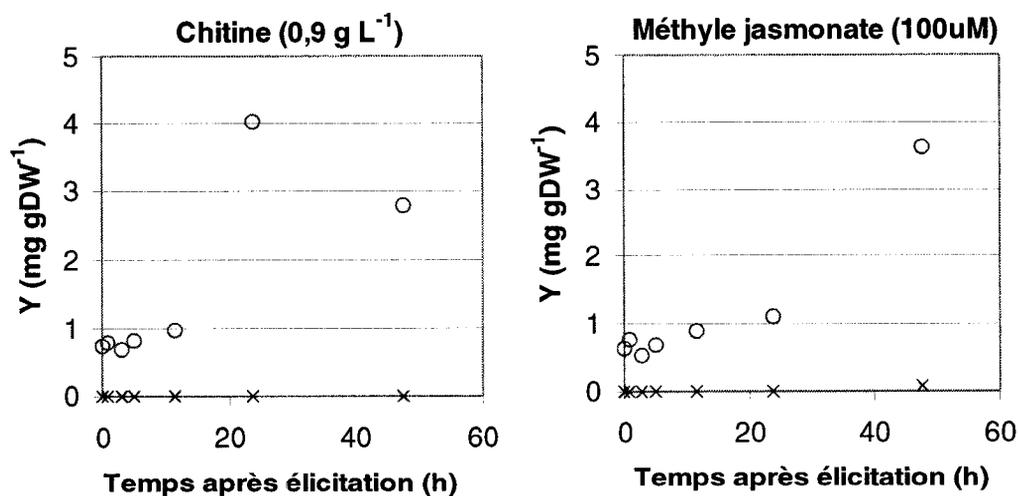


Figure 4.9 : Évolution des rendements (Y) en précurseurs et des TIA dans la biomasse en bioréacteur lorsqu'il n'y a pas d'ajout de résine. × : TIA totaux; o: tryptamine.

4.1.3. Effet de la concentration de l'adsorbant

L'objectif de cette expérience est d'observer l'effet de la concentration en résine sur la production en tryptamine et en TIA. Les concentrations classiques en résine utilisées dans la littérature se situent entre 20 et 200 g L⁻¹ (Payne et al, 1988; Williams et al., 1992; Lee-Parsons et Shuler, 2001). Pour cette expérience, l'effet de trois concentrations (50, 100 et 200 g L⁻¹) a été étudié. La Figure 4.10 permet de découvrir les différences entre les rendements obtenus avec ces trois concentrations.

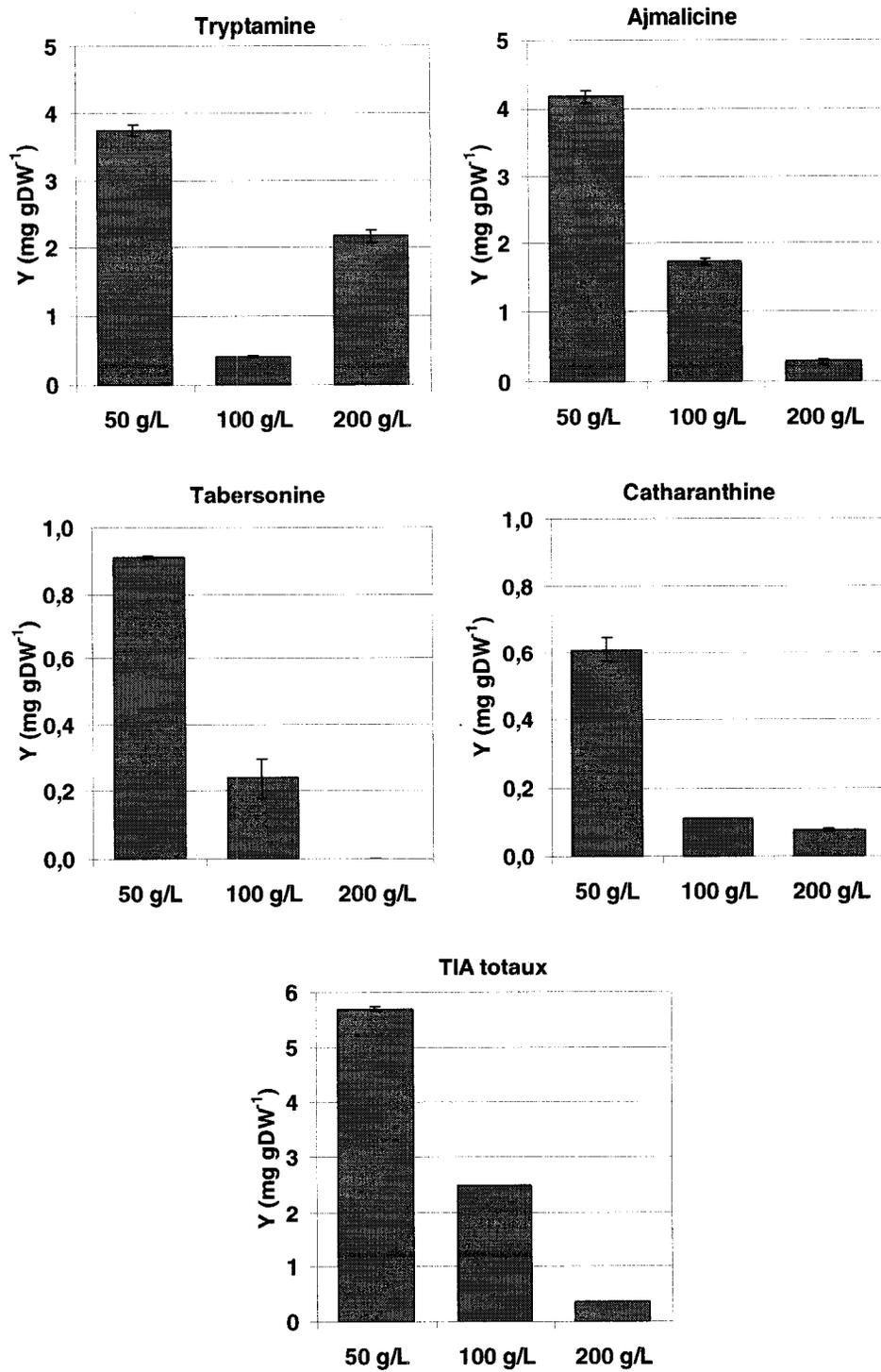


Figure 4.10: Rendements (Y) en fonction de la concentration de résine.

Une concentration de 50 g L^{-1} semble générer des rendements supérieurs en TIA. En effet, le rendement en TIA total pour une concentration de résine de 50 g L^{-1} (5.8 mg gDW^{-1}) est de plus du double du rendement obtenu à 100 g L^{-1} (2.5 mg gDW^{-1}) et plus de 15 fois celui obtenu à 200 g L^{-1} (0.3 mg gDW^{-1}). Ces résultats confirment les expériences menés par Williams et *al.*, en 1992 menés en flacons sur des cellules de *Papaver somniferum*. Mais comme ceux-ci, il faut admettre que le flacon n'est pas le système idéal pour tenir ce genre de test. En effet, plus la concentration en suspension (biomasse + résine) est grande, moins la mise en suspension et le mélange se font efficacement. Il en résulte une diminution de l'aire de contact entre le milieu et la résine. Ce qui peut diminuer l'effet de la résine. Par contre aucun test de mise en suspension ou de caractérisation du mélange en flacons permet de confirmer cette hypothèse. Ce test confirme la nécessité d'effectuer un test sur l'effet de la concentration de résine en bioréacteur. Ce test permettrait de cerner l'effet de la concentration tout en évitant les problèmes de sédimentation de la résine et de la biomasse.

4.2. Régulateurs de croissances et nutriments

Il est établi que les régulateurs de croissance et les nutriments sont des paramètres cruciaux lors de la phase de croissance. Les travaux présentés dans cette partie de l'étude ont servi à explorer l'influence de ces paramètres lors de la phase de production. Le premier paramètre évalué est

l'effet des régulateurs de croissance. Les paramètres nutritionnels ont ensuite été étudiés.

Plusieurs sucres ont été étudiés en flacons afin d'identifier le plus efficace pour la production des TIA recherchés. L'effet de la concentration de sucre en production est le premier paramètre investigué en bioréacteur. Les expériences sur l'effet de l'ajout de phosphate en production ainsi que sur les stratégies d'ajouts en nutriments utilisés sont les dernières effectuées. Toutes ces expériences ont permis de déterminer la valeur de certains paramètres d'opération afin d'utiliser un bioprocédé fiable et efficace.

4.2.1. Effet des régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissances sont réputés pour avoir un effet sur la production des métabolites secondaires (section 2.3.1). L'objectif de cette expérience est d'étudier l'effet de différents régulateurs de croissance sur la production en TIA par *Catharanthus roseus*. Ce test est réalisé en flacons avec trois milieux différents. Le premier est un milieu B5 standard avec du 2,4-D (1 mg L^{-1}) et de la kinetin (0.1 mg L^{-1}) comme régulateurs de croissance. Les deux autres milieux sont des modifications du milieu B5 standard. Le premier contient du NAA (1 mg L^{-1}) et le second contient du BA (1 mg L^{-1}). Ces deux milieux ne contiennent qu'un type de régulateur de

croissance. La Figure 4.11 montre l'effet des régulateurs de croissance sur les rendements en TIA et en tryptamine.

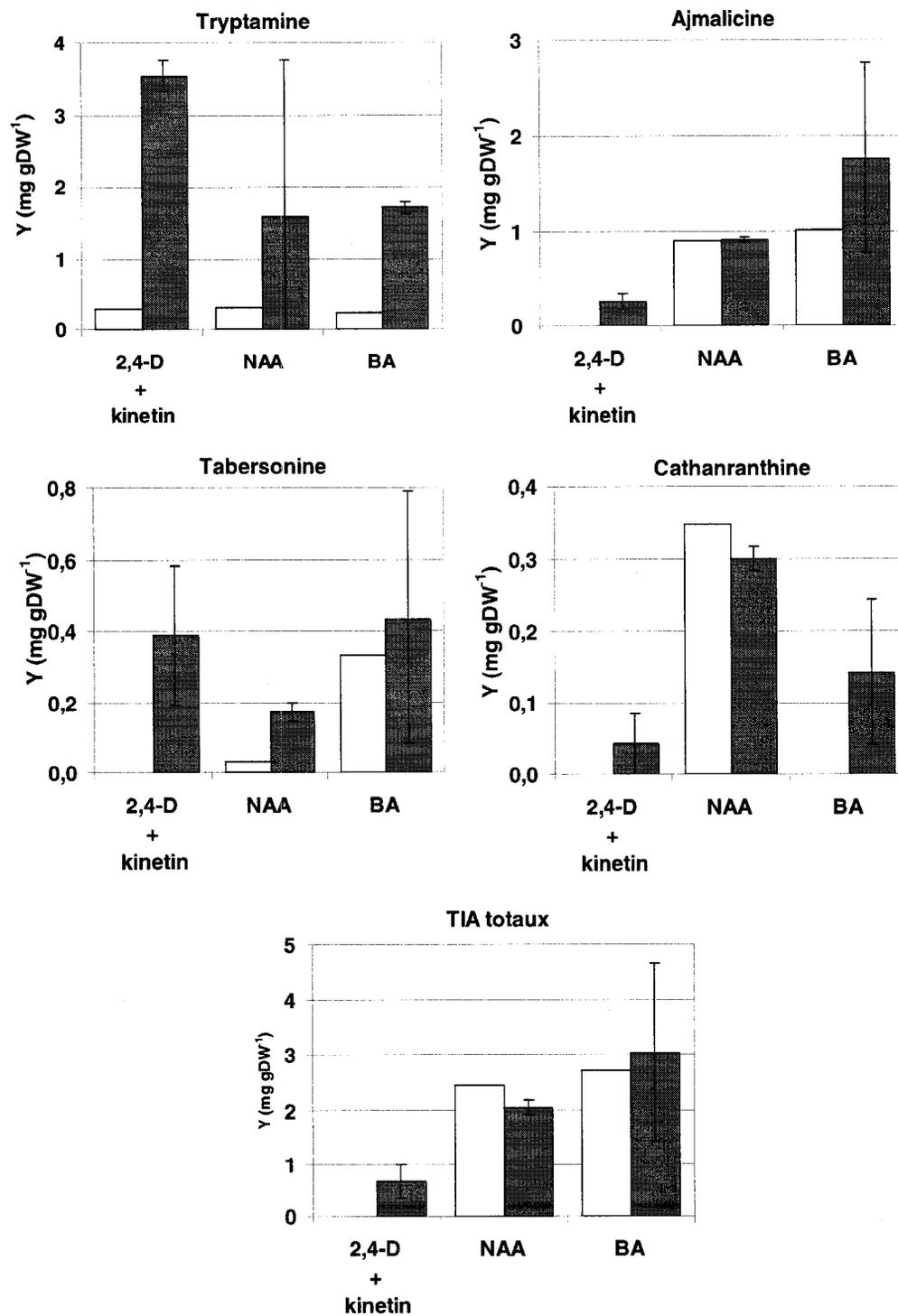


Figure 4.11: Rendements (Y) en fonction des hormones de croissance.
 □ : contrôle de la biomasse lors de l'élicitation ; ■ : production après 7 jours.

En ce qui a trait aux TIA, deux conclusions semblent pouvoir être tirées de ces résultats. La première est le fait que les cellules ayant poussées avec du 2,4-D n'accumulent pas de TIA lors de la croissance contrairement à celles ayant poussées avec du NAA ou du BA. La deuxième est le fait que l'induction semble avoir un effet sur les cellules ayant proliférées dans le 2,4-D à l'inverse des cellules ayant poussées dans le NAA ou le BA. Donc contrairement à plusieurs auteurs (Kim et Chang, 1990; van der Plas et *al.*, 1995; Withmer et *al.*, 1998; Zhao et *al.*, 2001a,b; Magdi El-Sayed et Verpoorte, 2002), aucun effet négatif du 2,4-D n'est observé dans ces résultats. Il est important de noter que l'effet observé ici peut également être dû à la différenciation ou à d'autres facteurs physiologiques non-mesurés découlant du changement de régulateur de croissance. Les conclusions valides pour cette lignée cellulaire ne peuvent donc *a priori* être généralisées à d'autres lignées cellulaires ou d'autres espèces végétales.

4.2.2. Effet du type de sucre

L'objectif de ce test est d'identifier la source de carbone qui génère les meilleurs rendements en TIA. Pour ce faire, une étude en flacon a été réalisée afin de comparer quatre sucres : le glucose, le sucrose, le fructose et le maltose. Certaines publications confirment l'effet positif de ces sucres sur la production de différents métabolites secondaires (section 2.3.2). La

concentration de ces sucres a été ajustée à 50 g L⁻¹. Les rendements obtenus sont présentés à la Figure 4.12.

Les résultats semblent démontrer une supériorité du sucrose vis-à-vis des autres sucres sur les rendements de chacun des TIA ainsi que du précurseur. Ces résultats vont à l'encontre de ceux de Jung et al.(1992) qui, rapportent que le fructose favorise la production de cathanranthine par rapport au sucrose.

Deux hypothèses sont proposées dans la littérature afin d'expliquer des différences de production selon la source de carbone. La première stipule que les différents sucres créent un choc osmotique différents ce qui influence la production des métabolites secondaires (Merillon et *al.*, 1984; Rudge et *al.*, 1986). En effet, l'osmolalité d'un poids égale de monosaccharides (glucose et fructose) est deux fois supérieure à celle d'un disaccharide (sucrose, maltose). Dans l'expérience suivante, le choc osmotique subit par les cellules est deux fois plus élevée avec le sucrose et le maltose qu'avec le glucose et le fructose. Cette hypothèse ne peut pas être retenue comme la seule explication de la variation des rendements puisque la production de TIA avec du maltose et du sucrose est différente malgré que le choc osmotique subit par les cellules en présence de ces sucres soit identique.

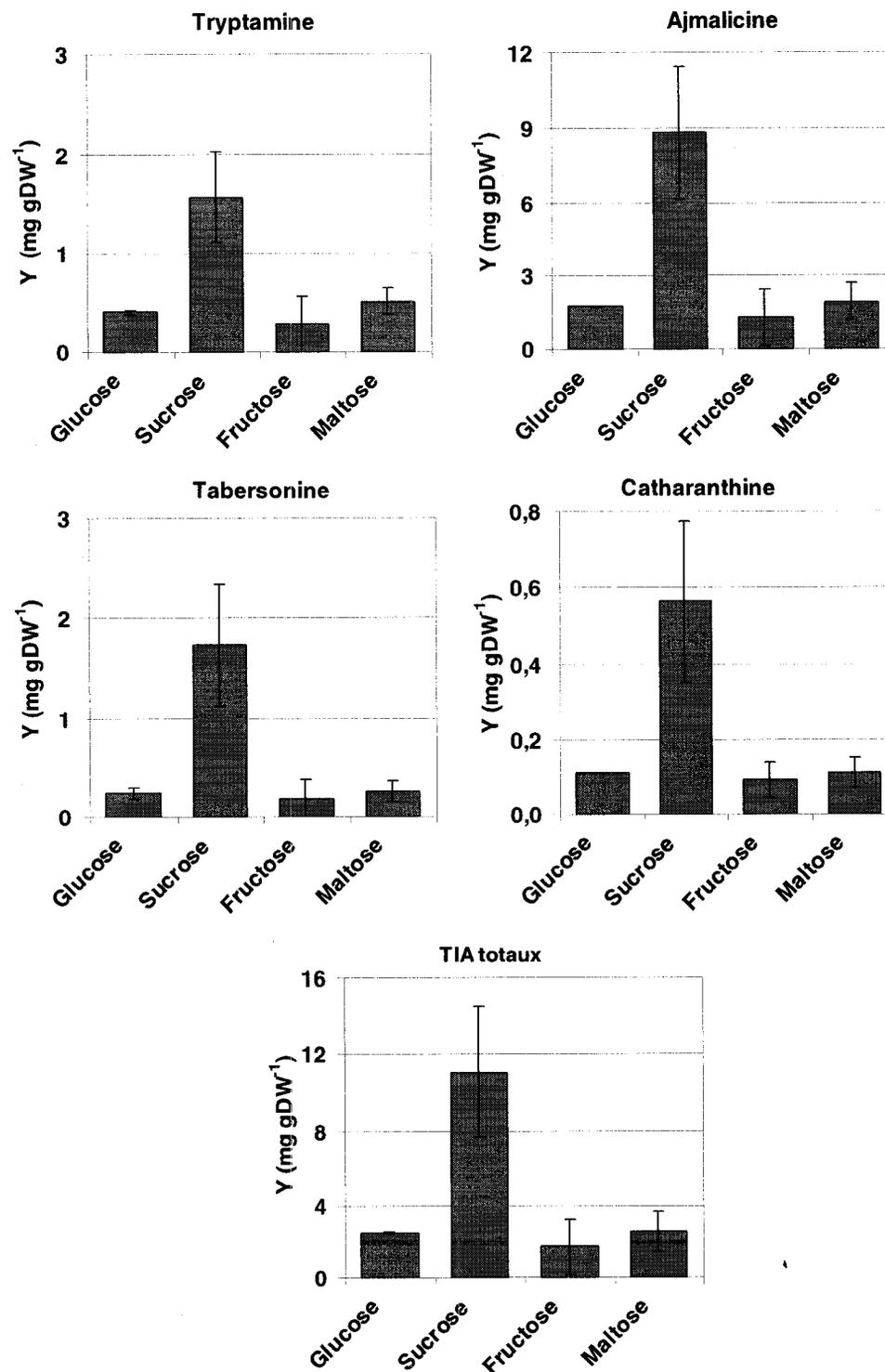


Figure 4.12: Rendements (Y) en fonction du type de sucre.

La seconde hypothèse suggérée pour expliquer ces résultats propose que les différents sucres pourraient induire plus ou moins efficacement certaines voies métaboliques tel le mécanisme de défense de la cellule (section 2.3.2.1). Pour l'instant, aucune étude traitant de l'effet des signaux induit par les sucres sur la production des TIA n'est disponible. Des tests biochimiques pourraient permettre de mieux comprendre la fonction de ces signaux dans l'induction du métabolisme secondaire et leur influence sur l'expression des enzymes permettant la production des TIA.

4.2.3. Productivité en bioréacteur

Ce test permet d'observer le comportement de la lignée en bioréacteur quant à la production en TIA. Une concentration de 100 g L^{-1} d'un mélange de proportion égale de XAD-7 et XAD-16 a été utilisée puisque les tests sur l'adsorption n'avaient pas encore été effectués à ce moment. Un mélange de deux inducteurs a été employé : le méthyle jasmonate ($100 \mu\text{M}$) et la chitine (0.9 g L^{-1}). La Figure 4.13 illustre les cinétiques de production des différentes molécules observées alors que la Figure 4.14 représente la proportion relative de chacun des TIA à la fin de cette expérience.

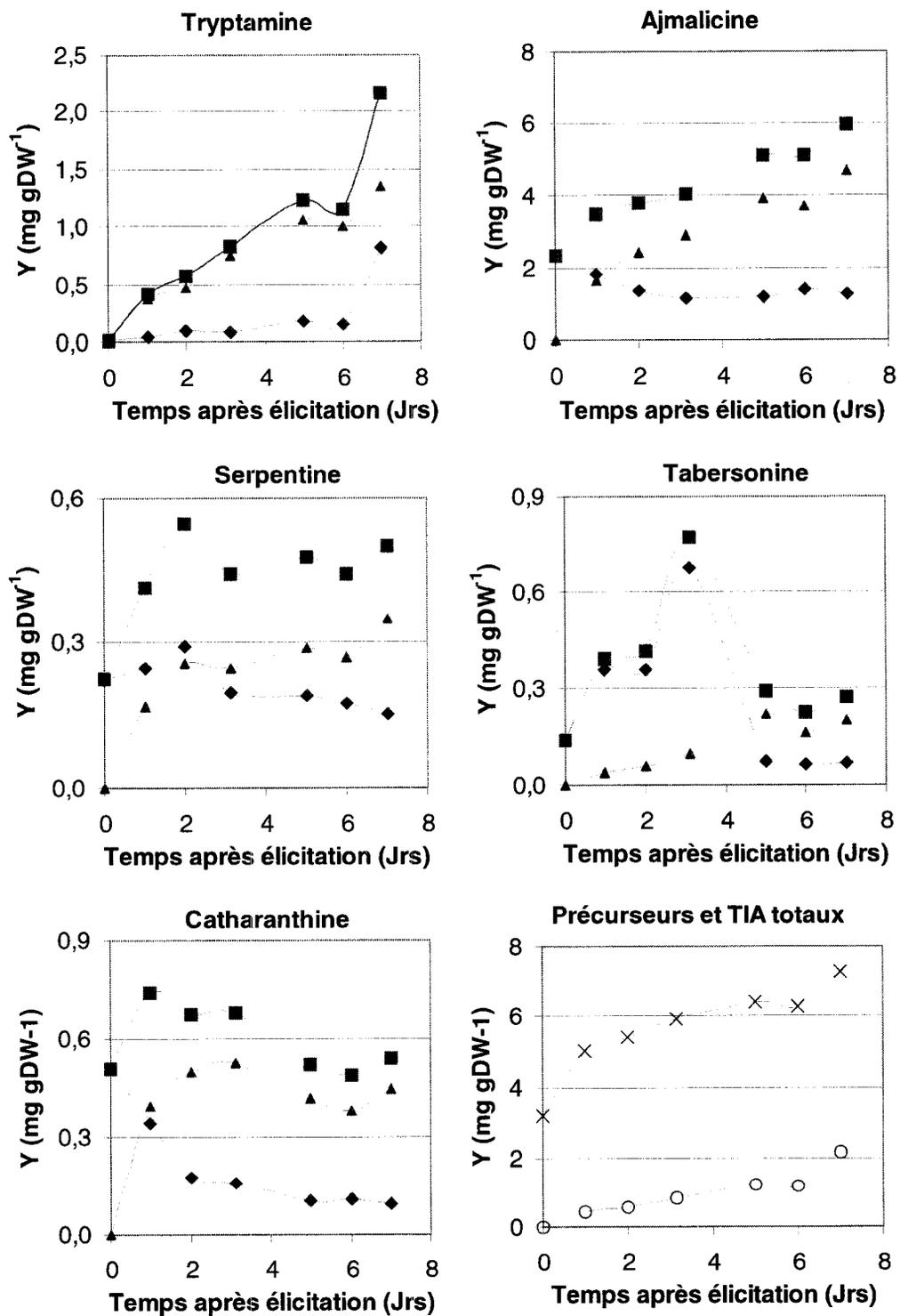


Figure 4.13: Profils de production. ◆ : biomasse ; ▲ : résine ; ■ : biomasse + résine ; × : TIA total ; ○ : précurseur.

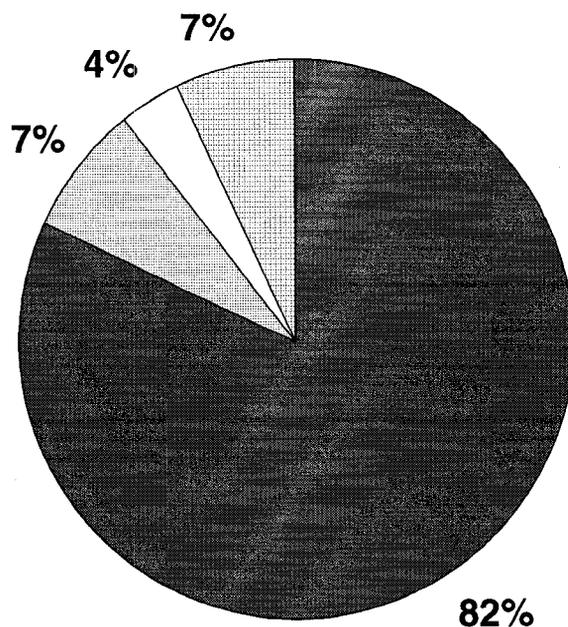


Figure 4.14: Pourcentage relatif de chacun des TIA lors de la récolte du bioréacteur.  : ajmalicine ;  : catharanthine ;  : tabersonine ;  : serpentine.

L'ajmalicine ainsi que la tryptamine sont produit à des taux à peu près constants durant les 7 jours de production. De plus, l'ajmalicine est le TIA le plus biosynthétisé lors de la phase de production. À la fin de la production, l'ajmalicine représente plus de 80% des TIA produits. Le mélange des deux résines permet d'extraire environ 80% de l'ajmalicine des cellules. La catharanthine et la serpentine, quant à elles, sont peu biosynthétisé par les cellules. En observant la courbe de catharanthine total (biomasse + résine), on ne note qu'une légère augmentation de production (environ 0.2 mg gDW^{-1}) au début de la phase de production. Comme dans le cas de l'ajmalicine, le mélange de résine permet d'extraire plus de 80% de la

catharanthine et de la serpentine totale. La tabersonine est produite dans les quatre premiers jours phase de production. Par contre, le rendement en tabersonine total (biomasse + résine) chute drastiquement (perte de 70%) vers la fin de la culture. Ce phénomène peut refléter une instabilité de la tabersonine.

Les mesures de respiration cellulaire sont des outils utiles pour étudier la phase de production. La Figure 4.15 présente l'oxygène dissous (OD), les débits gazeux total (DMTot) et d'oxygène (DMO) ainsi que le taux de transfert de CO₂ (CTR). L'induction ne semble par avoir eu un grand effet sur la qualité du contrôle de l'OD. Par contre, en phase de production le CTR et le débit d'oxygène ne cessent de diminuer. Ce phénomène est peut être associé à la mort cellulaire ou à une diminution de l'activité métabolique. Ces deux phénomènes pourraient donc expliquer les faibles rendements en TIA obtenus lors de cette expérience.

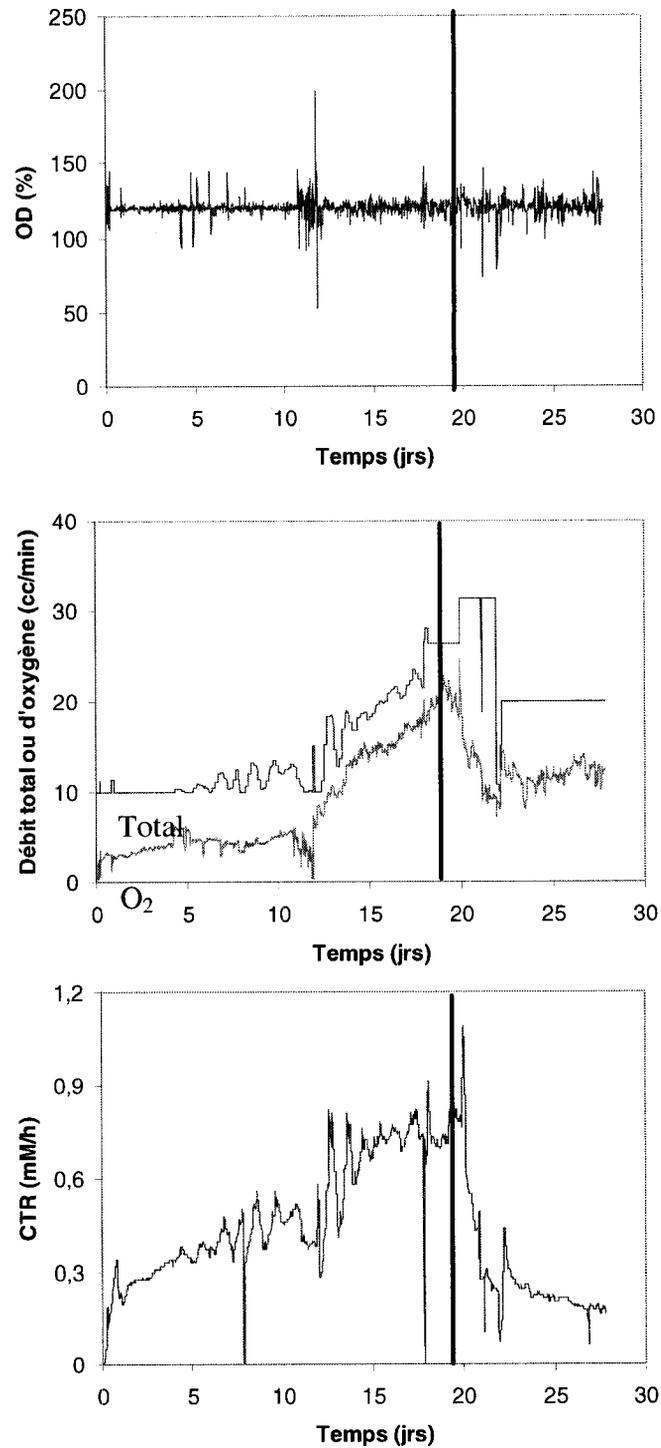


Figure 4.15 : Profils d'OD, des débits gazeux et du taux de transfert du CO₂.
Ligne verticale : induction du métabolisme secondaire.

4.2.4. Cinétiques de production en fonction de la concentration de glucose

L'objectif de cette expérience est d'observer l'effet de la concentration du glucose sur la production des TIA. Deux raisons ont justifié le choix du glucose préférentiellement au sucrose. La première est que le sucrose subit une hydrolyse rapide par les cellules et donc, il est impossible de le maintenir constant sans accumulation de glucose et fructose. De plus, l'utilisation d'un glucosimètre permet d'obtenir les concentrations en glucose très rapidement ce qui facilite son maintien dans le milieu. L'effet de la concentration en glucose a été investigué selon trois modalités : 30, 60 et 90 g L⁻¹. Une pompe péristaltique ajoute une solution de 400 g L⁻¹ en glucose afin de maintenir la concentration ciblée. Cette pompe est ajustée manuellement à tous les jours.

La Figure 4.16 présente les taux de production maximum en fonction de la concentration en glucose. Les taux de production de la tryptamine et de la tabersonine en fonction de la concentration de glucose semblent suivre une tendance sigmoïdale telle qu'observée par Schlatmann et al. (1995) pour l'ajmalicine en fonction du glucose. Aucune différence significative n'est visible entre les taux de production à 30 et 60 g L⁻¹. Par contre, ceux-ci sont nettement plus faibles à une concentration de 90 g L⁻¹. Une équation de

forme sigmoïdale est donc proposée pour relier le taux de production d'ajmalicine à la concentration de glucose

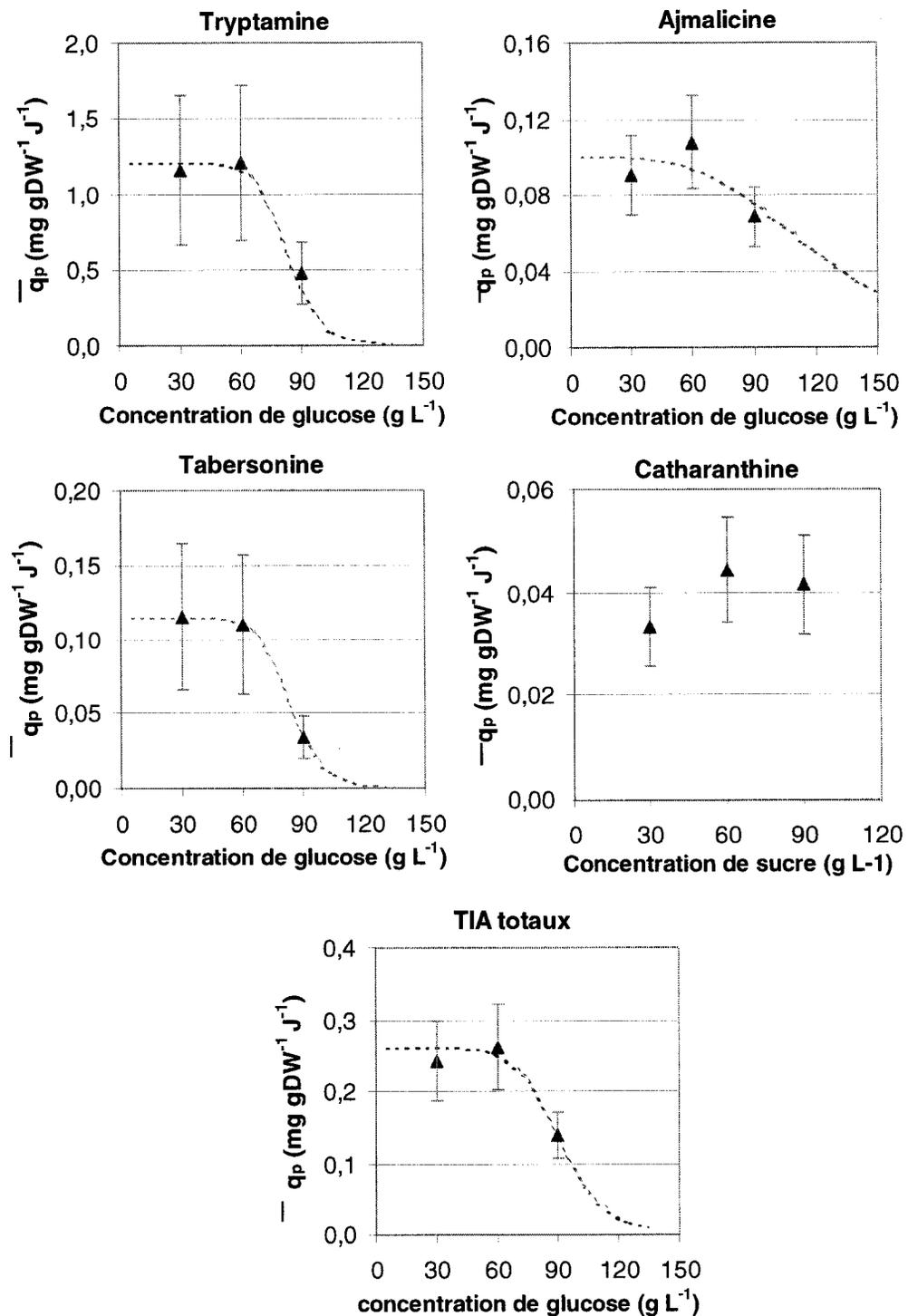


Figure 4.16: Taux de production maximum (q_p) en fonction de la concentration en glucose. ■ : ajmalicine ; ◆ : vincamine; ▲ : tabersonine; ● : catharanthine ; x : TIA totaux. - - - : Estimation.

La forme l'équation sigmoïdale est la suivante :

$$\overline{q_p} = \overline{q_p^{\max}} \left(1 - \frac{C_s^n}{C_s^n + K_{s.p}^n} \right) \quad 4.1$$

où :

$\overline{q_p}$ = taux de production maximum (moyenne sur trois points) pour une concentration de glucose

$\overline{q_p^{\max}}$ = taux de production maximum (moyenne sur trois points) toutes concentrations confondues

C_s = concentration de glucose

$K_{s,p}$ = concentration d'inhibition du glucose

n = exposant sigmoïdal

Cette équation ne peut être appliquée dans le cas de la catharanthine car les taux de production maximum et les rendements pour les trois concentrations ne sont pas statistiquement différents. Par contre, une relation sigmoïdale peut être utilisée pour représenter l'évolution des taux de production de la tryptamine, de la tabersonine, de l'ajmalicine et des TIA totaux en fonction de la concentration de glucose. Ces relations sont représentées en pointillée sur les graphiques à la Figure 4.16.

La recherche des valeurs des paramètres de l'équation a été réalisée par une régression non-linéaire basée sur la minimisation du carré de l'erreur. Ces valeurs sont présentées au Tableau 4.1. Comme la variation du taux de production des TIA totaux en fonction de la concentration en glucose est principalement influencée par la tabersonine, il n'est pas surprenant que les valeurs des paramètres $K_{s,p}$ et n soient identiques pour la tabersonine et les TIA totaux.

Tableau 4.1 : Paramètres de l'équation sigmoïdale pour les taux de production maximum

	$\overline{q_p^{\max}}$ (mg gDW ⁻¹ J ⁻¹)	$K_{s,p}$ (mg L ⁻¹)	n
Tryptamine	0.26	90	8
Ajmalicine	0.10	120	4
Tabersonine	0.12	82	10
TIA totaux	1.21	82	10

La même approche peut être utilisée pour analyser les rendements maximum en fonction de la concentration de glucose (Figure 4.17). Les valeurs des paramètres sont présentés au Tableau 4.2. Encore une fois, les paramètres $K_{s,p}$ et n pour la tabersonine et les TIA totaux sont très proches.

Tableau 4.2 : Paramètres de l'équation sigmoïdale pour les rendements maximum

	$\overline{q_p^{\max}}$ (mg gDW ⁻¹ J ⁻¹)	$K_{s,p}$ (mg L ⁻¹)	n
Tryptamine	6	75	4
Ajmalicine	11	4	120
Tabersonine	11	82	10
TIA totaux	26	90	8

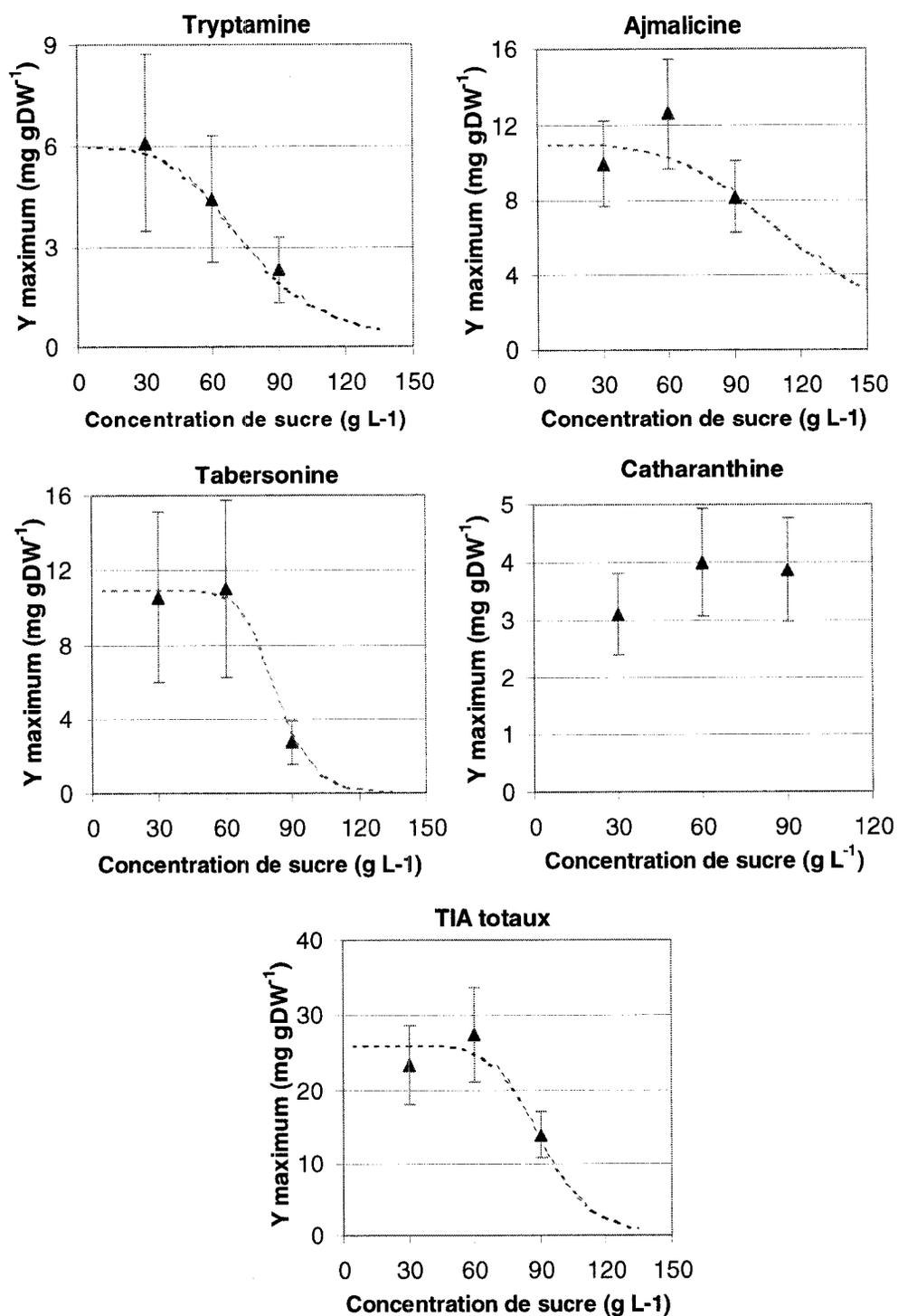


Figure 4.17: Rendement maximum en fonction de la concentration en glucose. ■ : ajmalicine; ◆ : vincamine; ▲ : tabersonine; ● : catharanthine ; x : TIA totaux . - - - : Estimation.

Les taux de production et les rendements permettent de déduire que la concentration de glucose semble influencer principalement la production de tabersonine et de tryptamine. Selon les relations identifiées pour les taux de production maximum et les rendements maximum en fonction des concentrations en glucose, une plage d'opération entre 30-60 g L⁻¹ est souhaitable afin de favoriser la production de tabersonine. Cette conclusion est appuyée par les profils de taux de transfert de CO₂ présentés à la Figure 4.18. Le CTR est une bonne mesure du métabolisme cellulaire. Lors du maintien de la concentration de glucose à 90 g L⁻¹, le CTR diminue tout au long de la phase de production alors qu'il est constant pour les concentrations de 30 et 60 g L⁻¹. Il est possible d'en conclure que cette concentration inhibe l'activité métabolique cellulaire.

Les cinétiques de production de cette expérience sont présentés à la Figure 4.19. Les erreurs sur les mesures de production ont été établis en comparant la production de trois bioréacteurs ayant des conditions d'opérations identiques. Des pourcentages d'erreurs fixes ont pu être calculés pour chacune des molécules étudiées, soient la tryptamine (38%), l'ajmalicine (23%), la tabersonine (43%), la catharanthine (23%) et les TIA totaux (23%). Ces pourcentages sont utilisés par la suite pour approximer l'erreur sur la mesure de tous les autres bioréacteurs.

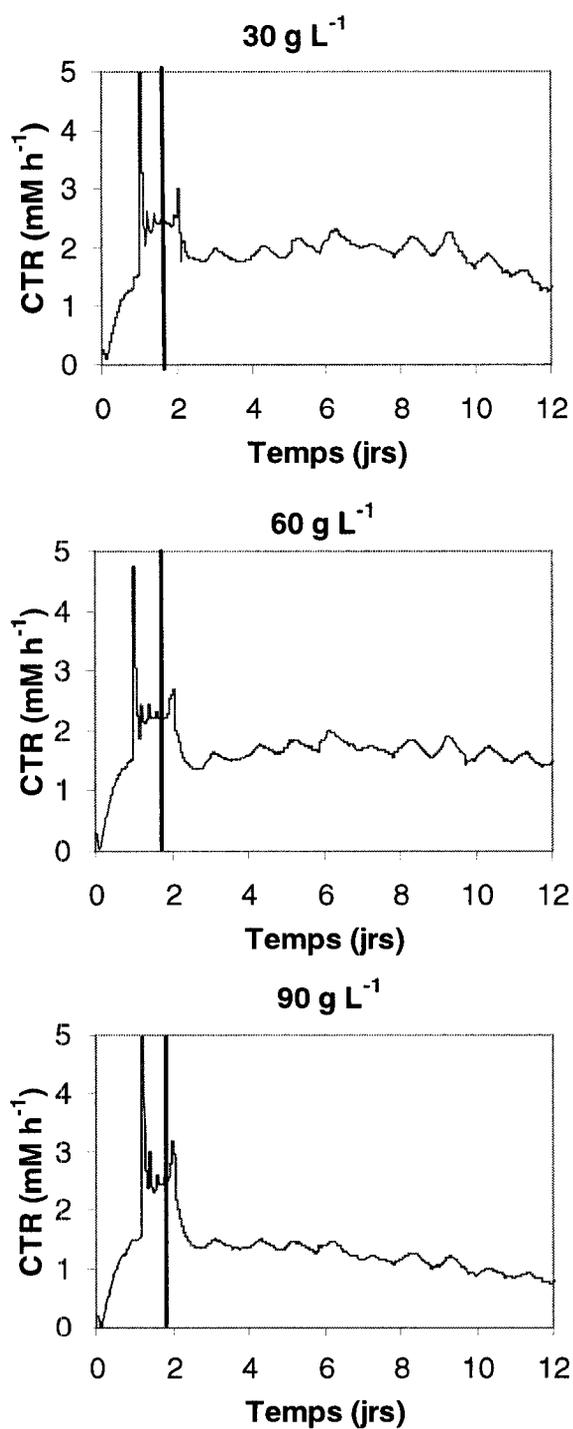


Figure 4.18 : Profils des taux de transfert de CO₂ (CTR) pour les trois concentrations en glucose. Ligne verticale : induction du métabolisme secondaire.

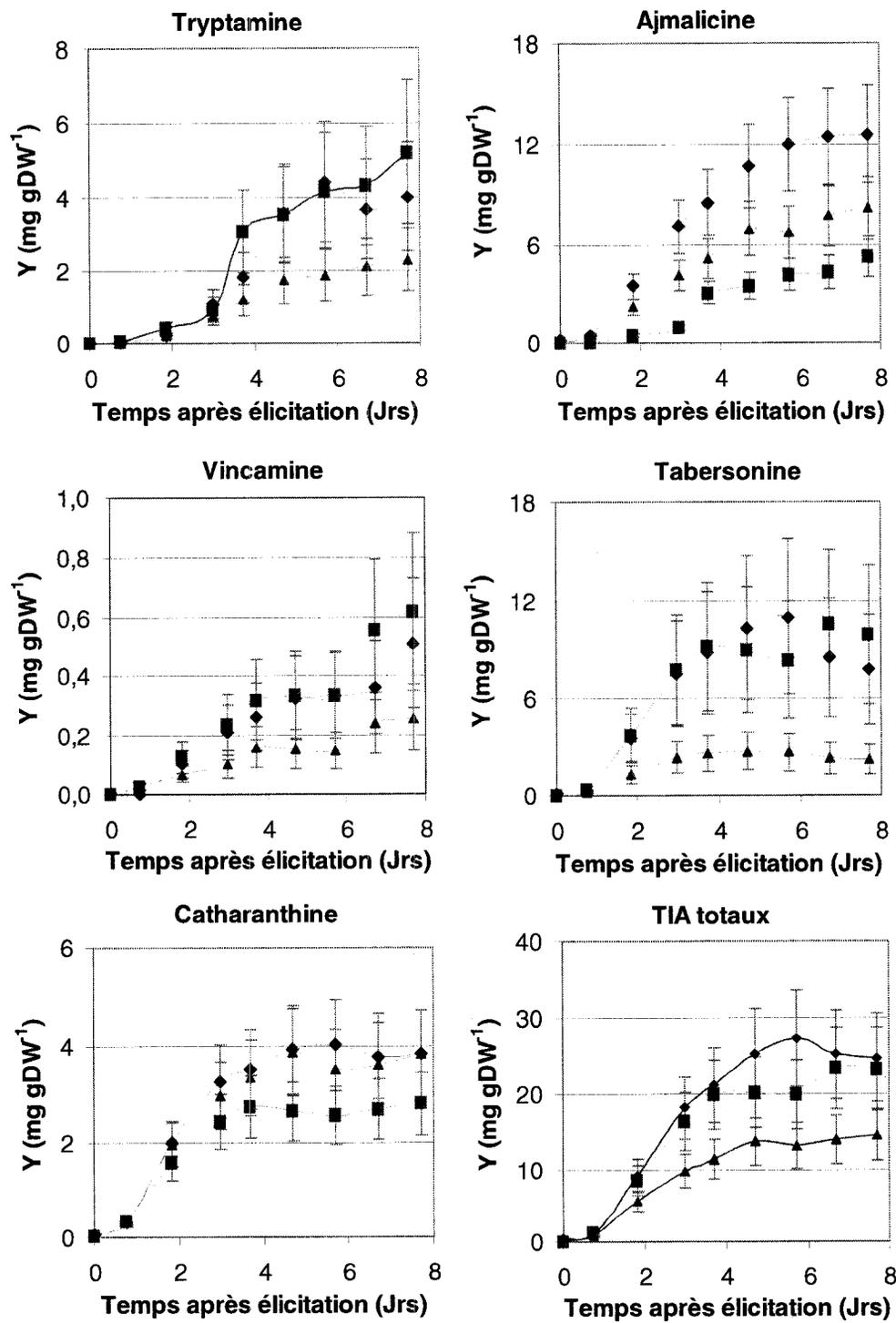


Figure 4.19: Cinétique de production en fonction de la concentration en glucose. ■ : 30 g/L ♦ : 60g/L ; ▲ : 90 g/L.

À la figure 4.19, il est possible d'évaluer la durée effective de production à environ 4 jours. Une limitation nutritionnelle pourrait être à l'origine de l'arrêt de la production. Le PO_4^{3-} est un nutriment qui pourrait être limitant dans le cas de ces cultures. En effet, la stratégie d'ajouts implantée dans le cas de ces trois cultures n'implique pas d'ajouts de phosphate. L'épuisement en précurseur pourrait aussi expliquer la baisse de production. La présence d'inhibiteur(s) pourrait aussi être la cause de cet arrêt de production. L'inhibiteur pourrait être un TIA ou encore une autre molécule produite lors de la réaction d'induction du métabolisme secondaire. Une pénurie de sécologanine empêcherait la formation de strictosidine et donc de tous les autres TIA. Plusieurs auteurs rapportent que la formation de la sécologanine pourrait être une étape limitante dans la formation de TIA (Moreno et al., 1993, Verpoorte et al., 1997). Cette hypothèse expliquerait aussi la hausse importante de tryptamine entre les jours 3 et 4 de la période de production. En effet, en absence de sécologanine, la tryptamine ne peut être condensé en strictosidine.

4.2.5. Ajout de phosphate en production

L'expérience sur l'influence de la concentration de glucose a permis d'énoncer plusieurs hypothèses pour expliquer l'arrêt de production 4 jours après l'induction du métabolisme secondaire. L'une de celles-ci est que le phosphate pourrait être un nutriment limitant puisqu'il est absent du milieu

extracellulaire durant la phase de production. L'objectif de ce test est donc d'étudier l'effet d'un ajout de phosphate dans la phase de production. Pour ce faire, trois cultures en bioréacteurs ont été réalisées. Dans la première, aucun ajout de phosphate n'a été effectué. Trois ajouts consécutifs de 0.1 mM de NaH_2PO_4 ont été faits dans les deux autres cultures. Dans un cas, ces ajouts ont été faits le 5^{ième}, 6^{ième} et 7^{ième} jour après l'induction et dans l'autre cas, les ajouts ont eu lieu les jours 7,8 et 9. Le temps des ajouts de phosphate a été établi en se basant sur des expériences précédentes afin d'ajouter le phosphate durant et après la phase de production réelle.

Les Figures 4.20 et 4.21 présentent respectivement les taux de production maximum et les rendements maximum en fonction des ajouts de PO_4^{3-} . Ces figures montrent que l'ajout de phosphate dans les conditions de cette expérience n'a aucun effet sur les taux de production maximum et les rendements maximum pour chacun des TIA. Les profils de respiration (annexe D) reflètent aussi cette conclusion. Comme le démontre la Figure 4.22, la phase de production soutenue se déroule dans les quatre premiers jours comme lors du test précédent. Il serait intéressant de recommencer cette expérience et d'ajouter le phosphate durant la phase de production soutenue. Pour ce faire, il faudrait avoir les analyses de production en temps quasi-réel.

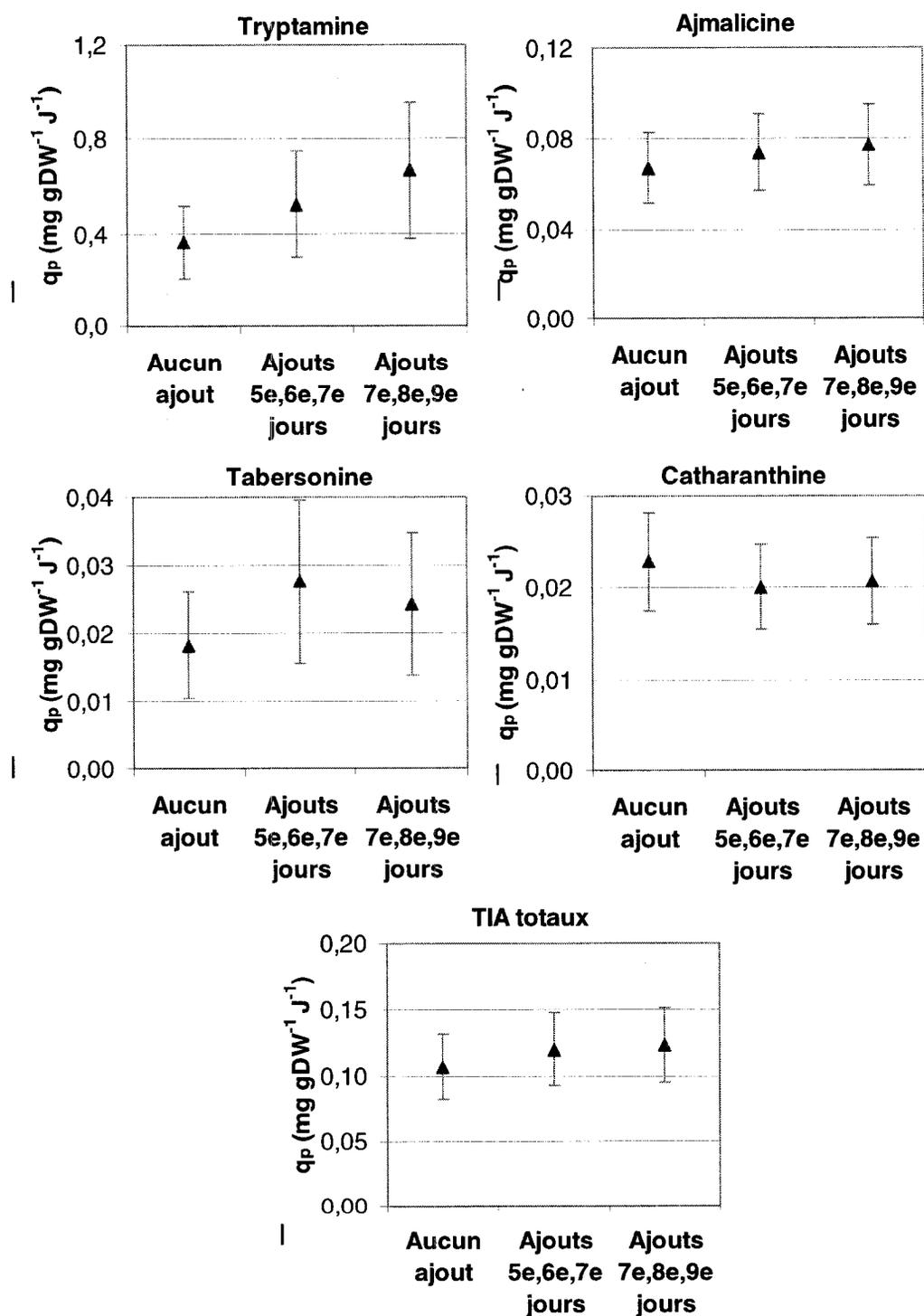


Figure 4.20: Taux de production maximum en fonction des stratégies d'ajouts de phosphate. ■ : ajmalicine ; ◆ : vincamine; ▲ : tabersonine; ● : catharanthine ; x : TIA totaux.

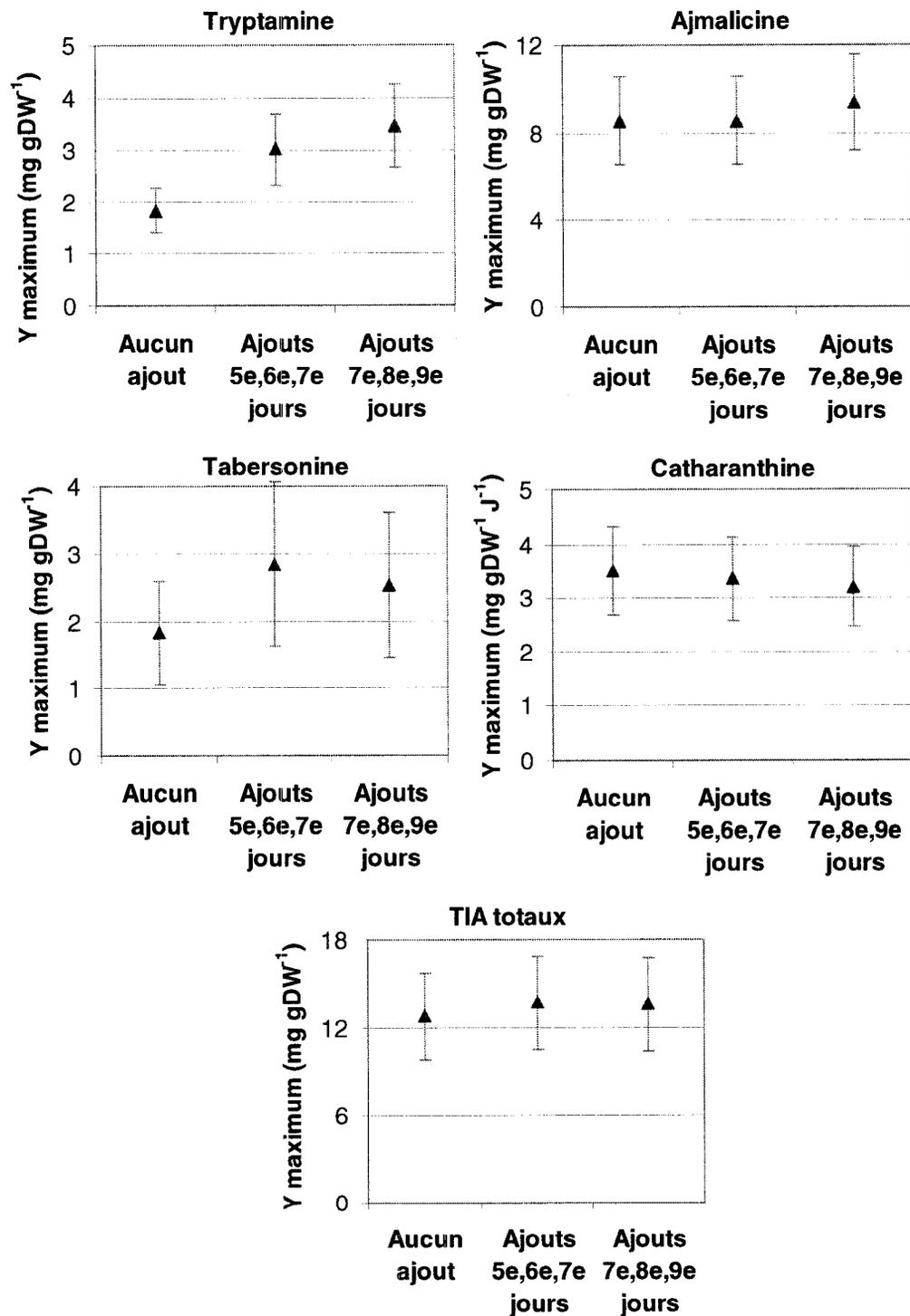


Figure 4.21: Rendements maximums en fonction des stratégies d'ajout de phosphate. ■ : ajmalicine ; ◆ : vincamine; ▲ : tabersonine; ● : catharanthine ; x : TIA totaux .

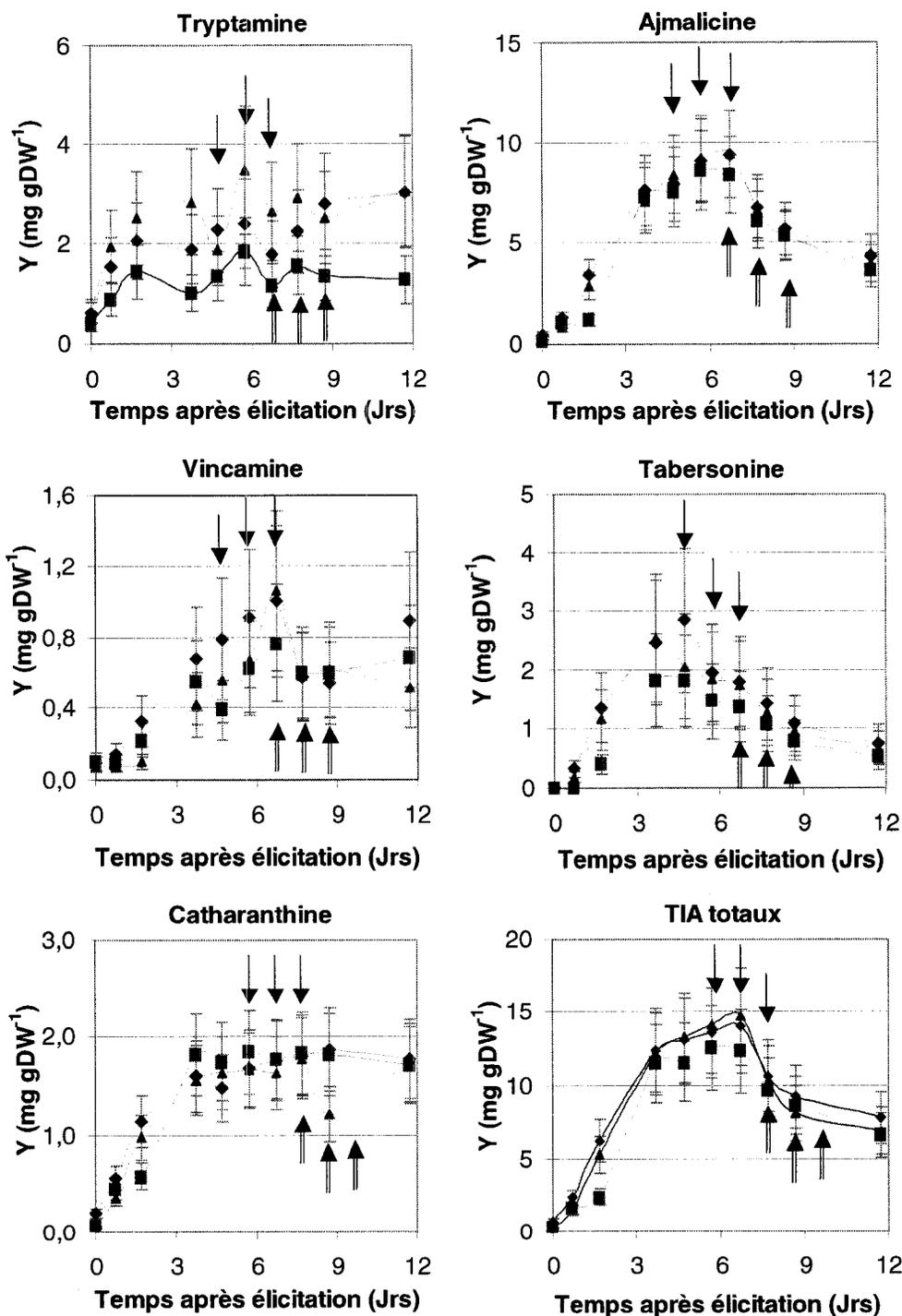


Figure 4.22: Cinétiques de production en fonction de la stratégie d'ajout de phosphate. ■ : aucun ajout ; ♦ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 5^e, 6^e et 7^e jours; ▲ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 7^e, 8^e et 9^e jours; ↓ et ↑ : ajouts de phosphates .

D'autre part, un bilan de masse entre la concentration de phosphate ajouté et le phosphate intracellulaire permet de quantifier le pourcentage relatif de phosphate ajouté. Selon les calculs, chaque ajout de phosphate correspond à environ 20% la concentration de phosphate intracellulaire. La Figure 4.23 présente les mesures de phosphate intracellulaire des trois cultures. Les concentrations des autres ions intracellulaires peuvent être visualisées à l'Annexe E.

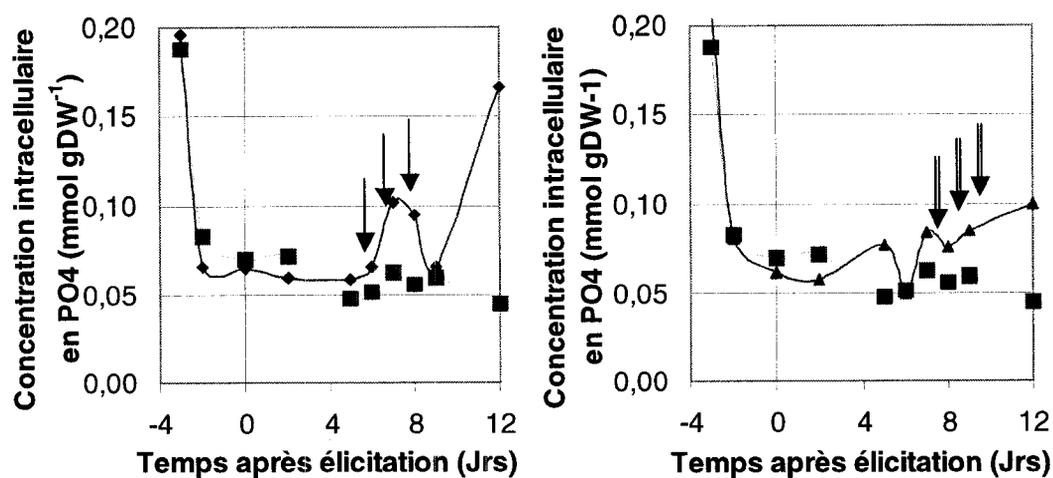


Figure 4.23 : Profil de phosphate intracellulaire. ■ : aucun ajout ♦ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 5^e, 6^e et 7^e jours ; ▲ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 7^e, 8^e et 9^e jours. Les flèches montrent les ajouts de phosphate.

Cette figure montre qu'il y a définitivement une hausse du phosphate intracellulaire après les ajouts ponctuels. Toutefois, ces hausses sont relativement faibles par rapport à la concentration en phosphate intracellulaire en mode de croissance (à t=-3 jours). Il est probable que les

ajouts effectués lors de ce test n'ont pas suffi pour obtenir une réaction visible sur les taux de production ou les rendements. Une étude complète afin de développer une stratégie d'ajouts de phosphate pourrait être réalisée pour compléter celle-ci.

4.2.6. Comparaison de stratégies d'ajouts de nutriments

Cette expérience permet de comparer la phase de production de trois stratégies d'ajouts de nutriments. La première stratégie est de type cuvée, c'est-à-dire qu'aucun nutriment n'est ajouté durant la phase de production. La deuxième stratégie est de type cuvée alimentée à une pompe. Elle implique une pompe péristaltique ajoutant une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{Citrate}$ et des ajouts ponctuels pour les autres nutriments. La pompe permet de maintenir l'ammonium extracellulaire entre 2 et 4 mM. La troisième stratégie est de type cuvée alimentée à deux pompes. Elle comporte une pompe péristaltique ajoutant une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{Citrate}$ et une seconde ajoutant du glucose. Ces pompes permettent de maintenir un niveau d'ammonium entre 2 et 4 mM et un niveau de glucose à 60 g L^{-1} .

Les Figures 4.24 et 4.25 présentent les taux maximum de production ainsi que les rendements maximum pour chacune des cultures. La production de tryptamine ne semble pas être influencée par le type de culture utilisé en production. Par contre, les valeurs maximales pour l'ajmalicine, la

tabersonine et la catharanthine sont significativement différentes pour chacune des stratégies. Le bioréacteur opéré en mode cuvée semble être celui qui est le plus efficace. En effet, ce type de culture génère les meilleurs taux de production ainsi que les meilleurs rendements pour chacun des TIA.

La Figure 4.26 expose les profils de production pour les trois stratégies d'ajout de nutriments. Cette figure montre que la stratégie d'ajout de nutriments de type cuvée génère de plus haut rendement pour chacun des TIA. Cette figure nous permet aussi d'obtenir des informations sur la durée de la phase de production intense. Comme pour toutes les expériences précédentes, il est possible de remarquer que la durée de la phase de production intense est de 4 à 6 jours. La stratégie d'ajout de nutriments ne semble donc pas influencer la durée de la phase de production. En fait, il existe probablement un facteur limitant non-mesuré qui arrête la production de TIA. Ce facteur pourrait être une limitation en sécologanine (précurseur terpenoïque) ou encore l'apparition d'un quelconque inhibiteur.

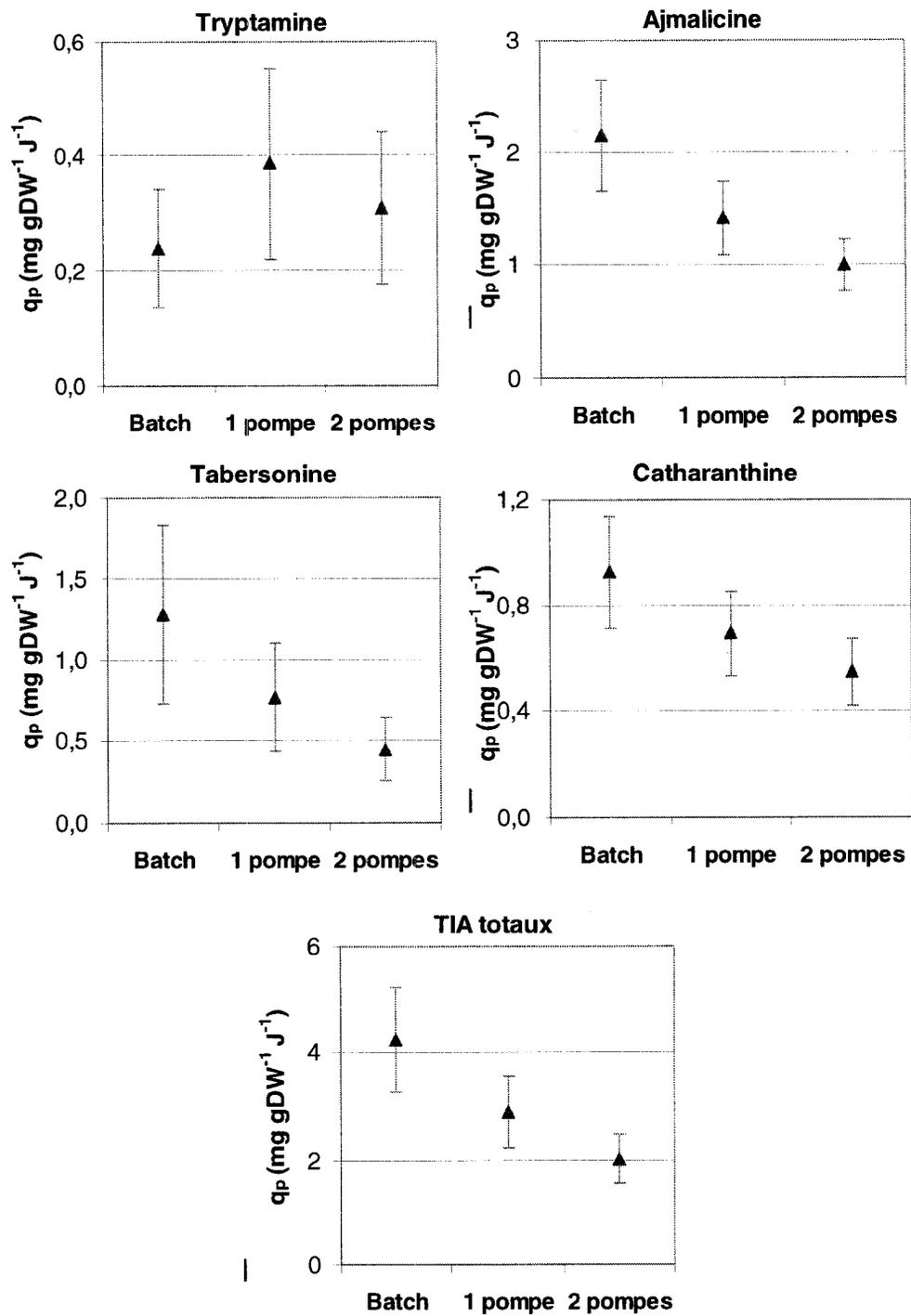


Figure 4.24: Taux de production maximums en fonction de la stratégie d'ajout de nutriments. ■ : ajmalicine ; ◆ : vincamine; ▲ : tabersonine; ● : catharanthine ; x : TIA totaux.

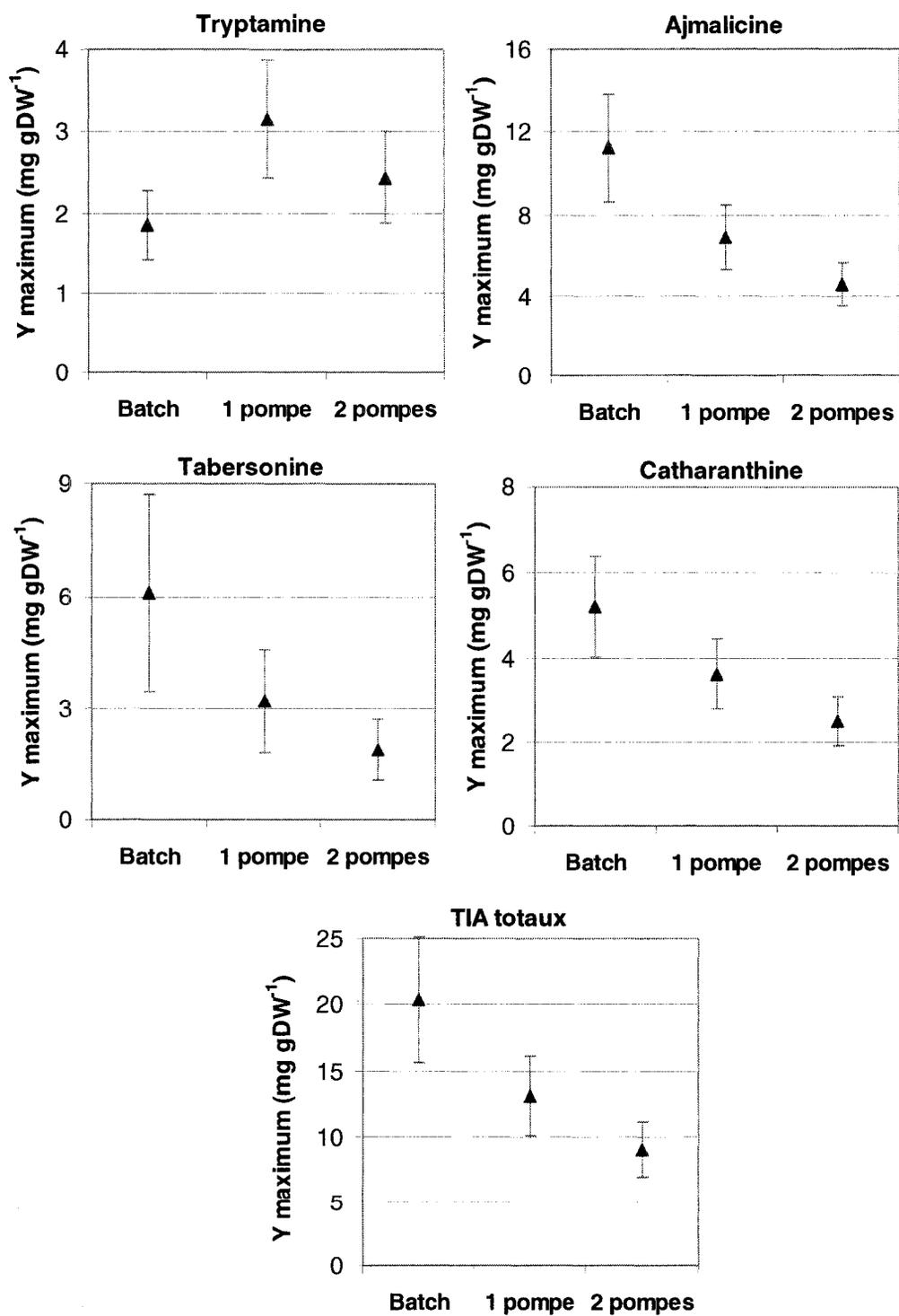


Figure 4.25: Rendements maximums en fonction de la stratégie d'ajout en nutriments. ■ : ajmalicine; ♦ : vincamine; ▲ : tabersonine; ● : catharanthine; x : TIA totaux.

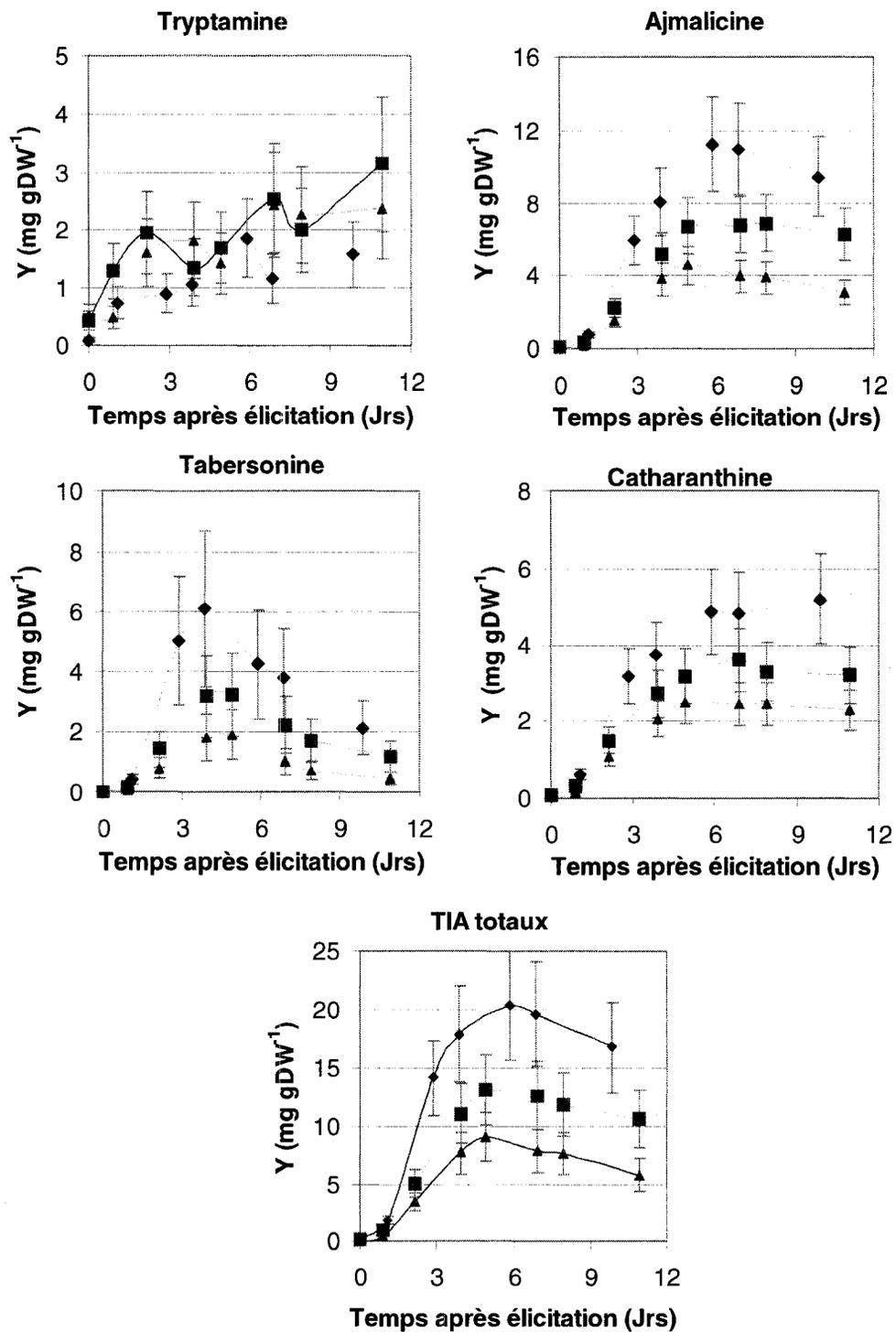


Figure 4.26: Rendements (Y) en fonction de la stratégie d'ajout de nutriments. ◆ : cuvée ■ : cuvée alimentée une pompe ; ▲ : cuvée alimentée avec 2 pompes.

4.3. Étude comparative

4.3.1. Comparaison des différentes expériences

Chacune des expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire a permis d'énoncer des conclusions individuelles ou encore, d'établir des pistes de recherches intéressantes. La mise en commun de toutes ces expériences permet d'évaluer l'apport concret de cette étude sur les rendements en TIA et d'étudier la répétabilité des expériences. Une comparaison des rendements de chacun des TIA pour les expériences menées en bioréacteurs dans le cadre de ce mémoire est réalisée à la Figure 4.27.

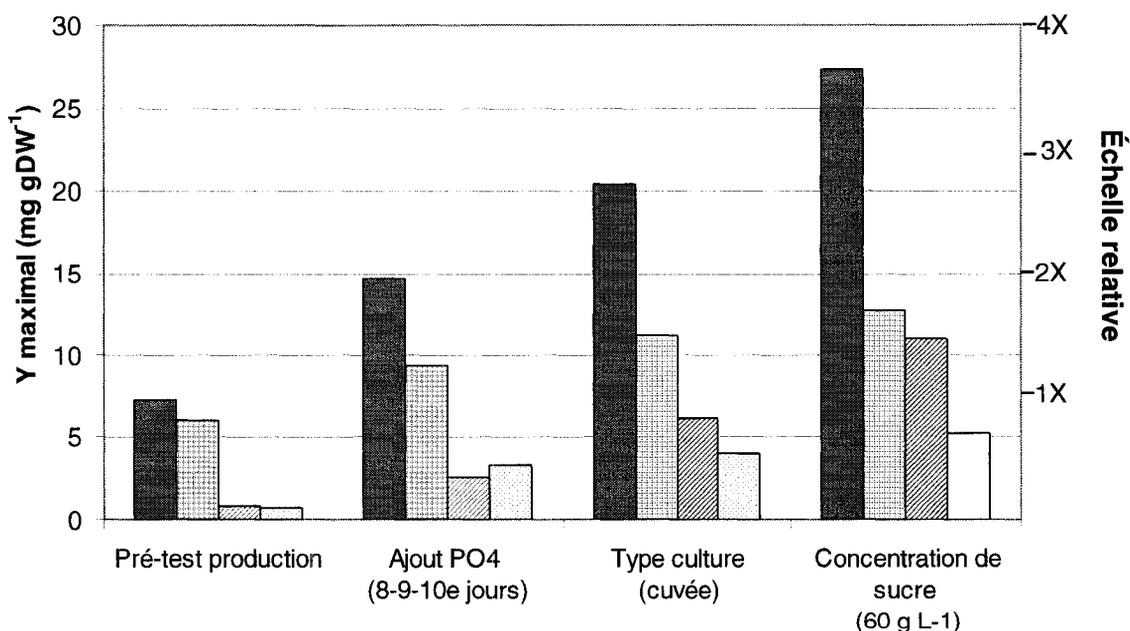


Figure 4.27 : Comparaison des rendements (Y) maximum en bioréacteurs. ■ : TIA totaux, ▨ : ajmalicine, ▩ : tabersonine, □ : catharanthine.

L'échelle relative présentée sur ce graphique représente un facteur d'augmentation des rendements en TIA totaux par rapport au pré-test de production.

Ces expériences ont permis d'augmenter les rendements en TIA totaux d'environ 375% pour les expériences réalisées en bioréacteurs (27.3 mg gDW⁻¹ par rapport à 7.3 mg gDW⁻¹ pour le pré-test de production). Plus précisément, les rendements se sont accrus pour ajmalicine (213%), tabersonine (1426%) et catharanthine (767%).

Une comparaison des rendements de chacun des TIA pour les expériences menées en flacons est réalisée à la Figure 4.28. Ce graphique permet de voir que les rendements TIA totaux en flacons ont atteints des valeurs de 15,5 mg gDW⁻¹ ce qui est la moitié des rendements en bioréacteurs.

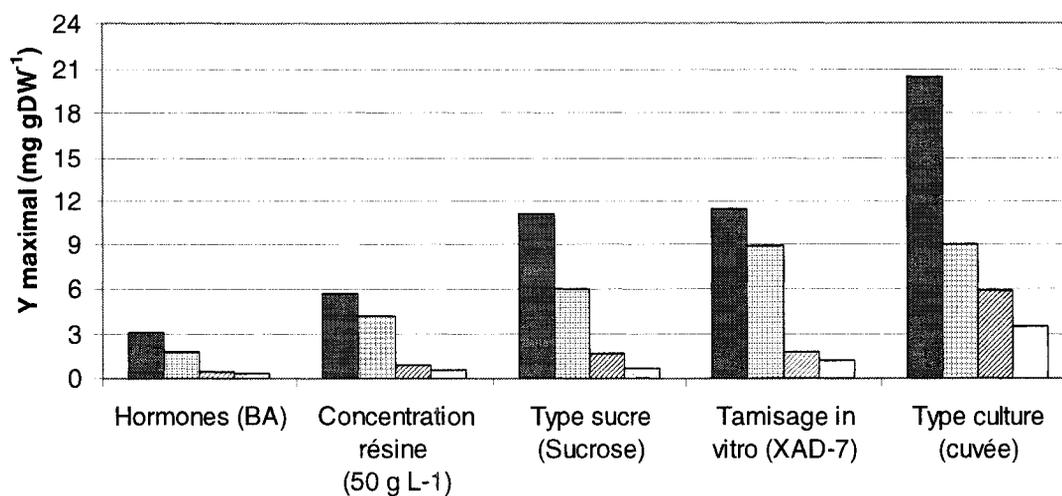


Figure 4.28 Comparaison des rendements (Y) maximales en flacons. ■ : TIA totaux, ▨ : ajmalicine, ▩ : tabersonine, □ : catharanthine.

La répétabilité des expériences a été estimée en comparant des cultures opérées dans les mêmes conditions expérimentales lors d'expérience différente. Cette situation s'est présentée à deux reprises pour les cultures en bioréacteurs. Dans un premier temps, il est possible de comparer les rendements en TIA totaux d'une culture réalisée dans le cadre de l'expérience sur l'influence d'ajouts de phosphate en production (section 4.2.5) à ceux d'une culture réalisée dans le cadre de l'expérience sur l'influence de la stratégie d'ajout en production (section 4.2.6). Les conditions expérimentales de ces deux cultures étaient identiques. Le Tableau 4.3 présente les rendements en TIA totaux de ces deux cultures.

Ce tableau semble démontrer que la répétitivité des rendements en TIA totaux en bioréacteurs est bonne (environ 5% d'écart).

Tableau 4.3 : Comparaison de cultures réalisées lors de différentes expériences.

Expérience cadre	Rendements TIA totaux (mg gDW ⁻¹)	Conditions d'opérations
Influence de l'ajout de phosphate	13.2	Ajout ponctuel Cuvée alimentée à 1 pompe Ammonium (2-4 mM)
Influence de la stratégie d'ajout en nutriments	12.5	Aucun ajout de phosphate

Dans un deuxième temps, il est possible de comparer une culture réalisée dans le cadre de l'expérience sur l'influence de la concentration de glucose (section 4.2.4) et une culture réalisée dans le cadre de l'expérience sur l'influence des stratégies d'ajouts de nutriments (section 4.2.6). Les conditions expérimentales de ces deux cultures étaient identiques. Les rendements de ces deux cultures sont présentés au Tableau 4.4.

Tableau 4.4 : Comparaison de cultures réalisées lors de différentes expériences.

Expérience cadre	Rendements TIA totaux (mg gDW ⁻¹)	Conditions d'opérations
Influence de la concentration de glucose	27.3	Ajout ponctuel Cuvée alimentée à 2 pompes
Influence de la stratégie d'ajout en nutriments	9.1	Ammonium (2-4 mM) Glucose (60 g L ⁻¹) Aucun ajout de phosphate

Contrairement à la première comparaison, les rendements en TIA totaux de ces deux cultures sont très différents. Il est donc possible de penser qu'il existe un problème de répétabilité dans certaines expériences.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce problème de répétabilité. Premièrement, il se peut qu'un facteur externe influence la productivité en métabolites secondaires. Un facteur externe est défini comme n'importe quel facteur non-mesuré qui influence la production. Par exemple, la quantité totale d'ajout ainsi que les concentrations en vitamine et en micronutriments sont des bons exemples de facteur externe. Deuxièmement, l'état physiologique des cellules à l'élicitation est un paramètre qui influence la production des métabolites secondaire (Sarrailh, 2004). L'état physiologique représente une foule de facteur comprenant les concentrations extra et intracellulaire en nutriments, les réserves intracellulaire, en précurseurs et en TIA ainsi que certaines caractéristiques cellulaires (taille des cellules, contenu en protéines, contenu en lipides, etc). Ces paramètres peuvent varier selon les traitements que subissent les cellules avant les expériences. Troisièmement, la survie au choc de l'induction pourrait être différente selon l'expérience.

Une comparaison des profils de taux de transfert du CO_2 permet de soutenir les deux dernières hypothèses. La Figure 4.29 montre les taux de transfert

de CO_2 pour différentes expériences en bioréacteurs. Les bioréacteurs obtenant les meilleurs rendements en TIA ont un profil de CTR constant ou avec une légère pente (graphique a); plus les rendements sont bas, plus la pente est prononcée (graphique b et c). Comme le CTR diminue en fonction de l'activité métabolique cellulaire, une baisse de CTR pourrait être associée à la mortalité suite au choc d'induction ou encore au ralentissement du métabolisme causé par l'épuisement de précurseurs ou de nutriments intracellulaires.

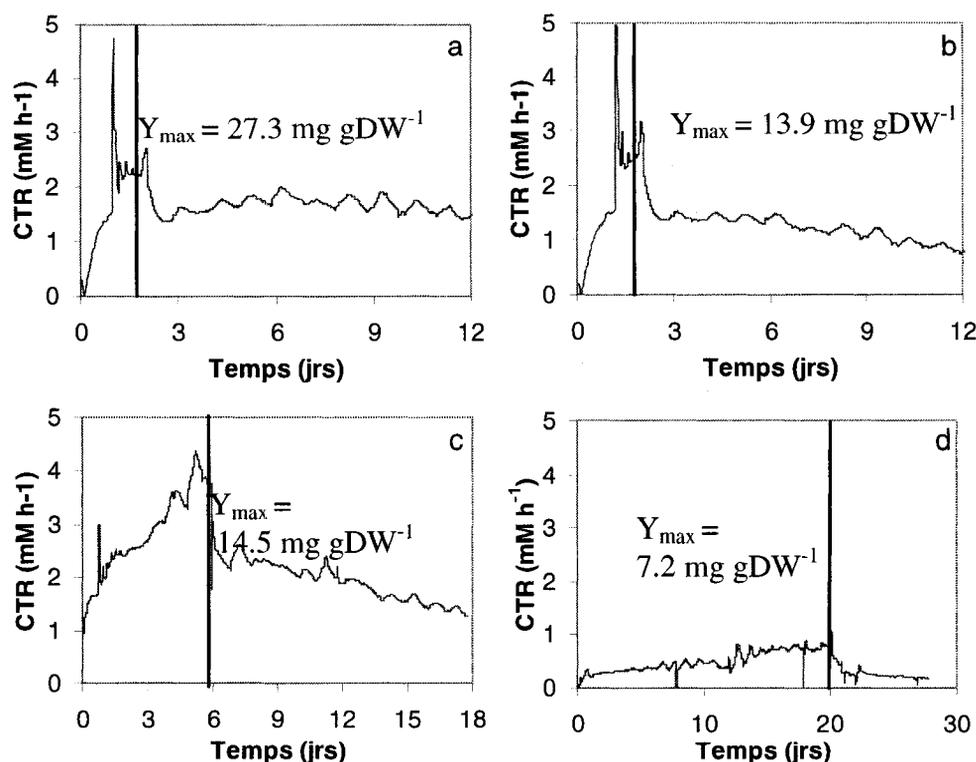


Figure 4.29 : Comparaison des taux de transfert de CO_2 pour différentes cultures. a : Effet de la concentration de glucose maintenue à 60 g L^{-1} . b : Effet de la concentration de glucose maintenue à 90 g L^{-1} . c : ajout de phosphate aux jours 6,7 et 8 de la phase de production. d : Test de pré-production.

La comparaison des rendements de 5 cultures opérées dans les mêmes conditions expérimentales et réalisées dans le cadre d'expériences différentes renforce les conclusions déduites lors de l'étude comparative des bioréacteurs. Ces rendements sont disponibles au Tableau 4.5.

Tableau 4.5 : Comparaison de cultures en flacons réalisées dans différentes expériences.

Expérience cadre	Rendement TIA totaux (mg gDW ⁻¹)	Conditions d'opération
Influence du régime hormonal	0.68	Hormones de croissances
Influence de la concentration de résine XAD-7	2.5	2.4-D (1 mg L ⁻¹) kinetin (0.1 mg L ⁻¹)
Influence du type de sucre	2.5	Sucre glucose (50 g L ⁻¹)
Choix de la résine en culture	11.4	Résine XAD-7 (100 g L ⁻¹)
Influence du temps d'ajout de la résine XAD-7	13.8	Temps d'ajout résine 3 H

Comme la culture en flacons ne permet pas le contrôle de certains paramètres important tel que l'OD, l'agitation et la concentration de nutriments, le problème de répétabilité est amplifié. Malgré tout, les hypothèses suggérées pour expliquer la variation des rendements dans les bioréacteurs sont aussi valides dans le cas des flacons.

Dans l'optique de l'élaboration d'un bioprocédé efficace de production de TIA, le problème de répétabilité devrait être étudié en détail. La caractérisation des réserves intracellulaires en précurseur et en nutriments

ainsi que l'identification d'une méthode de mesure de la mortalité pourraient cerner la source de ce problème.

Cette étude comparative a démontré que, même si des conclusions peuvent être tirées de chacune des expériences individuelles réalisées dans des conditions d'opérations similaires, il est difficile de comparer les rendements entre chacune des expériences.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

L'objectif général de ce mémoire était d'étudier la phase de production afin de déterminer les paramètres d'un bioprocédé efficace. Afin de rencontrer cet objectif, une étude sur la phase adsorbante a d'abord été réalisée. Ensuite, une étude sur les paramètres nutritionnels et hormonaux a été effectuée. Finalement, une étude comparative a permis de mettre en perspective les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire.

Les différents tests réalisés sur la phase adsorbante permettent d'énoncer plusieurs suggestions pour l'établissement du bioprocédé. L'utilisation de la résine XAD-7 comme phase adsorbante du bioprocédé est préconisée. En effet, son efficacité supérieure pour l'adsorption des TIA a été prouvée par plusieurs tests. De plus, les propriétés physiques de la XAD-7 (densité, diamètre moyen des particules, etc.) permettent une séparation plus facile de la biomasse. Cet aspect lui confère un avantage dans l'optique d'un bioprocédé continu ou automatisé. De plus, cela facilite les étapes ultérieures de récupération des produits. Le temps optimal d'ajout de la résine dépend de l'inducteur. Dans le cas de la chitine, un ajout entre 3 et 5 heures après l'élicitation génère les meilleurs rendements. Pour l'induction au méthyle jasmonate, l'ajout de cette résine devrait être fait entre 5 min et 3 heures après l'induction. L'effet de la concentration de la résine en flacon

démontre qu'une concentration de 50 g L^{-1} de XAD-7 semble plus efficace. Cette piste de recherche devrait être confirmée en bioréacteur avant son application dans le bioprocédé.

Maintes expériences ont été conduites, afin d'établir les lignes directrices du bioprocédé quant régulateurs de croissances et aux nutriments. D'abord, l'effet des régulateurs de croissance a été étudié. La présence de 2,4-D durant la phase de croissance empêche l'accumulation de TIA avant l'induction sans inhiber l'induction des cellules. Au contraire, la présence de BA ou de NAA durant la croissance semble stimuler l'accumulation de TIA avant la période d'induction puis inhiber l'induction au méthyle jasmonate. Afin de confirmer ces affirmations, il serait opportun d'effectuer des expériences en bioréacteurs. Celles-ci permettraient de suivre les paramètres de croissance et de respiration qui seraient utiles à l'analyse de cette situation.

Le premier paramètre nutritionnel étudié dans ce mémoire est l'influence de la source de carbone utilisé en production. Cette expérience suggère l'utilisation de sucrose dans le bioprocédé afin d'améliorer les rendements en TIA. Malgré cela, l'influence de la concentration de glucose a été étudiée en bioréacteurs. Selon cette étude, les taux de production maximum et les rendements maximum de l'ajmalicine, de la tabersonine et de la tryptamine

suivent une tendance sigmoïdale en fonction de la concentration de glucose dans la plage étudiée. Les taux maximum de production et les rendements maximum de la catharanthine ne semblent pas influencés par la concentration de glucose. Une concentration de glucose entre 30 et 60 g L⁻¹ est donc suggérée afin de favoriser les rendements en ajmalicine et en tabersonine.

L'expérience sur l'effet d'ajout de phosphate en production ne montre pas d'influence de ce paramètre sur les taux de production et les rendements. Par contre, pour éliminer totalement l'hypothèse d'une limitation au phosphate, une autre expérience devrait être effectuée. Dans ce test, les ajouts de phosphate devraient être plus importants et être faits au début de la phase de production (2-3 jours après induction).

L'influence de la stratégie d'ajout des nutriments, semble démontrer qu'une opération de type cuvée serait plus efficace sur les rendements de l'ajmalicine, de la tabersonine et de la catharanthine. Une opération de type cuvée est donc proposée.

Les expériences en bioréacteurs ont permis de déterminer la longueur de la période de production. La production des TIA se fait principalement durant les quatre à six premiers jours après l'induction. Plusieurs hypothèses sont

proposées pour expliquer l'arrêt de la production. Premièrement, une limitation au phosphate n'est pas écartée. Deuxièmement, la présence d'un ou plusieurs inhibiteurs pourrait aussi être la cause de cet arrêt de production. L'inhibiteur pourrait être un TIA ou encore une autre molécule produite lors de la réaction d'induction du métabolisme secondaire. Finalement, l'épuisement en précurseur pourrait aussi expliquer la baisse de production. Une pénurie de sécologanine empêcherait la formation de strictosidine et donc, de tous les autres TIA. La quantification de la loganine et de la sécologanine permettrait de vérifier cette hypothèse.

L'étude comparative a permis de mettre en lumière un problème de répétabilité des rendements en bioréacteurs et en flacons. Sarrailh (2004), observe aussi ce genre de phénomène. Il suggère une influence possible de l'état physiologique à l'élicitation. Il serait primordial d'identifier l'origine de cette variabilité pour assurer la maîtrise du bioprocédé. Malgré tout, l'étude comparative montre une augmentation certaine des rendements en bioréacteur (7.3 mg gDW^{-1} pour le pré-test de production par rapport à 27.3 mg gDW^{-1} pour le test de maintien du glucose).

Globalement, la présente étude a permis de mieux comprendre la phase de production et de découvrir des pistes de recherches intéressantes pour la conception d'un bioprocédé de production de TIA par *Catharanthus roseus*.

BIBLIOGRAPHIE

- AOYAGI, H., YASUHIRA, J., TANAKA, H. 1998. "Alginate promotes production of various enzymes by *Catharanthus roseus* cells ". *Plant Cell Reports*. 17:243-247.
- ASADA, M., SHULER, M. 1989. "Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption in situ, elicitors and alginate immobilization". *Applied microbiology and biotechnology*. 30:475-481.
- BERLIN, J., WITTE, L. 1988. "Formation of mono- and diterpenoids by cultured cells of *Thuja occidentalis*". *Phytochemistry*. 27:1. 127-131.
- BOUYSSOU, H., PAREILLEUX, A., MARIGO, G. 1987. "The rôle of pH gradients across the plasmalemma of *Catharanthus roseus* and its involvement in the release of alkaloids". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 10:91-99.
- BRODELIUS, P., FUNK, C., SHILLITO, R. 1988. "Permeabilization of cultivated plant cells by electroporation for release of intracellularly stored secondary products". *Plant Cell Reports*. 7:186-188.

- BRODELIUS, P., NILSSON, K. 1983. "Permeabilization of immobilized plant cells, resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability.". *European Journal of Microbiology*. 17:275-280.
- BRODELIUS, P., PEDERSEN, H. 1993. "Increasing secondary metabolite production in plant-cell culture by redirecting transport". *Trends in Biotechnology*. 11:1. 30-6.
- BYUN, S.Y., PEDERSON, H., CHIN, C.-K. 1990. "Two-phase culture for the enhanced production of benzophenanthridine alkaloids in cell suspensions of *Eschscholtzia californica*". *Phytochemistry*. 29:10. 3135-3139.
- BYUN, S.Y., PEDERSON, H., CHIN, C.-K. 1990. "Two-phase culture for the enhanced production of benzophenanthridine alkaloids in cell suspensions of *Eschscholtzia californica*". *Phytochemistry*. 29:10. 3135-3139.
- CANEL, C., LOPES-CARDOSO, M.I., WHITMER, S., VAN DER FITS, L., PASQUALI, G., VAN DER HEIJDEN, R., HOGE, J.H., VERPOORTE, R. 1998. "Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*". *Planta*. 205 : 3. 414-9.
- CHOI, J.W., CHO, G.H., BYUN, S.Y., KIM, D.I. 2001. "Integrated

- Bioprocessing for plant cell cultures". *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 72:63-102.
- COLLINS-PAVAO, M., CHIN, C.-K., PEDERSON, H. 1996. "Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia*". *Journal of Biotechnology*. 49:95-100.
- COLLU, G., UNVER, N., PELTENBURG-LOOMAN, A.M.G. , VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R., MEMELINK, J. 2001. "Geraniol 10-Hydroxylase, a Cytochrome P450 Enzyme Involved in Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis". *FEBS Letters*. 508:2. 215-220.
- CONTIN, A., VAN DER HEIJDEN, R., LEFEBER, A.W., VERPOORTE, R. 1998. "The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture." *FEBS Letters*. 434 : 3. 413-6.
- CONTIN, A., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 1999. "Effects of Alkaloid Precursor Feeding and Elicitation on the Accumulation of Secologanin in a *Catharanthus Roseus* Cell Suspension Culture". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56:2. 111-119.
- CORRY, J.P., REED, W.L., CURTIS, W.R. 1993. "Enhanced recovery of solavetivone from *Agrobacterium* transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus* using integrated product extraction". *Biotechnology*

and Bioengineering. 42:503-508.

- DE CAROLIS, E., CHAN, F., BALSEVICH, J., DE LUCA, V. 1990. "Isolation and characterization of a 2-oxoglutarate dependent dioxygenase involved in the second to last step in vindoline biosynthesis. ". *Plant Physiology*. 9:4. 1323-1329.
- DE LUCA, V., BALSEVICH, J., KURZ, W.G.W. 1985. "Acetyl coenzyme A:deacetylvindoline O-acetyltransferase, a novel enzyme from *Catharanthus*. ". *Journal of Plant Physiology*. 121:417-428.
- DE LUCA, V., BALSEVICH, J., TYLER, R.T., EILERT, U., PANCHUK, B.D., KURZ, W.G.W. 1986. "Biosynthesis of indole alkaloids: Developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. ". *Journal of Plant Physiology*. 125:147-156.
- DE LUCA, V., BALSEVICH, J., TYLER, R.T., KURZ, W.G.W. 1987. "Characterization of a novel N-methyltransferase (NMT) from *Catharanthus roseus* plants. Detection of NMT and other enzymes of indole alkaloid biosynthetic pathway in different cell suspension culture systems.". *Plant cell. report*. 6:458-451.
- DE LUCA, V., MARINEAU, C., BRISSON, N. 1989. "Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: Comparison with animal DOPA decarboxylases. ". *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 86:2582-2586.

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

DUTTA, A., PEDERSEN, H., CHIN, C.-K. 1994. "Two-phase culture system for plant cells". *Annals New York Academic of sciences*. 745:251-260.

DYMOV, S.I., VITAVSKAYA, O.A., DEMETSKAYA, A.V., KOSTENYUK, I.A. 1997. "The effect of methyl jasmonate on the biomass increase and intracellular biosynthesis of indole alkaloid in the transgenic culture of *Catharanthus roseus*". *Cytology and genetics*. 31:3. 14-18.

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

FAHN, W., LAUBERMAIR, E., DEUS-NEUMANN, B., STOCKIGT, J. 1985. "S-Adenosyl-L-methionine:11-O-demethyl-17-O-deacetylvindoline 11-O-methyltransferase and unspecific acetyltransferase". *Plant cell report*. 4:337-340.

FELIX, H., BRODELIUS, P., MOSBACK, K. 1981. "Enzyme activity of the

primary and secondary metabolism of simultaneously permeabilized and immobilized plant cells". *Analytical Biochemistry*. 116:462-470.

FORTIER M. 2004. "*Mise a l'échelle de bioréacteur de 5 L a 150 L pour la culture la culture de cellule végétale.*". Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

FREEMAN, A., WOODLEY, J.M., LILY M.D. 1993. "In situ product removal as a toll for bioprocessing". *Bio/Technology*. 11:1007-1012.

FUJITA, Y., HARA, Y., OGINO, T., SUGA, S. 1981. "Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*". *Plant Cell Reports*. 46:59-60.

FURMANOWA, M., GLOWNIAK, K., SYKLOWSKA-BARANEK, K., ZGORKA, G., JOZEFczyk, A. 1997. "Effect of pocloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumualtion in callus culture of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 49:75-79.

GALIPEAU, S. 2001. "*Optimisation de la séparation des résines et de leur extraction. Projet de Fin d'étude*". Projet de Fin d'étude, École Polytechnique de Montréal, Canada.

GAMBORG, O.L. 1982. " *Chapter 1: Callus and cell culture. Plant tissue culture methods*". 2e edition, National Research Council of Canada,

Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

GERTLOWSKI, C., PETERSEN, M. 1993. "Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 34:183-190.

GODOY-HERNANDEZ, G.C., VAZQUEZ-FLOTA, F.A., LOYOLA-VARGAS, V.M. 2000. "The Exposure to Trans-Cinnamic Acid of Osmotically Stressed *Catharanthus Roseus* Cells Cultured in a 14-1 Bioreactor Increases Alkaloid Accumulation". *Biotechnology Letters*. 22:11. 921-925.

GREEN, K.D., THOMAS, N.H., CALLOW, J.A. 1992. "Product enhancement and recovery from transformed root cultures of *Nicotiana glauca*". *Biotechnology and Bioengineering*. 39:195-202.

JANG, J.-C., SHEEN, J. 1997 . "Sugar sensing in higher plants". *Trends in plant science*. 2:208-214.

JEFFERSON, R., GOLDSBROUGH, A., BEVAN, M. 1990. "Transcriptional regulation of a patatin-1 gene in potato". *Plant molecular biology*. 14:995-1006.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P.J., ARCHAMBAULT, J. 1192. "Development of a helicoidal-ribbon impeller bioreactor for high-

density plant cell suspension culture.". *Biotechnol. Bioeng.* 63:2. 511-521.

JUNG, K.H., KWAK, S.S., KIM, S.W., CHOI, C.Y., LEE, H., LIU, J.R. 1992.

"Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *C. roseus* by using monosaccharides as a carbon source". *Biotechnology Letters.* 14:695-700.

KETCHUM, R.E.B., GIBSON, D.M., CROTEAU, R.B. 1999. "The kinetics of

Taxoid accumulation in cell suspension culture of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate". *Biotechnology and Bioengineering.* 62:1. 97-105.

KIM, D.J., CHANG, H.N. 1990a. "Effect of growth hormone modification on

shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures with *in situ* extraction.". *Biotechnology Letters.* 12:289-294.

KIM, D.J., CHANG, H.N. 1990c. "Enhanced shikonin production from

Lithospermum erythrorhizon by *in situ* extraction and calcium alginate immobilization". *Biotechnology and Bioengineering.* 36:460-466.

KIM, D.J., CHANG, H.N. 1990b. "Increased shikonin production in

Lithospermum erythrorhizon suspension culture with *in situ* extraction and fungal cell treatment (elicitor). ". *Biotechnology Letters.* 12:443-446.

- KIM, S.-I., CHOI, H.-K., KIM, J.-H., LEE, H.-S., HONG, S.-S. 2001. "Effect of osmotic pressure on paclitaxel in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*". *Enzyme and Microbial Technology*. 28:202-209.
- KOCH, K.E. 1996. "Carbohydrate-modulated gene expression in plants". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47:509-540.
- KOMARAI AH, P., RAMAKRISHNA, S.V., REDANNA, P., KAVI KISHNOR, P.B. 2003. "Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption". *Journal of Biotechnology*. 101:181-187.
- KURATA, H., KAWAI, A., SEKI, M., FURUSAKI, S. 1994. "Increased alkaloid production in a suspension culture of *Coffea arabica* cells using an adsorption column for product removal". *Journal of fermentation and bioengineering*. 78:1. 117-119.
- KWON, I.C., YOO, Y.J., LEE, J.H., HYUN, J.O. 1998. "Enhancement of taxol production by in situ recovery of product". *Process biochemistry*. 33:7. 707-707.
- LEE-PARSONS, C.W.T., SHULER, M.L. 2002. "The effect of Ajmalicine Spiking and Resin Addition Timing on the Production of Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus* Cell Culture". *Biotechnology and*

Bioengineering. 79:4. 408-415.

LUO, J., LIU, L., WU, C.D. 2001. "Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*". *Biotechnology Letters*. 23:1345-1348.

MCFARLANE, J., MADYASTHA, K.M., COSCIA, C.J. 1975. "Regulation of secondary metabolism in higher plants. Effect of alkaloids on a cytochrome P-450 dependent monooxygenase.". *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 66:1263-1269.

MEMELINK\VERPOORTE\KIJNE "ORCA nization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism".

MENKE, F.L., PARCHMANN, S., MUELLER, M.J., KIJNE, J.W., MEMELINK, J. 1999. "Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*." *Plant Physiology*. 119 : 4. 1289-96.

MÉRILLON, J.M., RIDEAU, M., CHÉNIEUX, J.C. 1984. "Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and tryptamine en *Catharanthus roseus* cells *in vitro*". *Planta med*. 48:497-501.

- 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.* 12:1. 110-8.
- MORENO P.R.H., VAN DER HEIJDEN R., VERPOORTE R. 1993. "Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*". *Plant Cell Reports.* 12 : 702-705.
- MORGAN, J.A., SHANKS, J.V. 1999. "Inhibitor Studies of Tabersonine Metabolism in C-Roseus Hairy Roots". *Phytochemistry.* 51:1. 61-68.
- MORI, T., SAKURAI, M. 1994. "Production of Anthocyanin from Strawberry Cell Suspension Cultures; Effects of Sugar and Nitrogen". *Journal of Food Science.* 59:3. 588-593.
- NAMDEO, A., PATIL, S., FULZELE, D.P. 2002. "Influence of Fungal Elicitors on Production of Ajmalicine by Cell Cultures of *Catharanthus roseus*". *Biotechnol. Prog.* 18:159-162.
- O'KEEFE. B.R. , MAHABY, G.B., GILLS, J.J., BEECHER, C.W.W., SCILLING, A.B. 1997. "Stable vindoline in transformed cell cultures of *Catharanthus roseus*". *Journal of Natural Products.* 60:261-264.
- OKSMAN-CALDENTEY, K.-M., SEVON, N., VANHALA, L., HILTUNEN, R.

1994. "Effects of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *hyoscyamus muticus*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 38:263-272.
- OUWERKERK, P.B.F., HALLARD, D., VERPOORTE, R., MEMELINK, J. 1999b. "Identification of Uv-B Light-Responsive Regions in the Promoter of the Tryptophan Decarboxylase Gene From *Catharanthus Roseus*". *Plant Molecular Biology*. 41:4. 491-503.
- OUWERKERK, P.B.F., MEMELINK, J. 1999a. "Elicitor-Responsive Promoter Regions in the Tryptophan Decarboxylase Gene From *Catharanthus Roseus*". *Plant Molecular Biology*. 39:1. 129-136.
- PANDA, A.K., MISHRA, S., BISARIA, V.S. 1992. "Alkaloid Production by Plant Cell Suspension Cultures of *Holarrhena antidysenterica*: 1. Effect of Major Nutrients". *Biotechnology and Bioengineering*. 39:10. 1043-1051.
- PARK, C.-H., MARTINEZ, B.C. 1992. "Enhanced release of rosmarinic acid from *Coleus blumei* permeabilization by dimethyl sulfoxide (DMSO) while preserving cell viability and growth". *Biotechnology and Bioengineering*. 40:459-464.
- PARR, A.J., ROBINS, R.J., RHODES, M. 1984. "Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethyl sulfoxide. Effects on alkaloids

release and long-term membrane integrity.". *Plant cell report.* 3:262-265.

PASQUALI, G., GODDIJN, O.J.M., DE WAAL, A., VERPOORTE, R., SCHILPEROORT, R.A., HOGE, J.H.C. et al. 1992. "Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxins and elicitors". *Plant Molecular Biology.* 18:1121-1131.

PAYNE, G.F., PAYNE, N.N., SHULER, M.L., ASADA, M. 1988a. "In situ adsorption for enhanced alkaloid production by *Catharanthus roseus*". *Biotechnology Letters.* 10:187-192.

PHISALAPHONG, M., LINDEN, J.C. 1999. "Kinetic studies of paclitaxel production by *Taxus canadensis* cultures in batch and semicontinuous with total cell recycle". *Biotechnology Progress.* 15:1072-1077.

PU, T.U., YANG, R.Y., SAUS, F.L. 1989. "Iontophoretic release and transport of alkaloids from *Catharanthus roseus* cells in a ceramic hollow fiber reactor". *Biotechnology Letters.* 33:1437-1444.

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

RHODES, M.J.C., HILTON, M., PARR, A.J., HAMILL, J.D., ROBINS, R.J.

1986. "Nicotine production by "hairy roots" cultures of *Nicotiana rustica*: fermentation and product recovery.". *Biotechnology Letters*. 8.
- 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 : 3. 442-9.
- ROBINS, R.J., RHODES M.J.C. 1986. "The stimulation of anthraquinone production by *Cinchona ledgeriana* cultures with polymeric adsorbents". *Applied microbiology and biotechnology*. 24:35-41.
- ROHMS & HAAS . 2001. "Amberlite XAD-1180 product data sheet (PDS 0205)".
- ROHMS & HAAS . 2001. "Amberlite XAD-16 product data sheet (PDS 0170)".
- ROHMS & HAAS . 2002. "Amberlite XAD-1600 product data sheet (PDS 0297)".
- ROHMS & HAAS . 2001. "Amberlite XAD-4 product data sheet (PDS 0556)".
- ROHMS & HAAS . 2001. "Amberlite XAD-761 product data sheet (PDS 0103)".
- ROHMS & HAAS . 2001. "Amberlite XAD-7HP product data sheet (PDS 0529)".

- ROITSCH, T. 1999. "Source-sink regulation by sugar and stress". *Current opinions in plant biology*. 2:198-206.
- RUDGE, K., MORRIS, P. 1986. "The effect of osmotic stress on growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*". *Journal of Plant Physiology*. 125: 75-82.
- SALZMAN, R.A., TIKHONOVA, I., BORDELON, B.P., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. 1996. "Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape". *Molecular and General Genetics*. 250:153-161.
- SARRAILH, S. 2004. (En cours) "*Étude de l'élicitation d'une suspension cellulaire de Catharanthus roseus*". Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.
- SATO, K., NAKAYAMA, M., SHIGETA, J. 1996. "Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry". *Plant Science*. 113:91-98.
- SCHLATMANN, J.E., MORENO, P.R.H., VINKE, J.L., TEN HOOPEN, H.J.G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J.J. 1994. "Effect of oxygen and nutrient limitation on ajmalicine production and related enzyme activities in high density cultures of *Catharanthus roseus*". *Biotechnology and*

Bioengineering. 44:461-468.

SCHLATMANN, J.E., MORENO, P.R.H., VINKE, J.L., TEN HOOPEN, H.J.G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J.J. 1995c. "Gaseous metabolites and the ajmalicine production rate in high density cell cultures of *Catharanthus roseus*". *Enzyme and Microbial Technology*. 20:107-115.

SCHLATMANN, J.E., NUUTILA, A.M., VAN GULIK, W.M., TEN HOOPEN, H.J.G., VERPOORTE, R., HEIJNEN, J.J. 1993. "Scaleup of amajilicine production plant cell cultures of *Cathanranthus roseus*". *Biotechnology and Bioengineering*. 41:253-262.

SCHLATMANN, J.E., VINKE, J.L., TEN HOOPEN H.J.G. 1995a. "Relation between dissolved oxygen concentration and ajmalicine production rate in high-density cultures of *Catharanthus roseus*." *Biotechnology and Bioengineering*. 45 : 435-439.

SCHLATMANN, J.E.K.C.M.A., VINKE, J.L., TEN HOOPEN, H.J.G., HEIJNEN, J.J. 1995b. "The role of glucose in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell cultures". *Biotechnology and Bioengineering*. 47:525-534.

SIM, J.S., CHANG, N.H., LUI, R.J., JUNG, H.K. 1994a. "Production and secretion of Indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Effects of *in situ* adsorption , Fungal elicitor and

permeabilization". *Journal of fermentation and bioengineering*. 78:3. 229-234.

SIM, J.S., KIM, D.J., CHANG, H.N. 1994b. "Shikonin production by extractive cultivation in transformed-suspension and hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*". *Annals New York academy of sciences*. 745:442-454.

SIROIS J. 2000. "*Modélisation et optimisation en continue d'un procédé de culture de cellule végétale*". These de doctorat, École Polytechnique de Montréal, Canada.

SKINNER, S.E., WALTON, N.J., ROBINS, R.J., RHODES, M.J.C. 1987. "Tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and alkaloid production by *Cinchona ledgeriana* suspension cultures". *Phytochemistry*. 26:721-725.

SMEEKENS, S. 2000. "Sugar-Induces Signal Transduction in Plants." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51 : 49-81.

SOTTOMAYOR, M., LOPEZ-SERRANO, M., DICOSMO, F., ROS BARCELO, A. 1998. "Purification and characterization of alpha-3,4-anhydrovinblastine synthase (peroxydase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don". *FEBS letter*. 428:299-303.

- SPALDING, M. 2002. "Lectures outlines for Botany 513: Plant metabolism".
Lecture 15:62-68.
- SRINIVASAN, V., CIDDI, V., BRINGI, V., SHULER, M.L. 1996. "Metabolic inhibitors, elicitors, and precursors as tools for probing yield limitation in taxane production by *Taxus chinensis* Cell culture". *Biotechnology Progress*. 12:457-465.
- ST-PIERRE B., VAZQUEZ-FLOTA F.A., DE LUCA V. 1999. "Multicellular Compartmentation of *Catharanthus roseus* Alkaloid Biosynthesis Predicts Intercellular Translocation of a Pathway Intermediate". *The Plant Cell*. 11:887-900.
- ST-PIERRE, B.a.D.L.V. 1995. "A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*." 109 : 131-139.
- TAL, B., GRESSEL, J., GOLDBERG, I. 1982. "The effect of medium constituents on growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells grown in batch cultures". *Planta Med*. 44:111-115.
- TANAKA, H., HIRAO, C., SEMBA, H., TOZOMA, Y., OHMONO, S. 1985. "Release of intracellularly stored 5' phosphodiesterase with preserved plant cell viability". *Biotechnology and Bioengineering*. 27:890-892.

- 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, Canada.
- TIKHOMIROFF, C., ALLAIS, S., KLVANA, M., HISIGER, S., JOLICOEUR, M. 2002. "Continuous selective extraction of secondary metabolites from *Catharanthus roseus* hairy roots with silicon oil in a two-liqui-phase bioreactor". *Biotechnology Progress*. 18:5. 1003-1009.
- 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 *s* induced by elicitor via a JA-independent signal transduction pathway". *Plant Molecular Biology*. 44:675-685.
- VAN DER PLAS, L.H.W., EIJKELBOOM, C., HAGENDOORN, M.J.M. 1995. "Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 43:111-116.
- VAZQUEZ-FLOTA, F., DE LUCA, V., CARRILLO-PECH, M., CANTO-FLICK, A., DE LOURDES MIRANDA-HAM, M. 2002. "Vindoline biosynthesis is transcriptionally blocked in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures". *Molecular Biotechnololy*. 22:1. 1-8.

- VAZQUEZ-FLOTA, F.A., DE LUCA, V. 1998. "Jasmonate modulates development- and light-regulated alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*." *Phytochemistry*. 49 : 2. 395-402.
- VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., MEMELINK, J. 2000. "Engineering the Plant Cell Factory for Secondary Metabolite Production". *Transgenic Research*. 9:4-5. 323-343.
- VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., MORENO, P.R.H. "Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells" "The Alkaloids". 49 : 221-299. New York : Academic Press.
- 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.
- WANG, C., WU, J., MEI, X. 2001. "Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding". *Biotechnology Progress*. 17:sarah14. 89-94.
- WENZLER, H.C., MIGNERY, G., FISHER, L., PARK, W. 1989. "Sucrose-regulated expression of chimeric potato ruber gene in leaves of a transgenic tobacco plants.". *Plant molecular biology*. 13:347-354.

- WHITMER, S., VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. 2002. "Effect of Precursor Feeding on Alkaloid Accumulation by a Strictosidine Synthase Over-Expressing Transgenic Cell Line S1 of *Catharanthus Roseus*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69:1. 85-93.
- WHITMER, S., VERPOORTE¹, R., CANEL, C. 1988. "Influence of auxins on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 53:135-141.
- 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.
- WILSON, G., BALAGUE, C. 1985. "Biosynthesis of anthraquinone by cells of *Galium mullogo* with limiting sucrose and phosphate". *Journal of Experimental Botany*. 36: 485-493.
- YUAN, Y.J., WEI, Z.L., WU, J.C. 2001. "Improved taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* by in situ extraction combined with precursor feeding and additional carbon source introduction in an airlift loop reactor". *Biotechnology Letters*. 23:1659-1662.
- ZHANG, C.-H., XU, H.-B. 2001. "Improved paclitaxel production by *in situ*

extraction and elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*".
Biotechnology Letters. 23:189-193.

ZHAO, J., HU, Q., GUO, Y.Q., ZHU, W.H. 2001f. "Effects of Stress Factors, Bioregulators, and Synthetic Precursors on Indole Alkaloid Production in Compact Callus Clusters Cultures of *Catharanthus Roseus*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55:6. 693-698.

ZHAO, J., ZHU, W., HU, Q. 2001d. "Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *catharanthus roseus* suspension cell culture." *Enzyme and Microbial Technology*. 28 : 7-8. 666-672.

ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q. 2001b. "Effects of Light and Plant Growth Regulators on the Biosynthesis of Vindoline and Other Indole Alkaloids in *Catharanthus Roseus* Callus Cultures". *Plant Growth Regulation*. 33:1. 43-49.

ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q. 2000b. "Promotion of Indole Alkaloid Production in *Catharanthus Roseus* Cell Cultures by Rare Earth Elements". *Biotechnology Letters*. 22:10. 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". *Biotechnology Letters*. 22:15. 1227-1231.

ZHAO, J., ZHU, W.H., HU, Q., HE, X.W. 2001a. "Enhanced Indole Alkaloid Production in Suspension Compact Callus Clusters of *Catharanthus Roseus*: Impacts of Plant Growth Regulators and Sucrose". *Plant Growth Regulation*. 33:1. 33-41.

<http://www.plant-hormones.info/references.htm>

ANNEXES

Annexe A : Composition de la solution d'ajout d'ammonium

Tableau A.1 :Composition de la solution d'ajout d'ammonium

Nutriments, vitamines et fer	Concentrations
(NH₄)₂Citrate	45 g L⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	10 mg L ⁻¹
H ₃ BO ₃	3 mg L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2 mg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	250 µg L ⁻¹
CuSO ₄	25 µg L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	25 µg L ⁻¹
KI	750 µg L ⁻¹
Nicotinic acid	1 mg L ⁻¹
Thiamine.HCl	10 mg L ⁻¹
Pyridoxine.HCL	1 mg L ⁻¹
<i>myo</i> -Inositol	100 mg L ⁻¹
Fer	28 mg L ⁻¹

Annexe B : Composition du milieu de production

Tableau B.1 :Composition du milieu de production

Nutriments, vitamines et fer	Concentrations
KNO ₃	2,0 g L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	220 mg L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	180 mg L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	132 mg L ⁻¹
(NH ₄) ₂ Citrate	678 mg L ⁻¹
NaCl	85 mg L ⁻¹
Glucose	60 g L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	10 mg L ⁻¹
H ₃ BO ₃	3 mg L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2 mg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	250 µg L ⁻¹
CuSO ₄	25 µg L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	25 µg L ⁻¹
KI	750 µg L ⁻¹
Nicotinic acid	1 mg L ⁻¹
Thiamine.HCl	10 mg L ⁻¹
Pyridoxine.HCL	1 mg L ⁻¹
<i>myo</i> -Inositol	100 mg L ⁻¹
Fer	28 mg L ⁻¹

**Annexe C : Mesure des nutriments
extracellulaires et des paramètres de
croissances pour les expériences en
bioréacteurs**

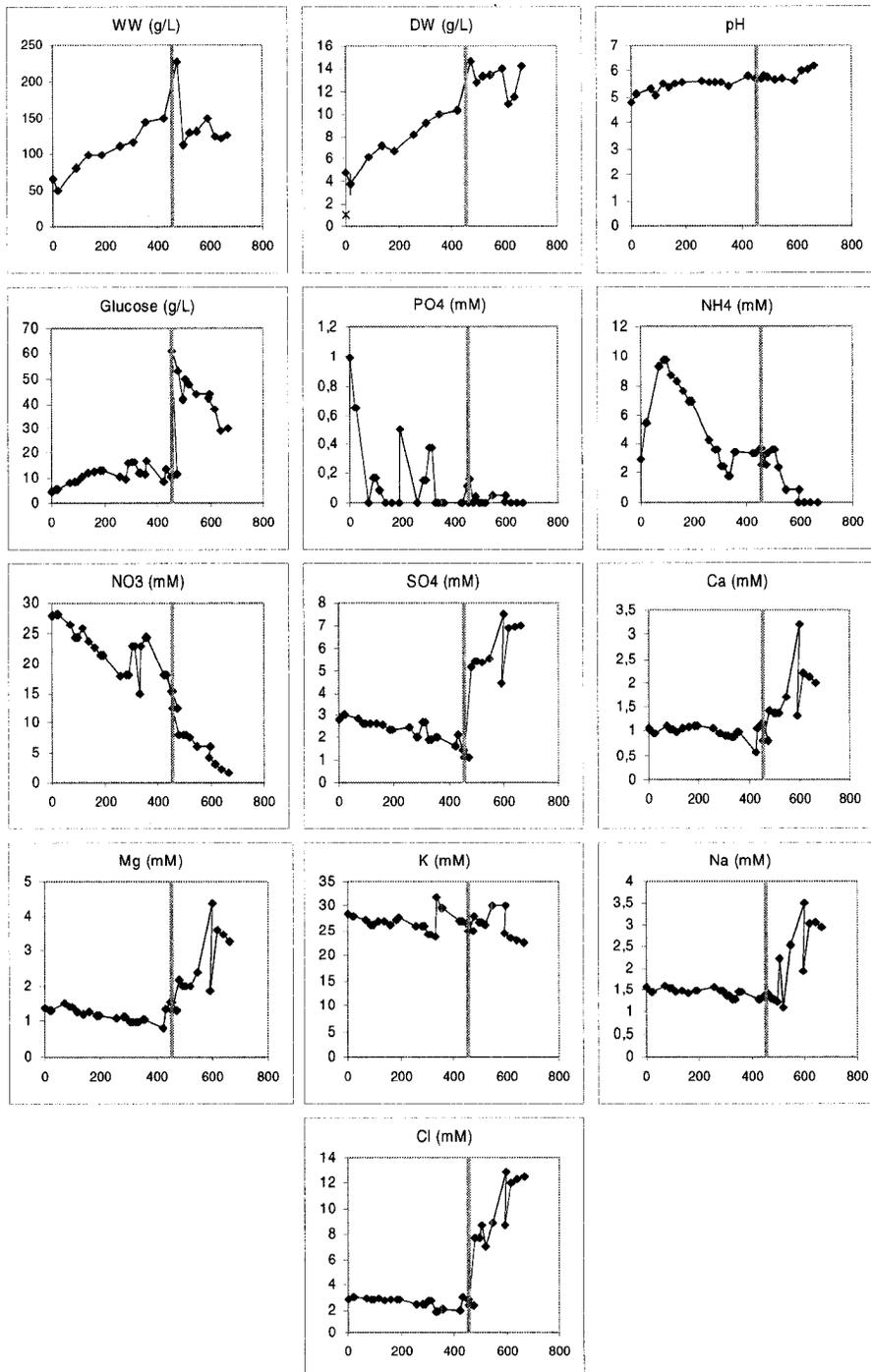


Figure C.1 : Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): premier test de production en bioréacteur. Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

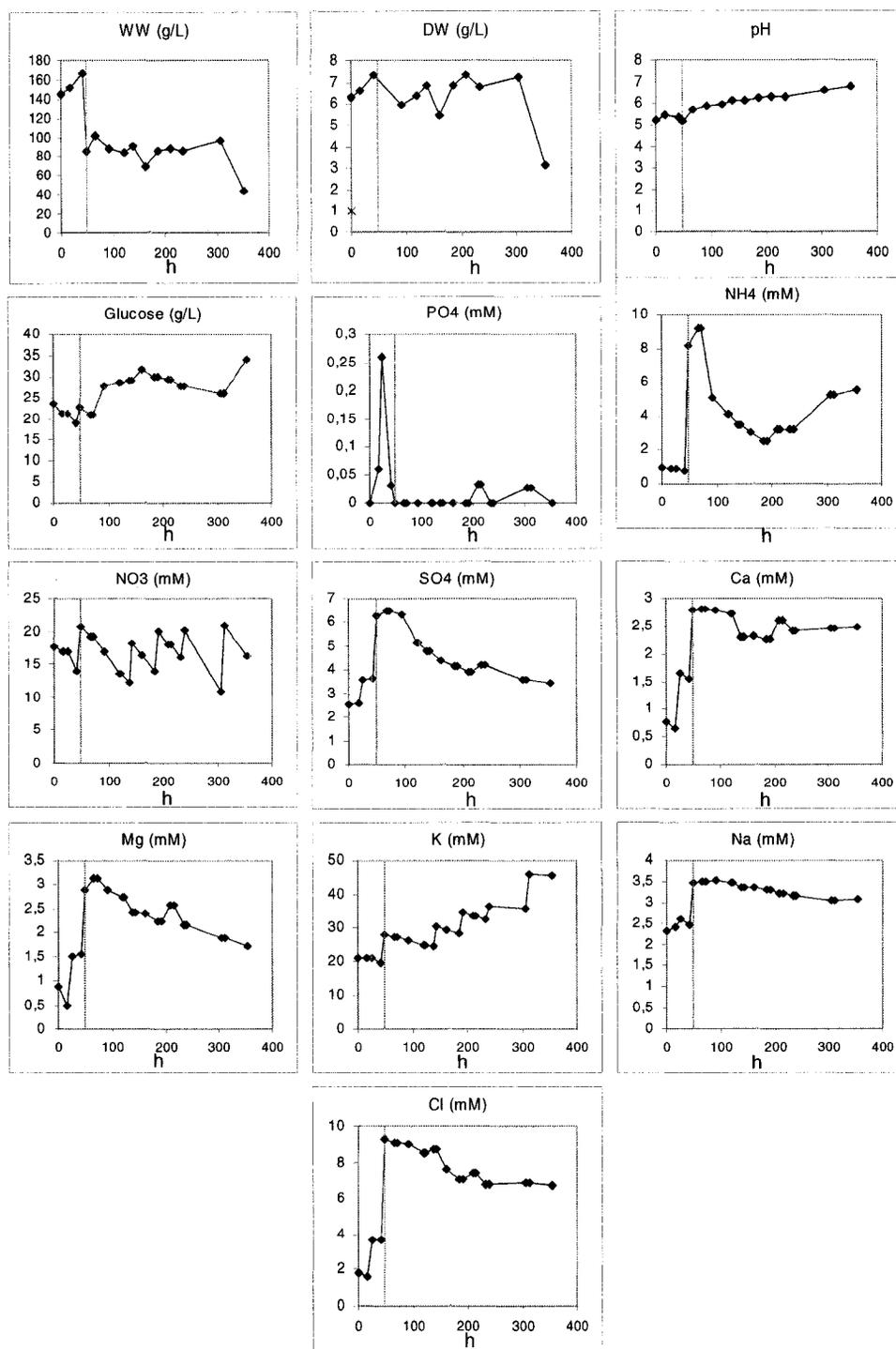


Figure C.2 : Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): maintien glucose 30 g L^{-1} . Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

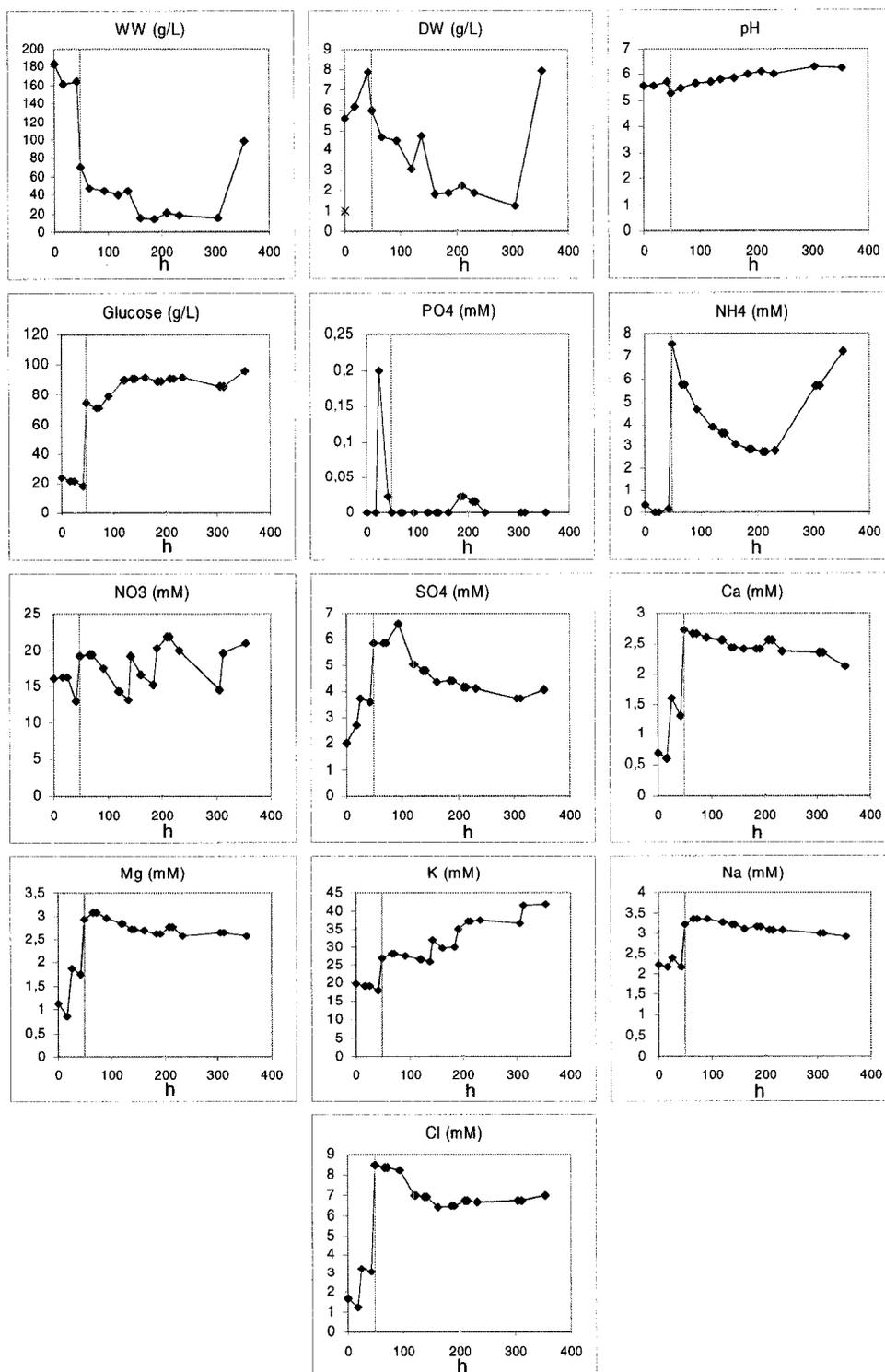


Figure C.4: Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): maintien glucose 90 g L^{-1} . Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

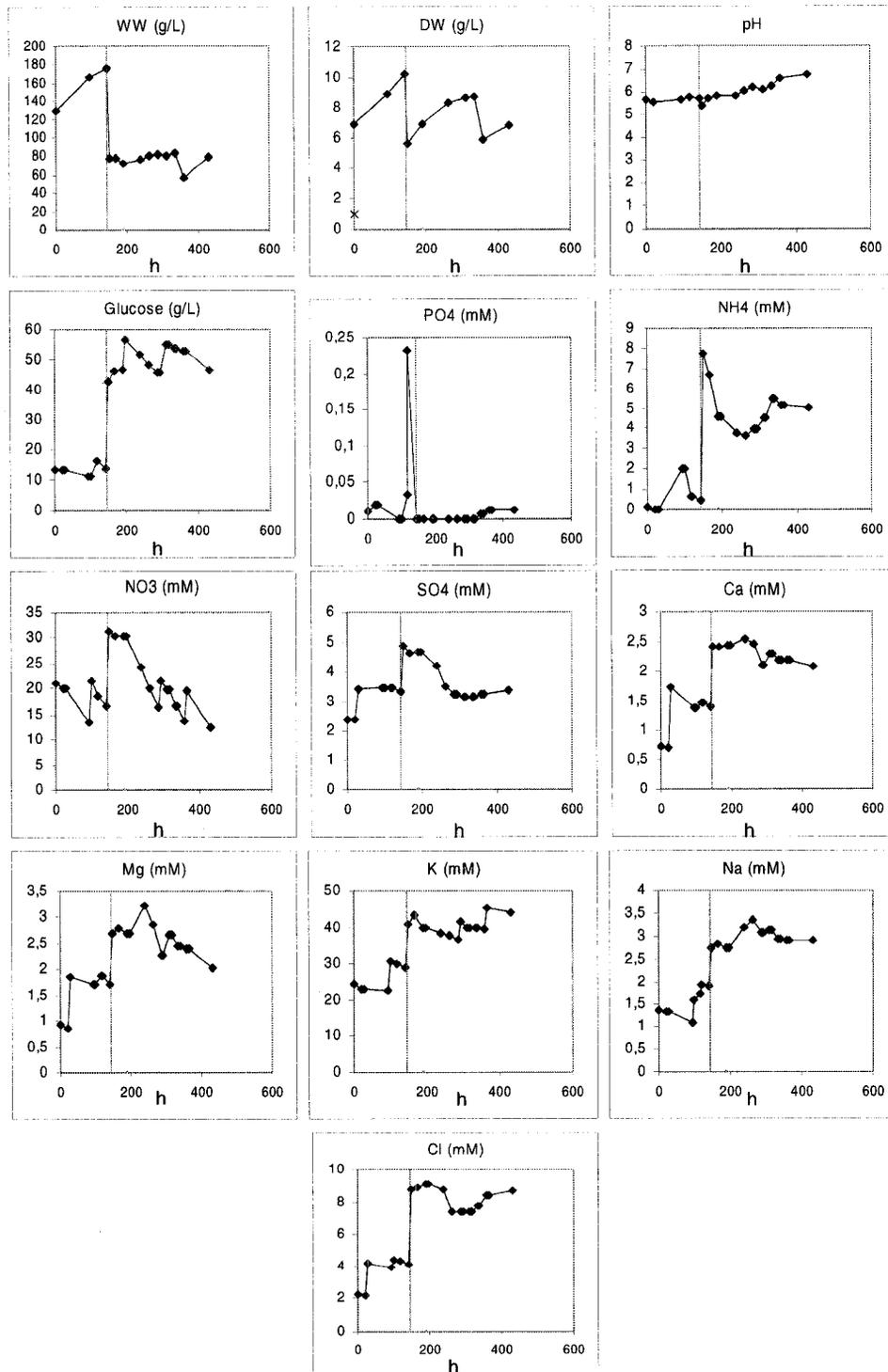


Figure C.5: Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): aucun ajout de phosphate. Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

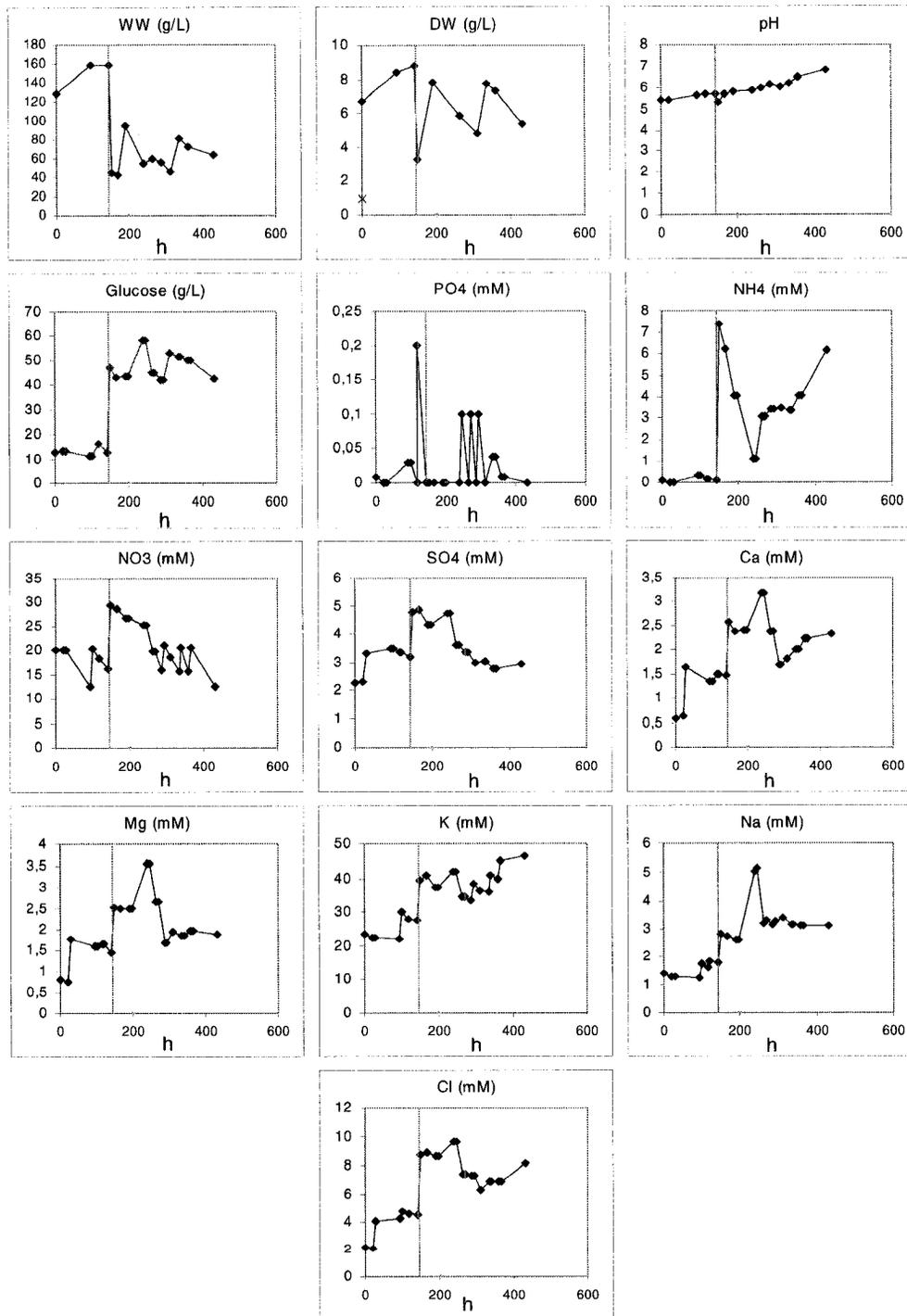


Figure C.6: Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): ajout de phosphate 6,7 et 8^e jours. Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

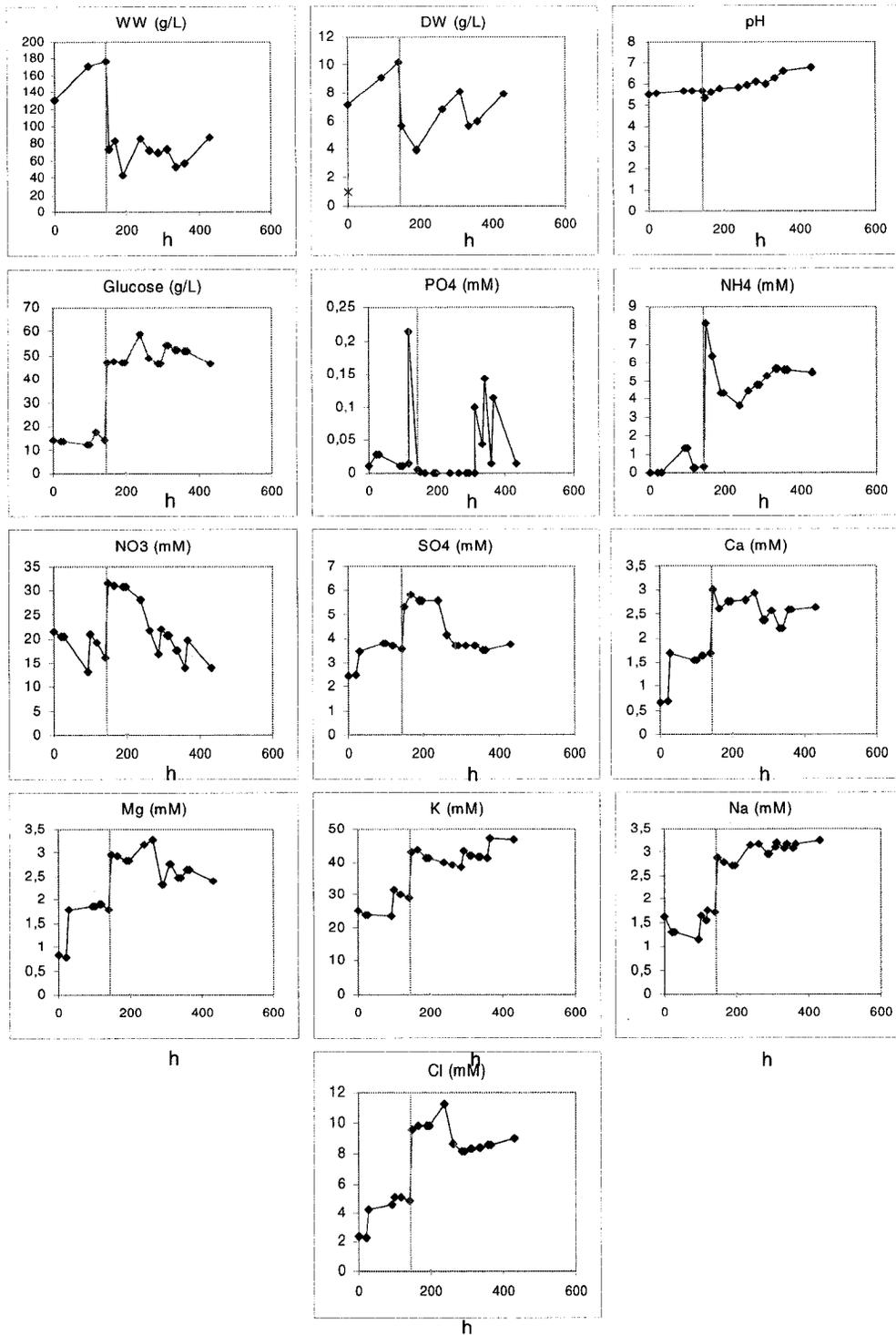


Figure C.7: Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): ajout de phosphate 8,9 et 10^e jours. Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

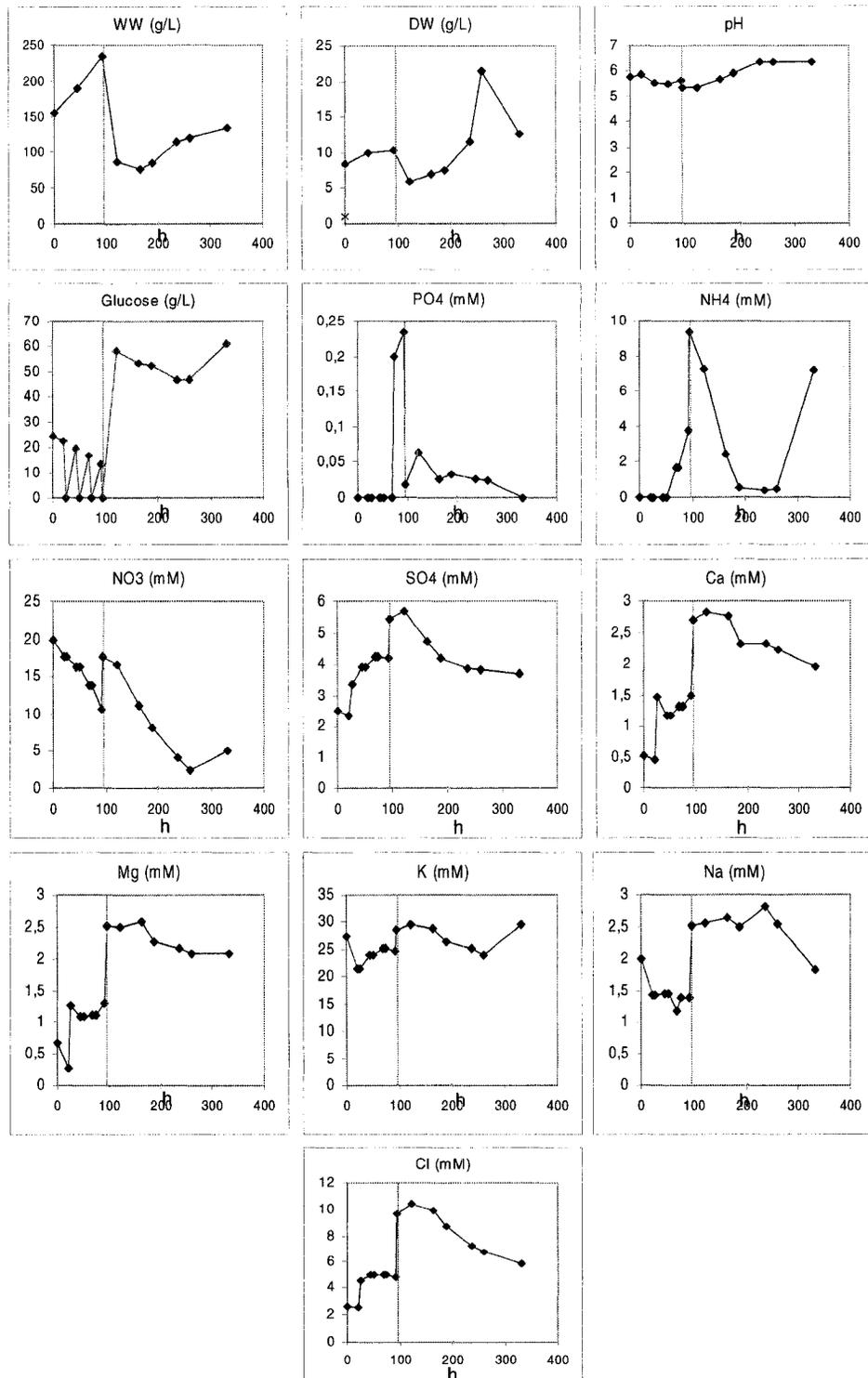


Figure C.8: Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): cuvée. Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

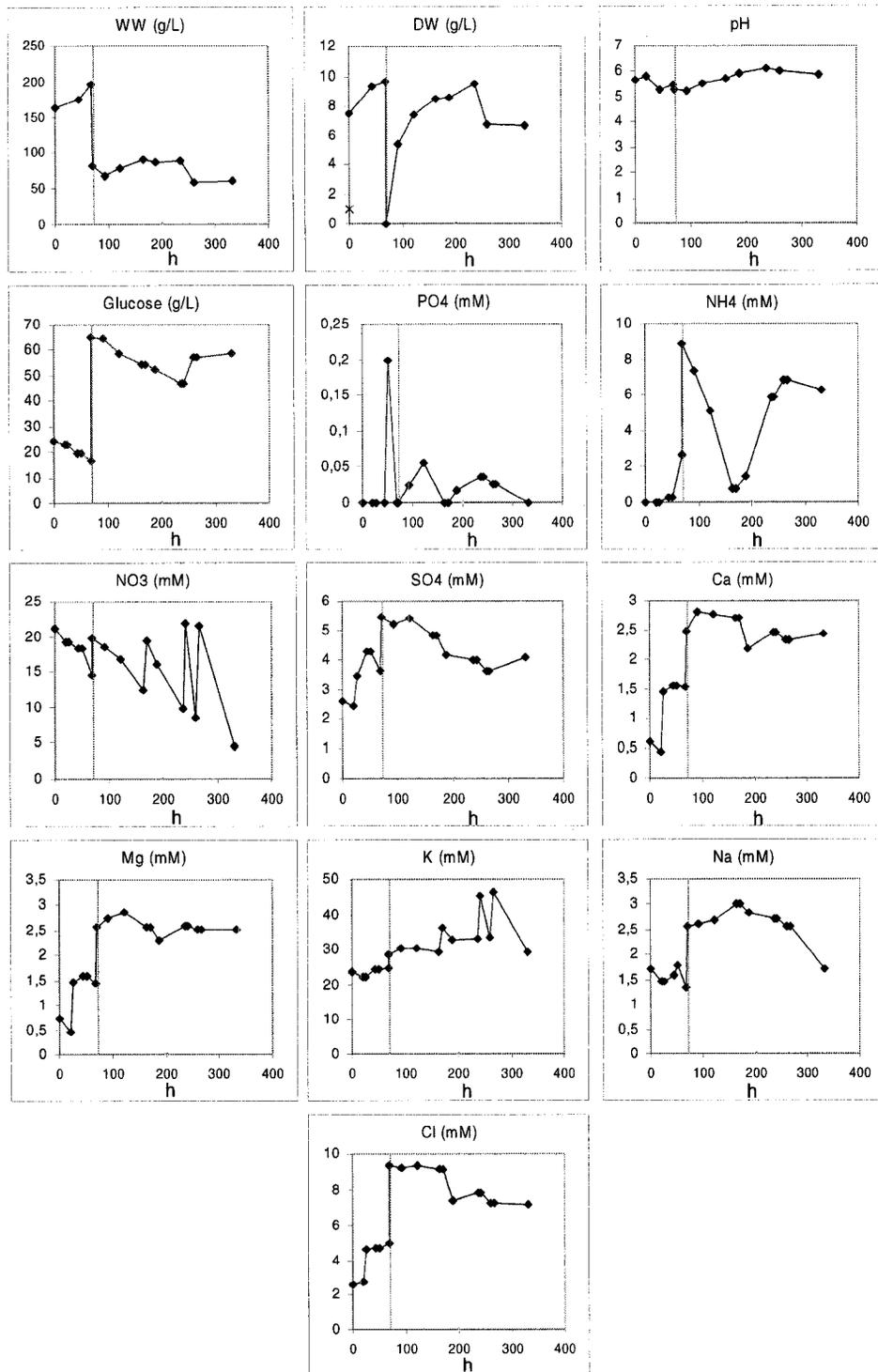


Figure C.9: Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): ajout ponctuel et une pompe de NH_4^+ . Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

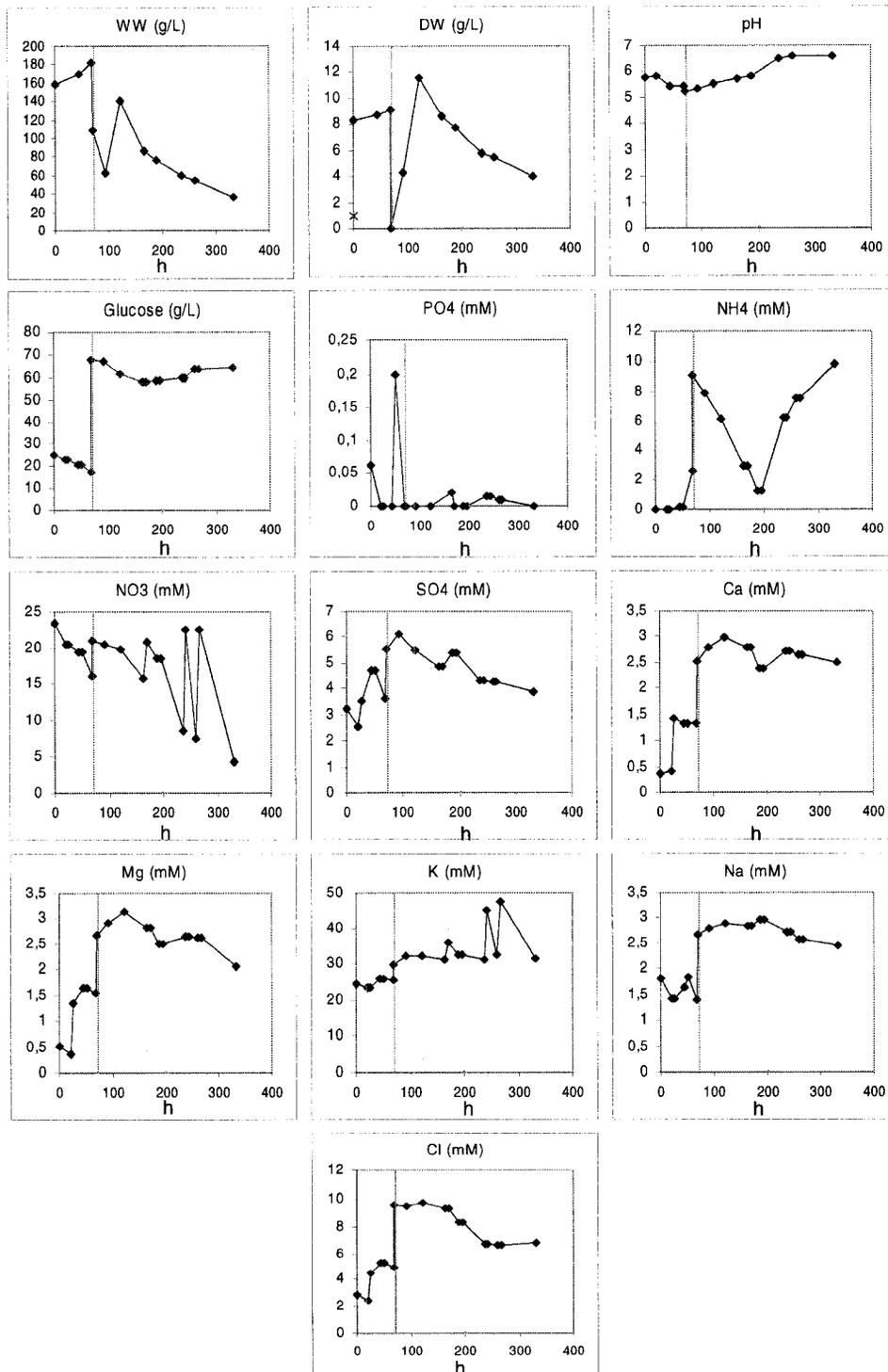


Figure C.10: Paramètres de croissance et nutriments en fonction du temps (h): ajout ponctuel, une pompe de NH_4^+ et une pompe de glucose. Ligne verticale = induction du métabolisme secondaire.

Annexe D : Profil de respiration pour les expériences en bioréacteurs

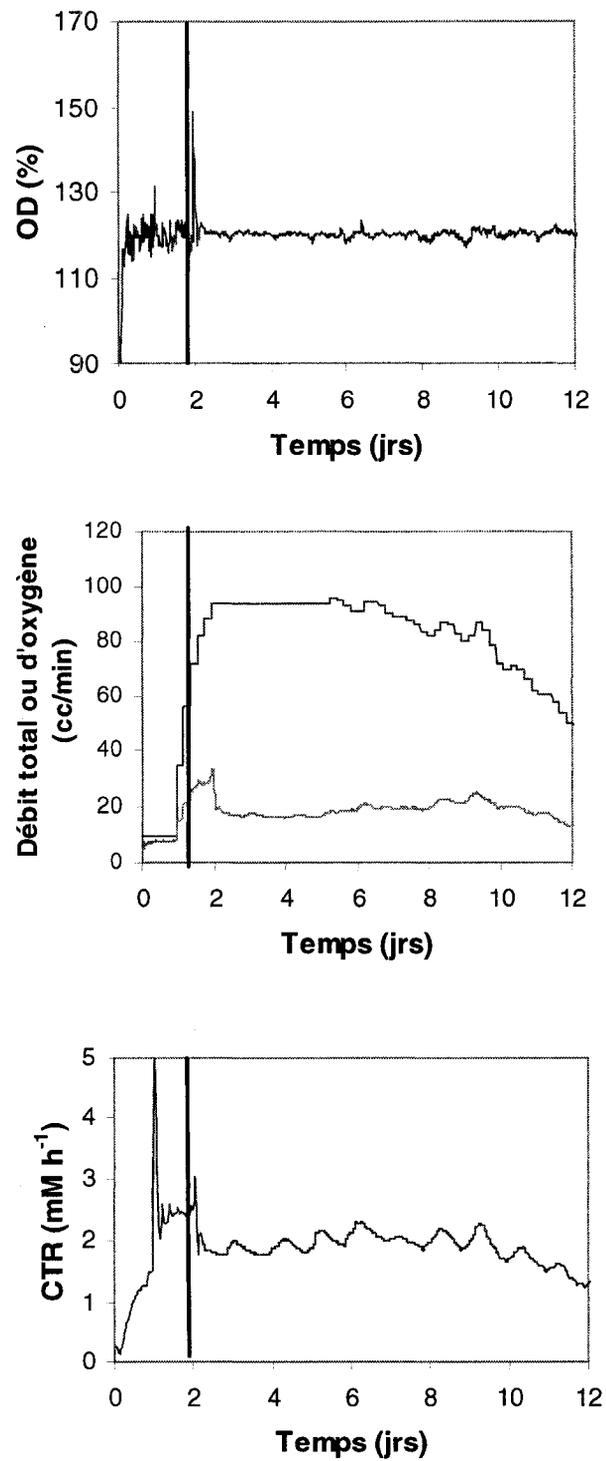


Figure D.1: Profil de respiration pour l'expériences de concentration de glucose : 30 g L^{-1} . Ligne verticale : induction.

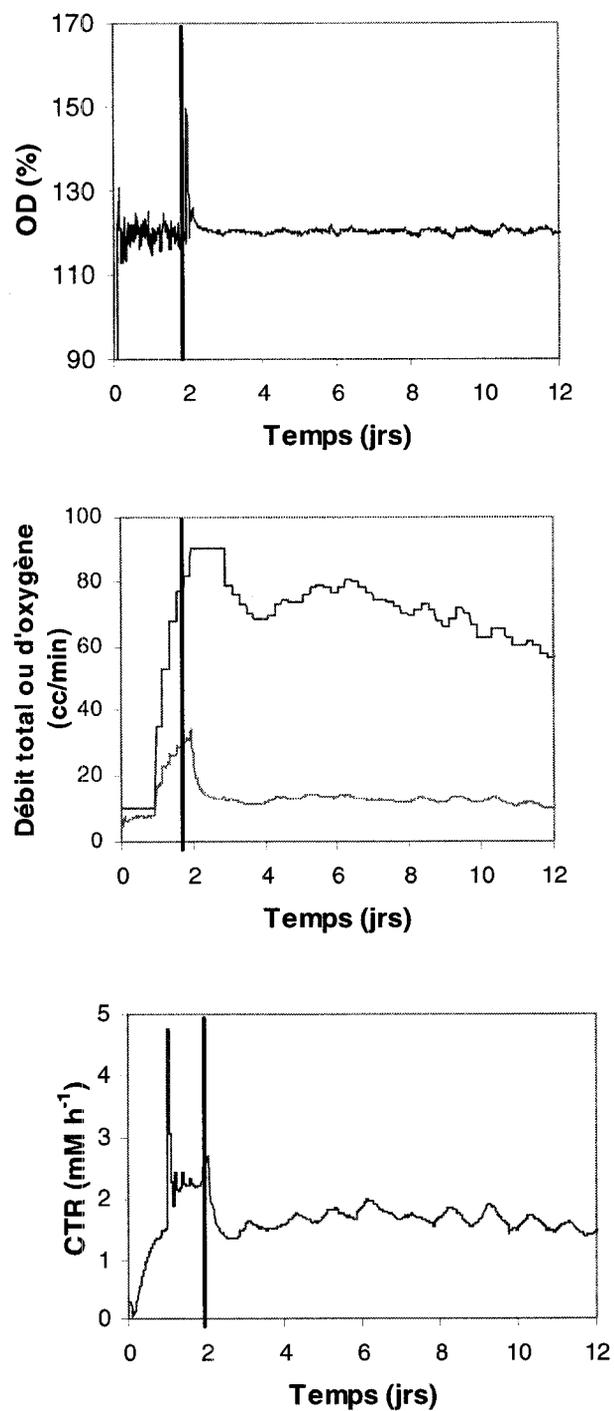


Figure D.2: Profil de respiration pour l'expériences de concentration de glucose : 60 g L⁻¹. Ligne verticale : induction.

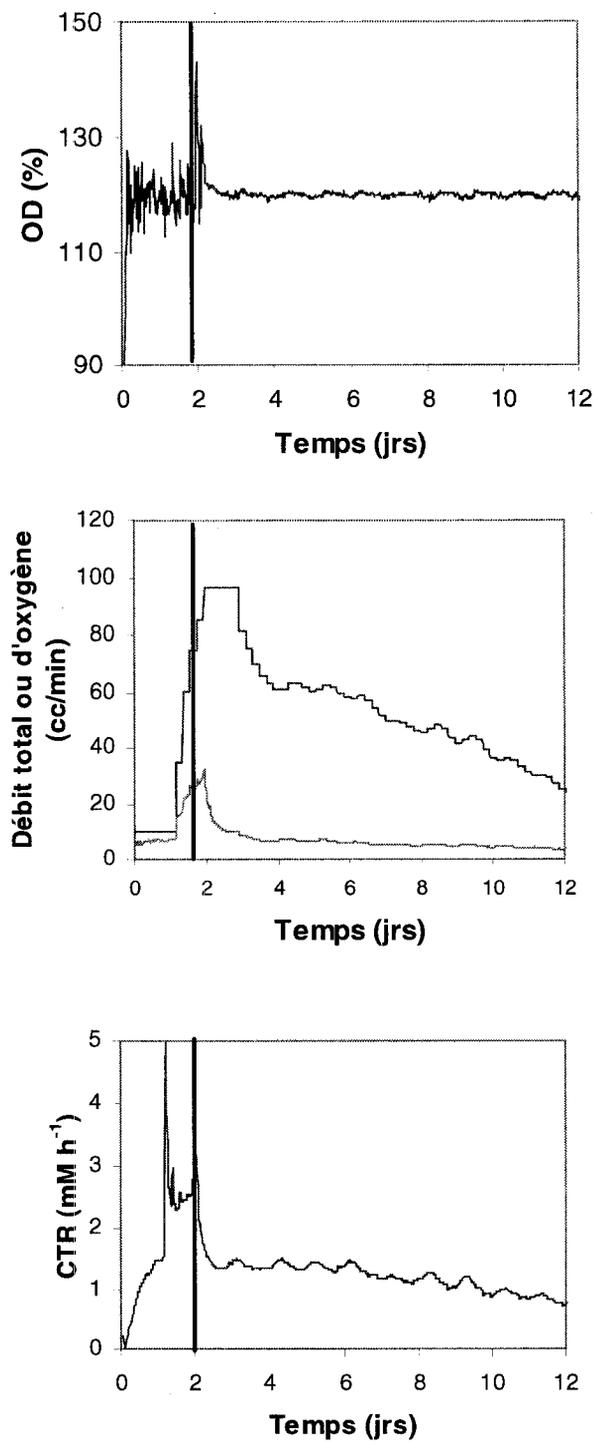


Figure D.3: Profil de respiration pour l'expériences de concentration de glucose : 90 g L^{-1} . Ligne verticale : induction.

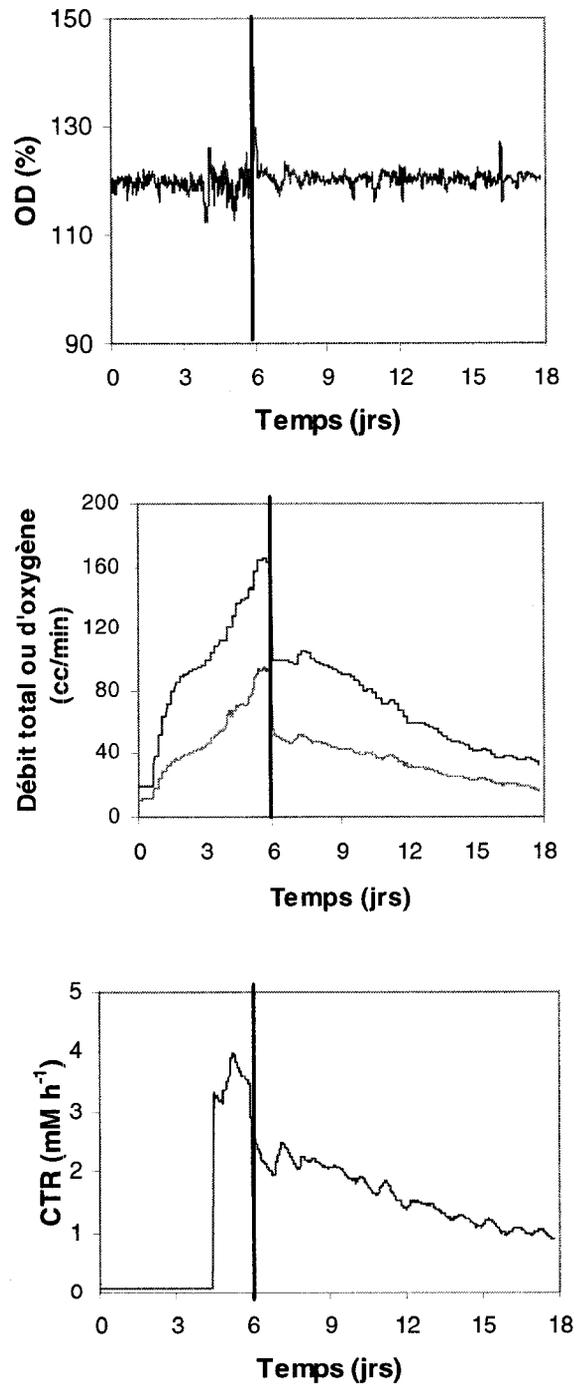


Figure D.4: Profil de respiration pour l'expériences d'ajout de phosphate : aucun ajout. Ligne verticale : induction.

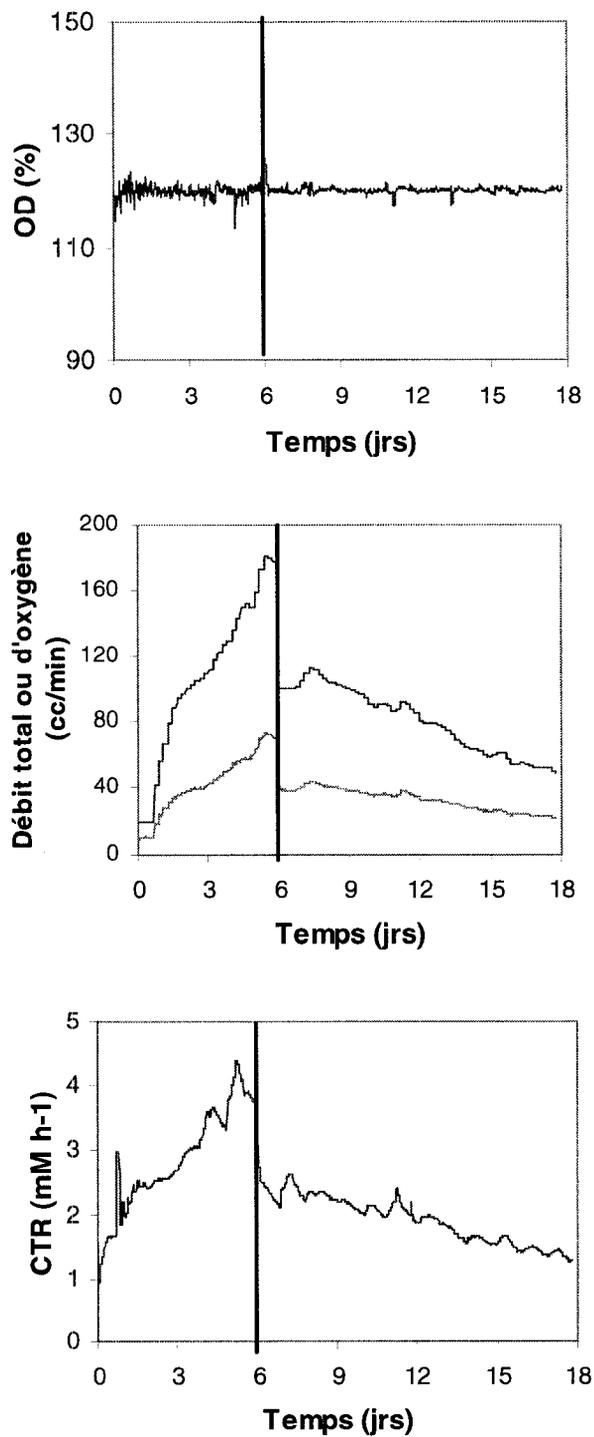


Figure D.5: Profil de respiration pour l'expériences d'ajout de phosphate : ajouts aux 6^e, 7^e et 8^e jours. Ligne verticale : induction.

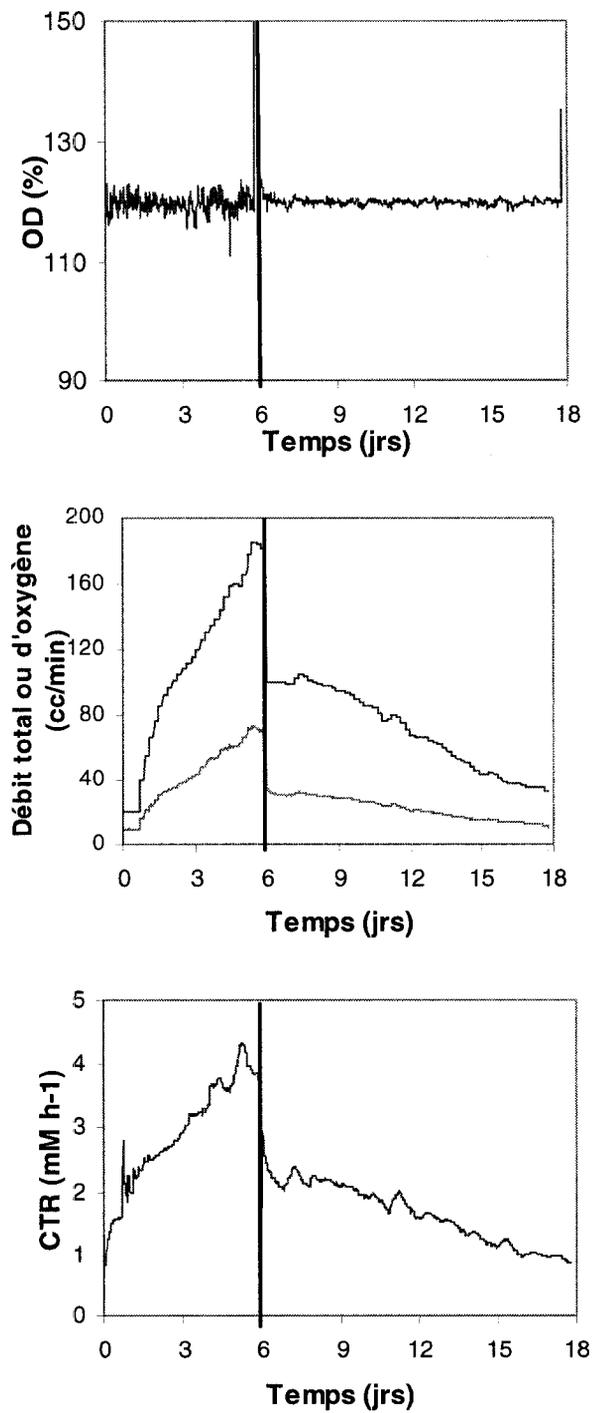


Figure D.6: Profil de respiration pour l'expériences d'ajout de phosphate : ajouts aux 8^e, 9^e et 10^e jours. Ligne verticale : induction.

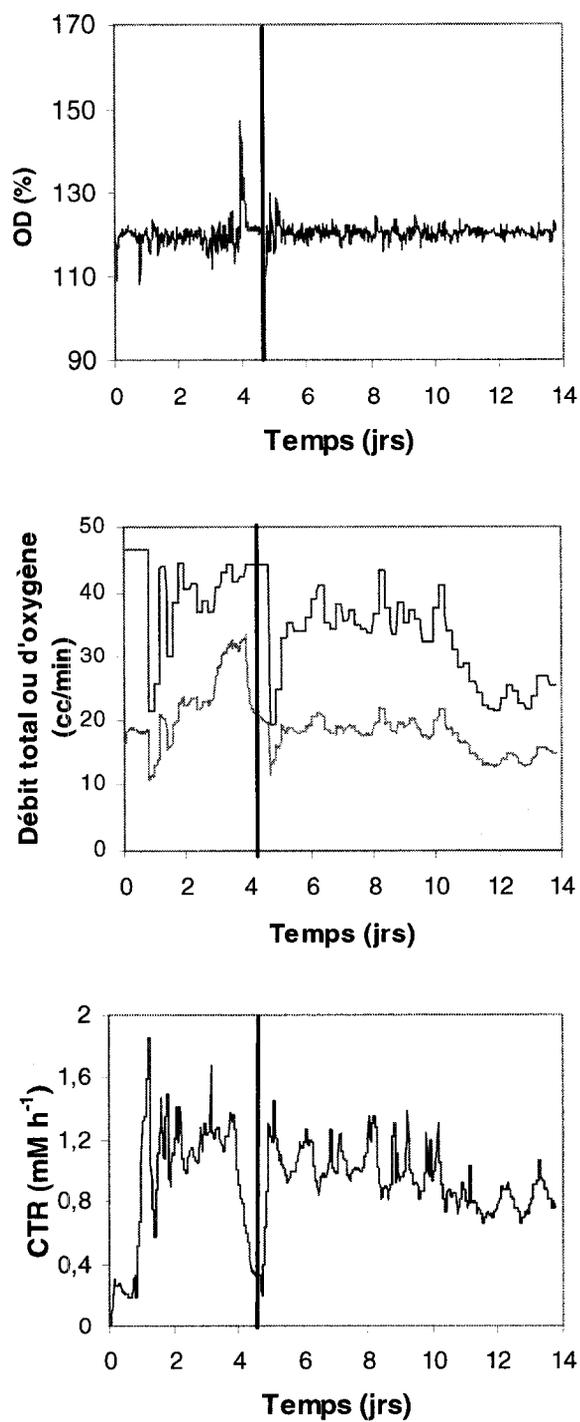


Figure D.7 : Profil de respiration et CTR pour le bioréacteur cuvée. Ligne verticale : induction.

**Annexe E : Nutriments intracellulaires pour
l'expérience d'ajout de phosphate en
production**

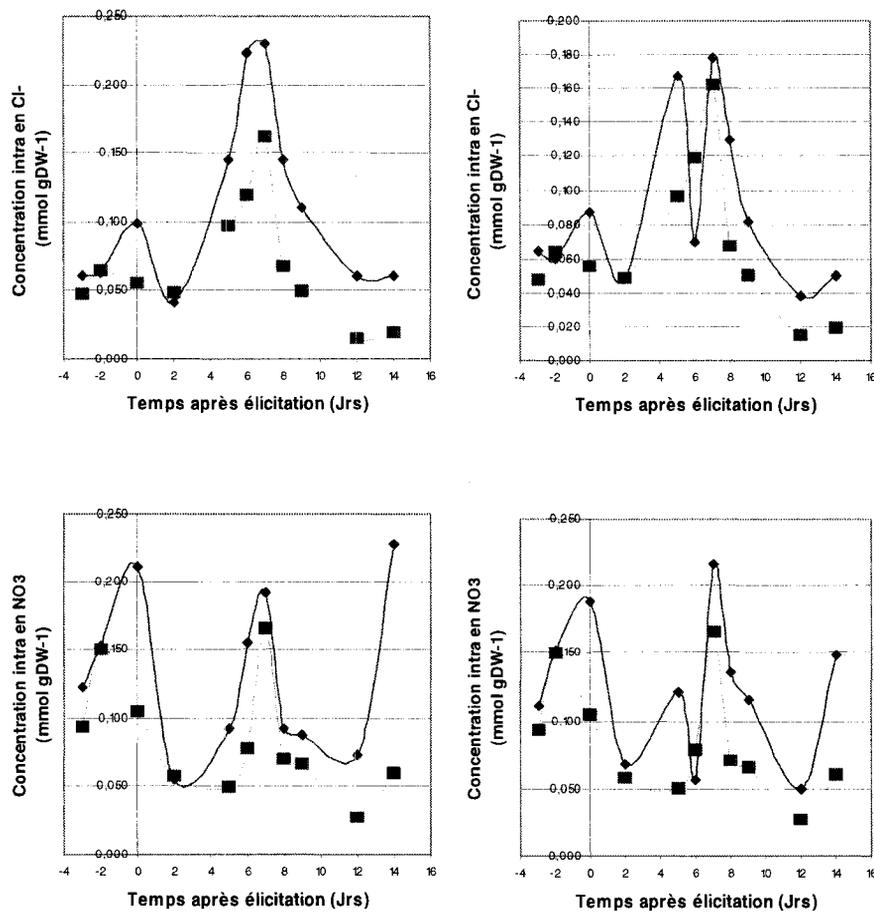


Figure E.1 : ions Cl^- et NO_3^- intracellulaire pour les bioréacteurs d'ajout de phosphate. ■ : aucun ajout ◆ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 5,6 et 7^e jours ; ▲ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 7,8 et 9^e jours. Les flèches montrent les ajouts de phosphate.

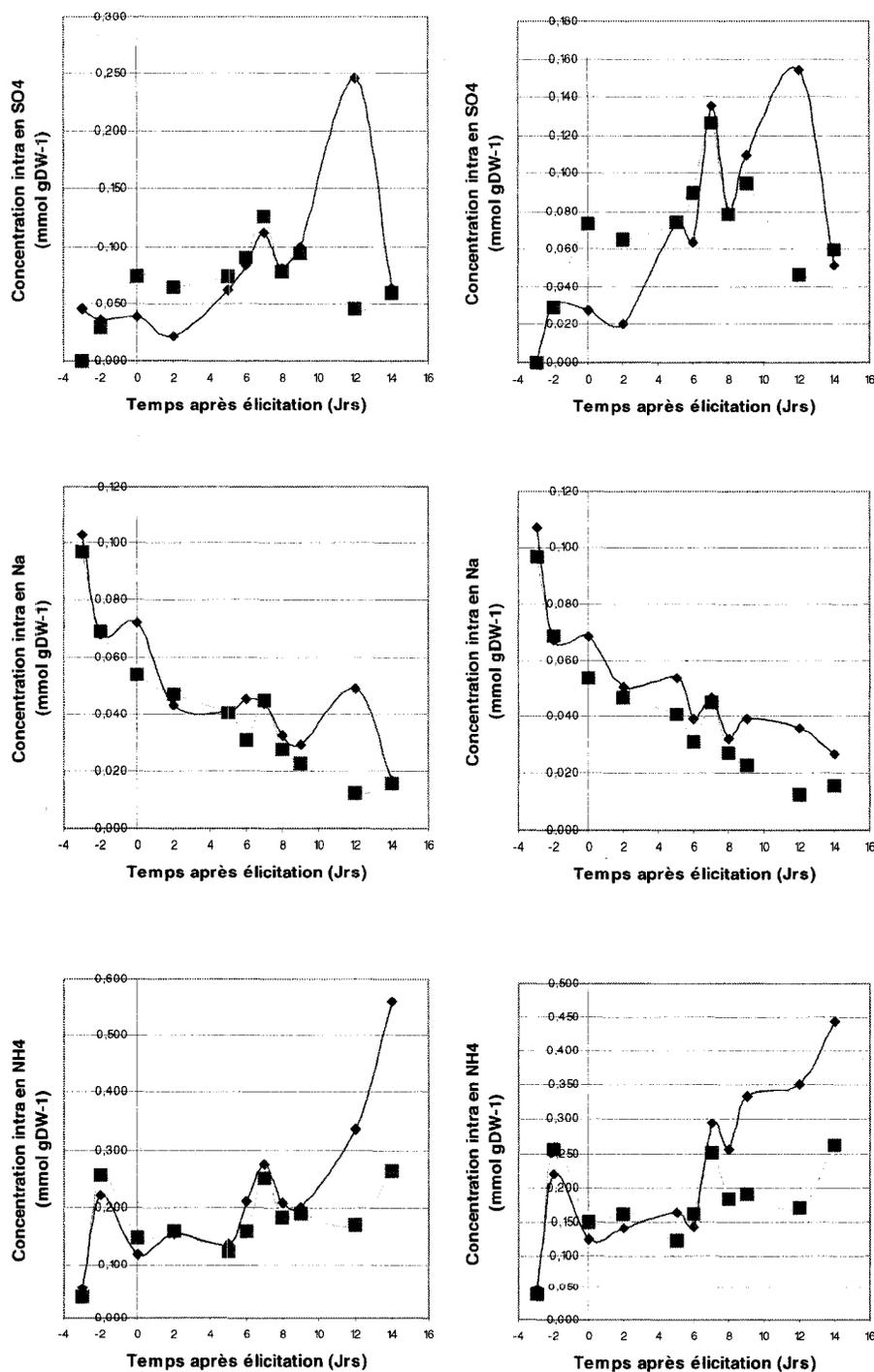


Figure E.2 : Ions SO_4^{2-} , Na^+ et NH_4^+ intracellulaire pour les bioréacteurs d'ajout de phosphate. ■ : aucun ajout ♦ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 5,6 et 7^e jours ; ▲ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 7,8 et 9^e jours. Les flèches montrent les ajouts de phosphate.

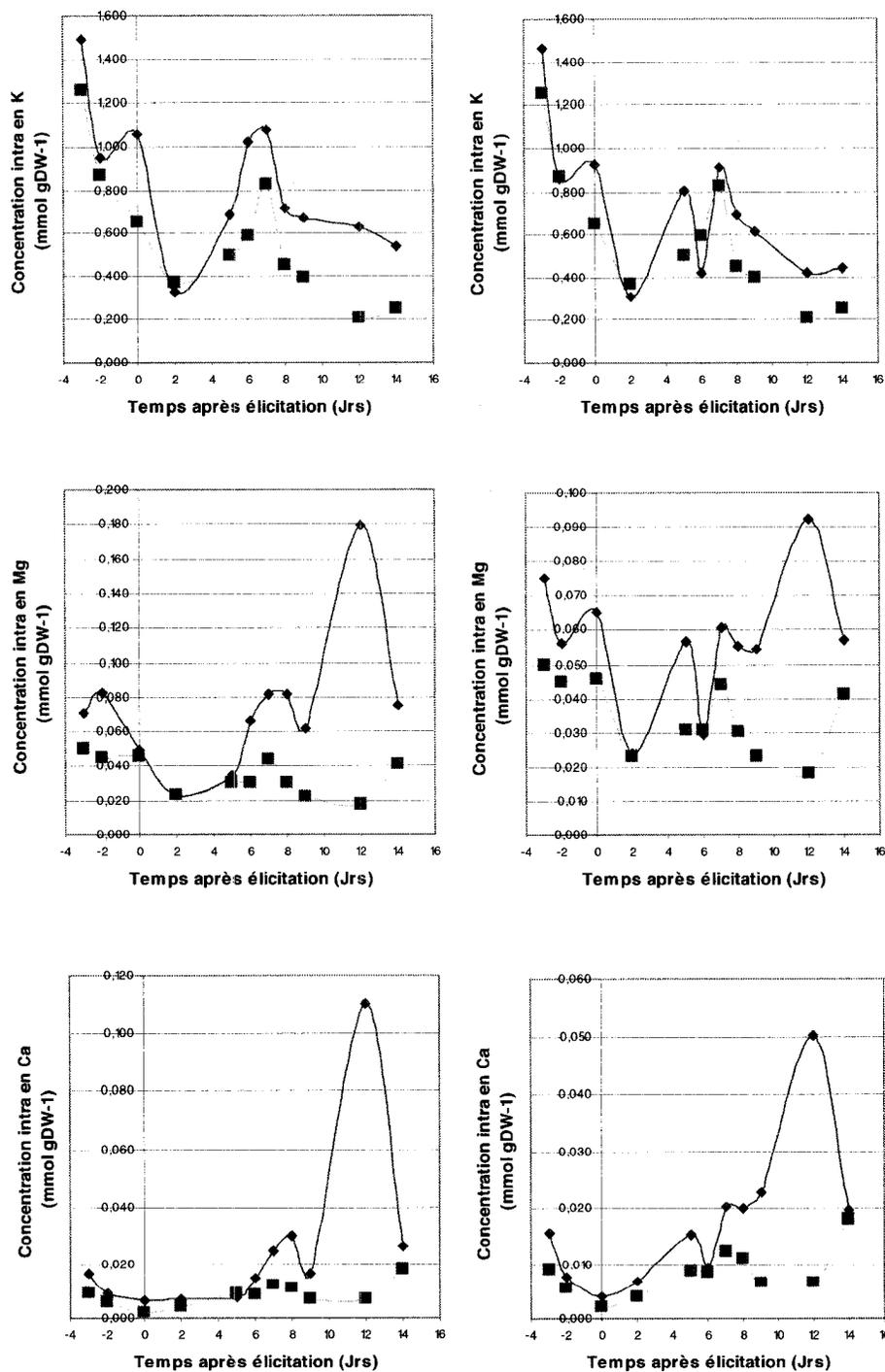


Figure E.3 : ions K⁺, Mg²⁺ et Ca²⁺ intracellulaire pour les bioréacteurs d'ajout de phosphate. ■ : aucun ajout ◆ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 5,6 et 7^e jours ; ▲ : ajouts de 0.1 mM de phosphate aux 7,8 et 9^e jours. Les flèches montrent les ajouts de phosphate.