

Chapitre 1

Introduction

"Things should be made as simple as possible, but no simpler"
Albert Einstein (1879-1955)

Les organismes vivants sont capables de produire des substances naturelles que l'homme exploite pour diverses raisons. Les plantes sont à elles seules une source immense de molécules chimiques complexes utilisées dans les fragrances, l'agroalimentaire, et l'industrie pharmaceutique. Dans beaucoup de cas, la production par voie de synthèse chimique de ces molécules n'est pas possible ou économiquement non rentable. Les biotechnologies connaissent un essor formidable depuis une vingtaine d'années, tant leur développement semble prometteur pour la production rentable de molécules complexes ou pour la découverte de nouveaux principes actifs. Ces techniques utilisent la machinerie cellulaire performante de micro-organismes pour synthétiser des produits chimiques. Si la culture en bioréacteurs de levures et de bactéries a prouvé son efficacité pour de nombreux procédés industriels, l'utilisation de cellules de plantes à l'échelle industrielle reste très marginale.

1.1 Problématique

Actuellement, la majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutiques sont extraites directement de la plante entière cultivée en serre ou en champs. Ces

molécules, appelées métabolites secondaires, ne constituent pas des espèces chimiques impliquées dans la croissance ou la respiration des plantes. En fait, aucun rôle générique pour la plante ne leur a été assigné, car elles englobent des molécules qui peuvent agir dans la protection contre les pathogènes et les ruminants, comme signal chimique, ou qui sont des pigments responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Malgré la grande diversité de métabolites secondaires, les voies de biosynthèse de ces molécules sont connectées au métabolisme primaire de la plante par très peu de chemins métaboliques qui ne sont pas toujours complètement connus. Ainsi, l'optimisation de production de métabolites secondaires passe par la connaissance non seulement des chemins métaboliques secondaires, mais aussi des interactions entre métabolismes primaire et secondaire.

La culture *in vitro* de cellules végétales ou de tissus végétaux différenciés permet de contrôler une large gamme de paramètres contrairement à une culture en serre ou en champ ouvert. Elle permet en outre une culture axénique grâce au maintien de la stérilité des cultures *in vitro*. La recherche sur le métabolisme des plantes est ainsi facilitée et la mise au point de procédés industriels en bioréacteurs visant des hauts rendements en métabolites secondaires devient théoriquement possible. Le problème de la grande sensibilité au cisaillement des cellules végétales a été résolu par la mise au point d'un bioréacteur muni d'agitateurs composé de rubans hélicoïdaux (Jolicoeur et al., 1992). Néanmoins, l'utilisation de cultures *in vitro* de cellules ou de tissus de plantes apporte des difficultés supplémentaires. Le métabolisme secondaire change et parfois, les voies de biosynthèse menant aux métabolites secondaires attendus sont déviées vers la production d'autres métabolites secondaires aux propriétés souvent moins intéressantes. Cependant, il arrive que les nouveaux produits présentent des propriétés pharmacologiques utiles, comme la sanguinarine synthétisée par des cellules de *Papaver somniferum* en suspension et qui est un antibactérien non produit naturellement dans la plante. Certaines compagnies pharmaceutiques misent sur ce phénomène pour découvrir de nouvelles molécules actives. Dans certains cas, il est utile de transformer génétiquement les cellules végétales à l'aide de la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*. Les cellules transformées poussent alors sous la forme d'un tissu racinaire capable de croître sans les parties aériennes

de la plante. Un tel tissu est différencié et possède parfois un métabolisme secondaire différent de celui de celui des cellules en suspension.

La pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) est une plante vivace de la famille des *Apocynaceae* qui produit de nombreux alcaloïdes à noyau indole, dont deux agents anti-mitotiques : la vinblastine et la vincristine. Ces molécules ont un intérêt pharmaceutique considérable, car elles sont utilisées pour le traitement de certains cancers (maladie de Hodgkin, différents lymphomes, sarcome de Kaposi). Le prix de ces molécules est de l'ordre du million de dollars par kilogramme. Cette plante synthétise également naturellement l'ajmalicine et la serpentine qui ont une action hypertensive. Elle remplit parfaitement les critères qui justifient le développement accru de la recherche scientifique pour la compréhension de son métabolisme : les métabolites qu'elle produit ont une valeur économique et pharmaceutique énorme; ces métabolites peuvent être produit par voie de synthèse classique en chimie organique mais à un coût prohibitif; l'utilisation de cellules de *C. roseus* cultivées *in vitro* ne donne pas de rendements suffisants pour envisager un procédé industriel; le métabolisme secondaire observé est différent de celui connu dans la plante entière et sa connaissance reste limitée. A ce titre, elle considérée comme une plante modèle pour la production d'alcaloïdes à noyau indole.

La plupart des travaux de recherche au laboratoire BIOPRO de l'École Polytechnique de Montréal ont porté sur des cellules végétales en suspension de *Papaver somniferum* et sur des racines transformées de carotte. Ce dernier système a été caractérisé sur le plan nutritionnel, ce qui a permis le développement d'un modèle biocinétique structuré basé sur des dynamiques entre différents bassins intracellulaires de nutriments et capable de prédire la croissance des racines transformées de carotte (Bouchard-Marchand , 2000). Néanmoins, la carotte ne produit pas de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée.

Les racines transformée de *C. roseus* ont été choisies comme nouveau système d'étude, vu leur importance économique et scientifique. Elles présentent un potentiel économique énorme, bien qu'il soit prouvé que la production de vincristine et de vinblastine dans les

racines transformées soit actuellement impossible car certaines enzymes clefs participant à la biosynthèse de ces composés ne sont pas exprimées. La communauté scientifique, incluant le laboratoire BIOPRO, s'active à lever les inhibitions qui bloquent pour le moment les voies métaboliques. Misant sur la résolution de ce problème dans un futur proche, l'extension du modèle biocinétique développé par Bouchard-Marchand (2000) aux métabolismes primaire et secondaire des racines transformées de *C. roseus* permettrait de mieux comprendre l'influence de la nutrition sur la production des alcaloïdes de type indole. Une approche de génie métabolique permettrait de vérifier des hypothèses quant aux liens entre l'état nutritionnel et les chemins métaboliques impliqués. Une connaissance approfondie du métabolisme secondaire de *C. roseus* permettrait d'optimiser la production en métabolites secondaire puis d'envisager un procédé à l'échelle industrielle.

1.2 Objectifs de recherche

Dans ce contexte, le projet a pour objectif principal de développer la structure d'un modèle cinétique structuré prédisant les métabolismes primaire et secondaire des racines transformées de *C. roseus* tenant compte de l'état physiologique des racines. Pour réaliser cet objectif, les sous objectifs suivants ont été poursuivis:

- établissement des lignées de racines transformées de *C. roseus*,
- développement des méthodes expérimentales permettant l'observation des phénomènes intracellulaires impliquant les métabolismes primaire et secondaires,
- études des dynamiques nutritionnelles mettant en jeu des nutriments clefs et celles du métabolisme secondaire, ainsi que les liens entre les deux dynamiques,
- étude de l'influence d'une phase organique extractive sélective non miscible avec le milieu de culture sur le métabolisme secondaire des racines afin de déterminer si la production d'alcaloïdes est limitée par un seuil maximum d'accumulation dans les racines,
- développement d'un modèle cinétique structuré reliant la croissance et la production de métabolites secondaires aux dynamiques nutritionnelles observées, à partir du modèle

de Bouchard-Marchand (2000).

1.3 Méthodologie

Les racines transformées de *C. roseus* ont été établies selon les différentes méthodes décrites dans la littérature. Ces protocoles sont testés sur d'autres espèces de plantes ayant un potentiel pharmaceutique, ceci afin d'établir un protocole standardisé de transformation génétique de plantes par *Agrobacterium rhizogenes*. Une confirmation de la transformation génétique des racines est faite par la Polymerase Chain Reaction (PCR).

Les paramètres choisis pour caractériser l'état nutritionnel des racines sont les sources de carbone, d'azote et de phosphore. Plusieurs méthodes d'extraction des espèces ioniques des racines ont été testées et comparées. Les artefacts associés aux différentes méthodes sont discutés. Le protocole final choisi est celui qui minimise l'erreur expérimentale.

La quantification des alcaloïdes de type indole présents dans les racines transformées de *C. roseus* est effectuée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La méthode HPLC est développée dans le but d'obtenir une séparation suffisante permettant la quantification fiable des alcaloïdes et de leurs précurseurs.

Les lignées de racines transformées ont été caractérisées sommairement par la mesure de leur taux de croissance et l'étude de leur métabolisme secondaire au cours de cultures en mode cuvée en milieu liquide. Deux lignées ont été choisies pour caractériser les paramètres cinétiques nécessaires au fonctionnement du modèle mathématique en cultures en mode cuvée et en mode semi-continu.

L'étude de l'effet d'une phase extractive sur le métabolisme secondaire des racines est réalisée sur une lignée de racines en bioréacteurs de 500 ml (volume utile). Le design expérimental permettra la circulation de la phase extractive sur un lit de racines transformées.

Le modèle cinétique est développée à partir du modèle de Bouchard-Marchand (2000). La description du métabolisme primaire est précisée en termes de flux métaboliques et de

stratégies cellulaires pour la régulation de ces flux. Un état physiologique des racines est défini et est fonction des concentrations en nutriments et en intermédiaires réactionnels clés. La description cinétique du métabolisme secondaire est ajoutée et prévoit l'influence de l'état physiologique sur la capacité à synthétiser les différents alcaloïdes. Les différents types de cultures (mode cuvée, semi-continu et continu) ainsi que l'extraction de métabolites secondaires par une phase organique sont intégrés au modèle.

Ainsi, une revue de la littérature sur les différents sujets abordés dans le projet est présentée au chapitre 2. Les troisième et quatrième chapitres sont consacrés au développement des méthodes analytiques utilisées dans ces travaux : l'analyse d'ions intracellulaires et le développement des méthodes HPLC permettant la quantification des alcaloïdes et de leur précurseurs, publication soumise à la revue *Journal of Chromatography A*. Le cinquième chapitre décrit l'établissement des lignées de racines transformées et les différentes études nutritionnelles et métaboliques réalisées sur ces lignées. L'étude de l'influence d'une phase organique sur le métabolisme secondaire des racines transformées est présentée au sixième chapitre sous forme de publication soumise à la revue *Biotechnology Progress*. Le septième chapitre propose la structure du modèle cinétique structuré.