

ACADÉMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THÈSE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

(Spécialité : Physiologie et Biologie des organismes et des populations)

**ÉTUDE COMPARATIVE DE LA BIOSYNTHÈSE DE
ROTÉNOÏDES PAR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES
HÉTÉROTROPHES ET PHOTOMIXOTROPHES DE
Tephrosia vogelii HOOK f.
ESSAIS D'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION**

par

Nadine LAMBERT

Soutenue le 22 MAI 1989 devant le Jury composé de :

Présidente :	Mme Nicole	PARIS-PIREYRE
Rapporteurs :	Mr Hervé	CHRESTIN
	Mr Robert	JONARD
	Mr Yves	SAUVAIRE
Examineurs :	Mr Jean-Jacques	MACHEIX
	Mr Paul	STECK

TDM 59

ORSTOM

Editions de l'ORSTOM

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

Collection :

Travaux et documents microédités

PARIS 1989

ISBN 2-7099-0972-3

© ORSTOM

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, « que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal ».

F5

ABSTRACT :

An heterotrophic and photomixotrophic cell line of *Tephrosia vogelii* Hook f., tropical *Papilionaceae* which accumulates rotenoids (biodegradable insecticides) in its leaves has been studied in order to clear up the impact of light on the phenylpropanoid metabolism *in vitro*. Two distinct apparatuses have been used : 250 ml-Erlenmeyer flasks or 2 liters-experimental bioreactor (Biolafitte).

Growth patterns, intra and extra-cellular accumulation of rotenoids, physiological parameters (respiration, chlorophyllogenesis, photosynthesis) and evolution of mineral and glucidic nutrition are compared. Some important differences in the behaviour have been pointed out, in relation with the photosynthetic potentiality of cell lines, and the type of apparatus.

In all cases, the production of rotenoids is improved in photomixotrophic conditions and it follows the growth kinetics.

Optimization assays for production have been performed : bioconversion from a precursor (L-Phenylalanine) and stimulation by different stresses (pathogen elicitors, salt, pH, ethylene). The results obtained are promising : in some cases, the production is multiplied by a 7,5 factor.

Furthermore we realized a partial characterization of Phenylalanine Ammonia-lyase, the key enzyme of phenylpropanoids pathway. The quantitative evolution of the PAL activity during the cell culture, and its response to different treatments have been studied. Finally the part of the PAL activity in regulatory phenomena controlling rotenoids pathway is discussed.

In vitro culture

Tephrosia vogelii

Rotenoids

Heterotrophy

Photomixotrophy

L-Phenylalanine feedings

Stresses

Phenylalanine Ammonia-lyase

SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
ABSTRACT	3
SOMMAIRE	5
AVANT-PROPOS	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
A) HISTORIQUE DU LABORATOIRE-PRESENTATION DU PROGRAMME DE RECHERCHE	17
B) CHOIX D'UNE PLANTE MODELE : <i>TEPRHOSIA VOGELII</i> HOOK f.	19
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	23
A) PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES <i>IN VITRO</i>	25
1) Potentialités biosynthétiques des cellules végétales <i>in vitro</i>	25
2) Régulation de la production de métabolites secondaires <i>in vitro</i>	27
3) La production de roténoïdes	33
a) <u>Isolement des principes actifs</u>	33
b) <u>Propriétés et utilisations</u>	35
c) <u>Voie de biosynthèse</u>	35
B) LES CULTURES CELLULAIRES PHOTOMIXOTROPHES ET PHOTOAUTOTROPHES	37
1) Obtention de cultures cellulaires photoautotrophes	37
a) <u>Choix du matériel végétal</u>	39
b) <u>Conditions de culture</u>	39
2) Autotrophie et production de métabolites secondaires	43
C) OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES <i>IN VITRO</i>	46
1) L'apport d'éliciteurs	46
a) <u>Définition du terme éliciteur</u>	46
b) <u>Réponses obtenues lors d'élicitation</u>	46
2) Incorporation de précurseurs	49

3) Culture à grande échelle	51
D) LA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE : SON ROLE DANS LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES	55
1) Caractéristiques générales de la PAL	55
2) Rôle métabolique et localisation de la PAL	57
a) <u>Rôle métabolique</u>	57
b) <u>Localisation subcellulaire</u>	57
3) Régulation de l'activité PAL	59
a) <u>Autorégulation</u>	59
b) <u>Influence des facteurs de l'environnement</u>	59
 CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	 65
A) LE MATERIEL VEGETAL	67
1) Description botanique	67
a) <u>Noms vernaculaires</u>	67
b) <u>Description</u>	67
c) <u>Distribution</u>	69
2) Données ethnobotaniques-Utilisations traditionnelles	69
3) Matériel utilisé	69
 B) TECHNIQUES DE CULTURE <i>IN VITRO</i>	 70
1) Préparation du matériel végétal stérile	70
2) Germination et microbouturage <i>in vitro</i>	71
3) Ensemencement primaire : initiation de cals de prolifération	71
a) <u>Conditions de culture</u>	71
b) <u>Entretien du soucier-Repiquage</u>	72
4) Passage en suspension	74
5) Influence de la densité initiale d'ensemencement	74
6) Culture des suspensions cellulaires en Erlenmeyer	74
7) Culture en bioréacteur	76
a) <u>Description du materiel</u>	76
b) <u>Techniques de culture</u>	78
C) METHODES ANALYTIQUES	80

1) Evaluation de la biomasse	80
2) Mesure du pH	80
3) Dosage des sucres	80
a) <u>dosage du glucose et du fructose</u>	81
b) <u>Dosage du saccharose</u>	82
4) Dosage des éléments minéraux	82
a) <u>Dosage du phosphore inorganique Pi</u>	83
b) <u>Dosage des ions sulfates SO₄⁻</u>	83
c) <u>Dosage des ions nitrates NO₃⁻</u>	83
d) <u>Dosage des ions ammonium NH₄⁺</u>	83
5) Dosage des chlorophylles totales	84
6) Mesure des échanges gazeux	84
7) Extraction et dosage des roténoïdes	87
a) <u>Choix et mise au point d'une technique d'extraction</u>	87
b) <u>Efficacité de la technique</u>	87
c) <u>Analyse des roténoïdes</u>	89
8) Extraction et dosage de l'activité PAL	93
a) <u>Extraction des proteines solubles</u>	93
b) <u>Mise en évidence d'une activité PAL</u>	93
c) <u>Mesure de l'activité PAL</u>	96
d) <u>Dosage des proteines solubles</u>	97
e) <u>Calcul de l'activité enzymatique</u>	97
9) Essais de stimulation de la production	98
a) <u>Incorporation de précurseur</u>	98
b) <u>Apport d'éliciteur pathogène</u>	98
c) <u>Apport de solutions tamponnées</u>	101
d) <u>Adjonction de fortes concentrations en sels</u>	101
e) <u>Traitement à l'ethrel</u>	102

CHAPITRE III : OBTENTION ET CARACTERISATION DES	
CULTURES CELLULAIRES HETEROTROPHES ET PHOTOMIXOTROPHES	103
A) CROISSANCE ET PRODUCTION SUR MILIEU GELOSE	105
1) Matériel végétal	105
2) Protocole	105

3) Résultats	107
a) <u>Souches cultivées à la lumière</u>	107
b) <u>Souches cultivées à l'obscurité</u>	109
4) Comparaison-Discussion	109
B) ETUDE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES EN ERLLENMEYER	111
1) Matériel végétal	112
2) Protocole	112
3) Résultats	115
a) <u>Souche hétérotrophe</u>	115
b) <u>Souche photomixotrophe</u>	121
4) Comparaison-Discussion	129
a) <u>Croissance et métabolisme</u>	129
b) <u>Evolution de la production de roténoïdes</u>	133
C) CULTURE EN BIOREACTEUR	138
1) Matériel végétal	139
2) Protocole	139
3) Résultats	141
a) <u>Souche hétérotrophe</u>	141
a1)Premier cycle à l'obscurité	143
a2).Deuxième cycle à la lumière	149
b) <u>Souche photomixotrophe</u>	155
4) Comparaison-Discussion	161
a) <u>Croissance et métabolisme</u>	161
b) <u>Evolution de la production de roténoïdes</u>	166
D) CONCLUSION	167
CHAPITRE IV : ESSAIS D'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES PAR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE <i>TEPHROSIA VOGELII</i>	171
A) INTRODUCTION	173

B) INCORPORATION DE PRECURSEURS	174
1) Matériel utilisé	174
2) Résultats	175
a) <u>Souche hétérotrophe</u>	175
b) <u>Souche photomixotrophe</u>	177
3) Comparaison-Discussion	179
C) EFFETS DES STRESS	180
1) Stress d'origine biotique	181
a) <u>Eliciteurs pathogènes</u>	181
2) Stress d'origine abiotique	195
a) <u>Modification du pH du milieu de culture</u>	195
b) <u>Adjonction de fortes concentrations en sels</u>	199
c) <u>Traitement à l'ethrel</u>	205
D) DISCUSSION GENERALE SUR L'ESSAI D'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION	211
CHAPITRE V : CARACTERISATION ET EVOLUTION D'UNE ENZYME CLE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES ROTENOIDES : LA PAL	213
A) INTRODUCTION	215
B) DEFINITION DES CONDITIONS OPTIMALES DE DOSAGE DE LA PAL	215
1) Linéarité en fonctions du temps d'incubation et de la teneur en protéines	215
a) <u>Matériel végétal</u>	215
b) <u>Protocole</u>	215
c) <u>Résultats</u>	217
2) Effet du pH	217
a) <u>Matériel végétal</u>	217
b) <u>Protocole</u>	217
c) <u>Résultats</u>	219

3) Effet de la concentration en substrat -	
Détermination de la constante de Michaelis-Menten	219
a) <u>Matériel végétal</u>	219
b) <u>Protocole</u>	219
c) <u>Résultats</u>	219
C) EVOLUTION DE L'ACTIVITE PAL DANS LES SUSPENSIONS CELLULAIRES CULTIVEES EN BIOREACTEUR	220
1) Introduction	220
2) Suspensions hétérotrophes	220
3) Suspensions photomixotrophes	223
4) Comparaison-Discussion	225
a) <u>Evolution des roténoïdes intracellulaires</u>	225
b) <u>Evolution des roténoïdes extracellulaires</u>	225
c) <u>Evolution de l'activité spécifique de la PAL</u>	225
d) <u>Corrélation entre activité PAL et production de roténoïdes</u>	228
D) LA STIMULATION DE LA PRODUCTION ET L'ACTIVITE PAL	229
1) Introduction	229
2) Incorporation de L-Phénylalanine	229
a) <u>Suspension hétérotrophe</u>	229
b) <u>Suspension photomixotrophe</u>	231
c) <u>Comparaison-Discussion</u>	233
3) Stress d'origine biotique	237
a) <u>Eliciteur pathogène</u>	237
4) Stress d'origine abiotique	243
a) <u>Modification du pH du milieu de culture</u>	243
b) <u>Adjonction de fortes concentrations en sels</u>	247
c) <u>Traitement à l'ethrel</u>	249
5) Conclusion	251
CONCLUSION GENERALES ET PERSPECTIVES	254
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	267
PLANCHES HORS-TEXTES	297

AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée dans le Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie végétales du centre ORSTOM d'Adiopodoumé (République de Côte d'Ivoire) sous la direction d'Hervé CHRESTIN. Elle se situe dans le contexte d'un programme de recherche général portant sur l'étude des "Bases Physiologiques et Biochimiques contrôlant au niveau cellulaire, la production de substances d'intérêt économique ou thérapeutique", et plus précisément dans le cadre d'une opération développée depuis fin 1985 concernant la "Valorisation des Plantes Médicinales Tropicales par Voie Biotechnologique".

Je tiens tout d'abord à remercier les instances scientifiques de l'ORSTOM : J. M. WACKERMAN et P. MONTSARRAT ainsi que B. MARIN directeur de l'U.R. 603 "Bases physiologiques et Biochimiques de la production végétale" sans qui l'ensemble de ces recherches n'aurait pu être réalisé.

Je prie Mme le Professeur PARIS-PIREYRE, de bien vouloir trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance pour m'avoir guidée au commencement de mes recherches et pour avoir acceptée de présider ce Jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mr H. CHRESTIN Chargé de Recherches à l'ORSTOM et ce à plus d'un titre. Je le remercie pour m'avoir accueillie dans son Laboratoire et proposée ce sujet de thèse, pour m'avoir dirigée, conseillée tout au long de ce travail, mais aussi et surtout pour sa sympathie, son amitié et son enthousiasme.

Je remercie profondément Mr le Professeur JONARD qui a bien voulu accepter à la fois de juger ce travail et d'assumer la charge de rapporteur.

Monsieur Y. SAUVAIRE, Maître de Conférence à l'USTL a accepté d'être rapporteur de ce travail et je l'en remercie vivement. Les entretiens que nous avons eu ont été passionnants et très enrichissants.

Il m'est très agréable de compter parmi les membres de ce Jury Mr le Professeur MACHEIX. Son enseignement à l'USTL de Montpellier m'a montrée l'importance et la

complexité des mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Je remercie Mr P. STECK responsable phytotechnologie Sanofi Elf-Biorecherches, pour m'avoir fait bénéficiaire de sa grande compétence dans le domaine de la production industrielle de métabolites secondaires par voie biotechnologique. Je lui sais aussi gré d'avoir accepté de faire partie du Jury de cette thèse.

C'est avec un immense plaisir que je saisis l'occasion de la présentation de cette thèse pour exprimer toute ma reconnaissance à Mme M. F. TROUSLOT chargé de Recherches à l'ORSTOM d'Adiopodoumé en Côte d'Ivoire avec qui j'ai travaillé durant ces trois années en étroite collaboration.

Je tiens également à remercier Mme C. NEF chargé de recherches à l'ORSTOM d'Adiopodoumé en Côte d'Ivoire pour son soutien sans limite dans les moments difficiles, ses nombreuses suggestions sur l'orientation de mes recherches et son importante disponibilité à mon égard.

L'ambiance de collaboration qui a entouré ce travail a été excellente. Je tiens à exprimer mes amicaux remerciements aux collègues intimement associés à certains aspects de cette thèse. Je citerai parmi eux I. HARDY-CLARIS, J. LORQUIN, M. NIAMIEN, A. RIVAL, F. TARDIEU et P. TROUSLOT.

Messieurs B. MARIN et M. RAIMBAULT m'ont accueillie au sein de l'Unité Fonctionnelle de Biotechnologie du Centre ORSTOM de MONTPELLIER et m'ont fournie toutes les facilités pour la rédaction de ce mémoire. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes chaleureux remerciements.

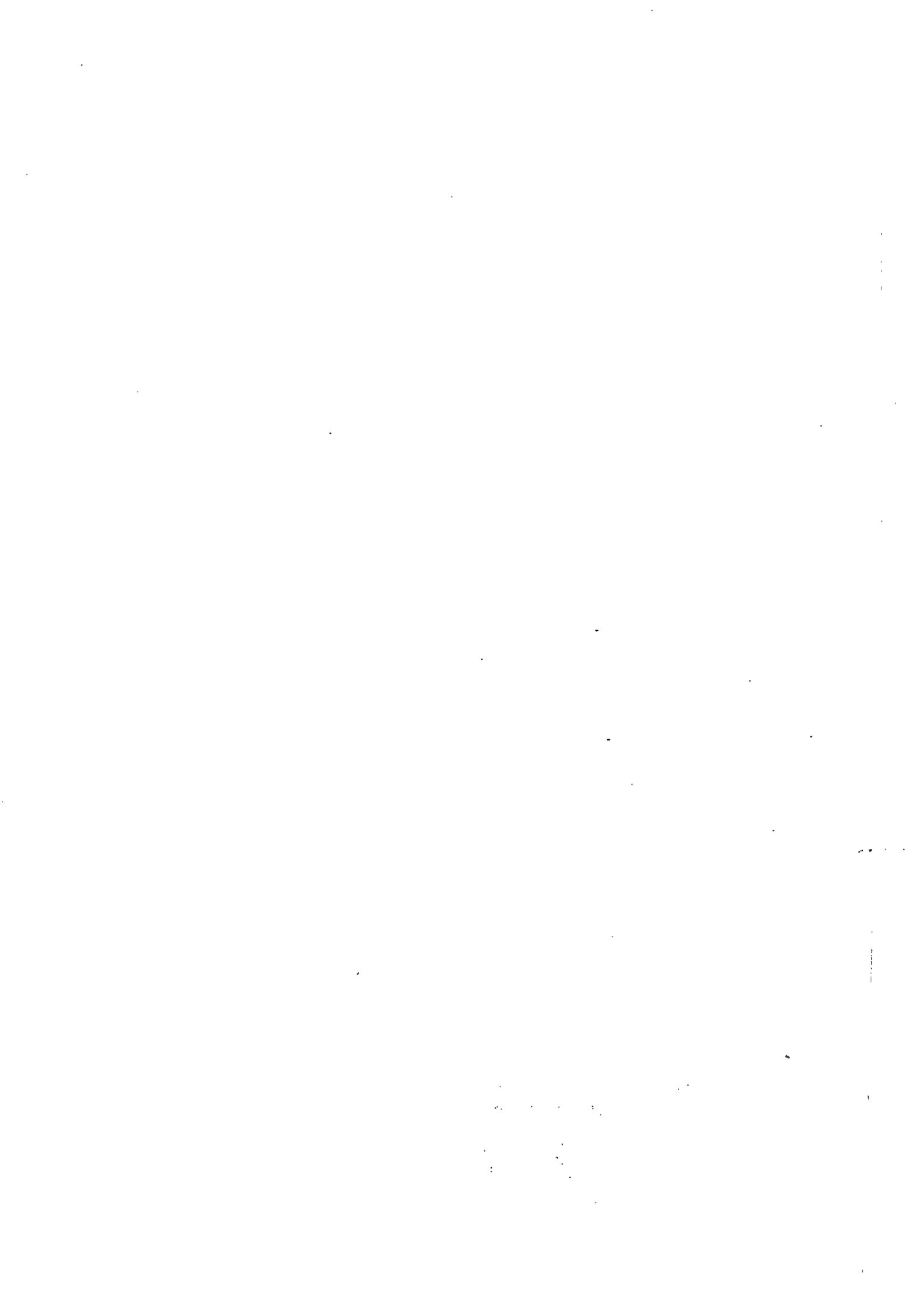
Enfin mes remerciements vont également à toute l'équipe du Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie végétales du centre ORSTOM d'Adiopodoumé et notamment à P. ZADI KOUBI et C. TOLLAH pour l'obtention et l'entretien du matériel végétal in vitro. Qu'ils sachent que je les remercie tous sans exception, pour leur aide, leur sympathie et leur joie de vivre.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABA	: Acide abscissique.
ADN	: Acide désoxyribonucléique.
ADP	: Adénosine 5'-diphosphate.
AIA	: Acide indole acétique.
AIB	: Acide indolylbutyrique.
ANA	: Acide naphtalène acétique.
ARN	: Acide ribonucléique.
ATP	: Adénosine 5'-triphosphate.
ATPase	: Adénosine triphosphatase.
BAP	: Benzyl amino purine.
C.C.M.	: Chromatographie couche mince.
C. P.	: Capacité photosynthétique.
2,4-D	: Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.
D. O.	: Densité optique.
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra-acétique.
EGTA	: Acide éthylène glycol tétra-acétique.
F-6-P	: Fructose-6-phosphate.
GA ₃	: Acide Gibbérellique.
G-6-P	: Glucose-6-phosphate.
HgCl ₂	: Chlorure mercurique.
HPLC	: High performance liquid chromatography.
K	: Kinétine, 6-Furfuryl-Amino -Purine.
Km	: Constante de Michaelis.
L. S.	: Linsmaier et Skoog (milieu de).
MES	: Acide N-morpholino éthane sulfonique.
MF	: Masse fraîche.
min	: Minute.
MOPS	: 3-N morpholinopropane sulfonique.
MS	: Masse sèche.
M.S.	: Murashige et Skoog (milieu de).

NAD(H)	: Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite).
NADP(H)	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite).
PAL	: Phénylalanine ammonia-lyase.
PCA	: Acide perchlorique.
pCO ₂	: Pression partielle en CO ₂ .
Pfr	: Active form of phytochrome (far red, rouge sombre).
pH	: Potentiel des ions hydroxonium.
Pi	: Phosphate inorganique.
Pms	: <i>Phythophthora megasperma</i> var <i>sojae</i> .
pO ₂	: Pression partielle en O ₂ .
rpm	: Rotation par minute.
TCA	: Acide trichloroacétique.
Td	: Temps de doublement.
Tris	: Tris hydroxyméthyl aminométhane.
UV	: Ultra violet.
VS	: Volume sédimenté.
v/v	: Volume par volume.
VVH	: Volume de gaz par volume de culture et par heure.

INTRODUCTION



INTRODUCTION

A) HISTORIQUE DU LABORATOIRE-PRESENTATION DU PROGRAMME DE RECHERCHE

Les Pays en Développement se heurtent quotidiennement aux problèmes posés par les grandes endémies et le manque chronique de soins de santé primaire apportés aux populations locales.

Ainsi, aussi paradoxalement que cela puisse paraître, près de 30% des médicaments élaborés, et consommés dans le monde, sont à base de composés extraits de plantes médicinales tropicales.

Localement, en zone rurale, elles permettent de préparer des "remèdes" servant au traitement de nombreuses maladies. Chaque habitant connaît et utilise les vertus d'une ou plusieurs plantes.

En Afrique noire en général, la médecine traditionnelle assure de 80 à 90 % de la couverture sanitaire de la population (AKE ASSI, 1983).

Cependant la valorisation des plantes médicinales potentiellement intéressantes se heurte à de nombreux problèmes dont notamment un approvisionnement en végétaux directement tributaire des conditions climatiques et géopolitiques des pays producteurs, des teneurs en principes actifs très aléatoires...

Aussi est-il apparu important de développer des solutions alternatives pour l'obtention de ces produits.

Depuis quelques années, l'intérêt s'est tourné vers les cellules végétales qui, cultivées à grande échelle, devraient fournir une source continue et stable de composés naturels destinés en particulier à l'industrie pharmaceutique. Le résultat pourrait être une meilleure indépendance économique et un contrôle plus strict de la régularité et de la qualité de la production.

Le Laboratoire de physiologie du centre ORSTOM d'Adiopodoumé (République de Côte d'Ivoire) s'intéresse, depuis une vingtaine d'années, aux bases physiologiques et biochimiques de la production du cis-polyisoprène (caoutchouc naturel) chez *Hevea brasiliensis*.

L'ensemble des recherches menées en collaboration avec l'IRCA a permis

d'appréhender les mécanismes impliqués dans la production et d'améliorer celle-ci (D'AUZAC *et al.*, 1989).

En 1985, le Laboratoire s'est doté d'une unité de biotechnologie, dans laquelle a été initié le programme de **valorisation des plantes médicinales tropicales par voie biotechnologique**.

A partir des données bibliographiques, concernant les plantes médicinales utilisées dans la Pharmacopée ivoirienne et/ou introduites en Côte d'Ivoire (KERHARO et BOUQUET, 1950 ; BOUQUET et DEBRAY, 1974 ; etc.) deux espèces, *Abrus precatorius* L. (glycyrrhizine, antiseptique, édulcorant) et *Tephrosia vogelii* Hook f. (roténoïdes, notamment la roténone, pesticide biodégradable) ont été choisies par le Laboratoire comme plantes modèles pour les recherches *in vitro*, en raison de :

- * leurs fortes teneurs en principes actifs décrites dans la littérature
- * la nature de leurs métabolites, issus de préférence de la voie mévalonique, vu la spécialisation du Laboratoire en ce domaine.

Une même démarche et des objectifs scientifiques identiques ont été poursuivis pour ces deux plantes :

- * Un souchier de cals et de suspensions hétérotrophes et photomixotrophes a été mis en place afin d'effectuer une étude comparative des marqueurs du métabolisme primaire (Croissance - Métabolismes azoté et glucidique) en relation avec la production de métabolites secondaires *in vitro*. Des essais de caractérisation de systèmes enzymatiques clés du métabolisme primaire et secondaire ont été effectués.

- * L'intérêt potentiel de la fonction chlorophyllienne dans la biosynthèse de métabolites secondaires *in vitro* (essais d'obtention de cultures autotrophes) a été également appréhendé. Les chloroplastes semblent être fortement impliqués au niveau des voies de biosynthèse des métabolites secondaires étudiés.

- * Sur la base des connaissances acquises, des essais d'optimisation de la production de substances recherchées ont été réalisés par bioconversion (incorporation de précurseurs) et stimulation par des stress : hormonal, salin, pH, éliciteurs pathogènes... éventuellement appliqués à des plantes sélectionnées, cultivées en plein champs.

L'ensemble des résultats obtenus à partir de ces plantes modèles pourra ensuite être transposé à des plantes synthétisant des métabolites à hautes valeurs ajoutées, telles que *Catharanthus roseus* L. G. Don (alcaloïdes, antileucémiques, hypotenseurs) étudiée également au Laboratoire.

Le travail qui nous a été confié plus particulièrement concerne l'étude des effets de stress et d'incorporation de précurseurs dans le milieu sur la production de **roténoïdes** par des cultures cellulaires de *Tephrosia vogelii*.

B) LE CHOIX D'UNE PLANTE MODELE : *TEPHROSIA VOGELII* HOOK f.

Tephrosia vogelii Hook f. est une *Papilionaceae* cultivée traditionnellement en Afrique tropicale humide pour ses propriétés ichthyotoxiques et parasitocides.

Cette plante accumule dans ses feuilles de fortes teneurs en principes actifs : **des roténoïdes 0,65 à 4,25 % MS**, le dosage ayant été effectué sur 500 plantes (IRVINE et FREYRE, 1959). Les roténoïdes sont des isoflavonoïdes (Figure 1), composés issus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et comportant une unité isoprène (voie mévalonique).

* Les roténoïdes sont des molécules toxiques pour les animaux à sang froid et atoxiques par voie buccale pour les animaux à sang chaud (PARIS et MOYSE, 1967).

Les poudres roténonées sont utilisées dans la lutte contre les parasites des plantes alimentaires (la roténone, composé le plus actif, étant biodégradable, elle est en effet sensible à la lumière et aux UV), et en médecine, contre les parasites de l'homme et des animaux (PARIS et MOYSE, 1967). La consommation annuelle mondiale de poudre roténonée est de 70 tonnes/an.

La résine de roténoïde (extrait brut de racine de *Derris*) est plus spécialement utilisée en aquaculture comme antiprédateur, et en aviculture, comme antiparasitaire externe en Australie. La consommation annuelle mondiale est de 6 tonnes/an, le prix s'élevant à 250 FF/Kg.

De la roténone à l'état pur est également commercialisée pour ses propriétés inhibitrices au niveau du transport des électrons des mitochondries animales et végétales

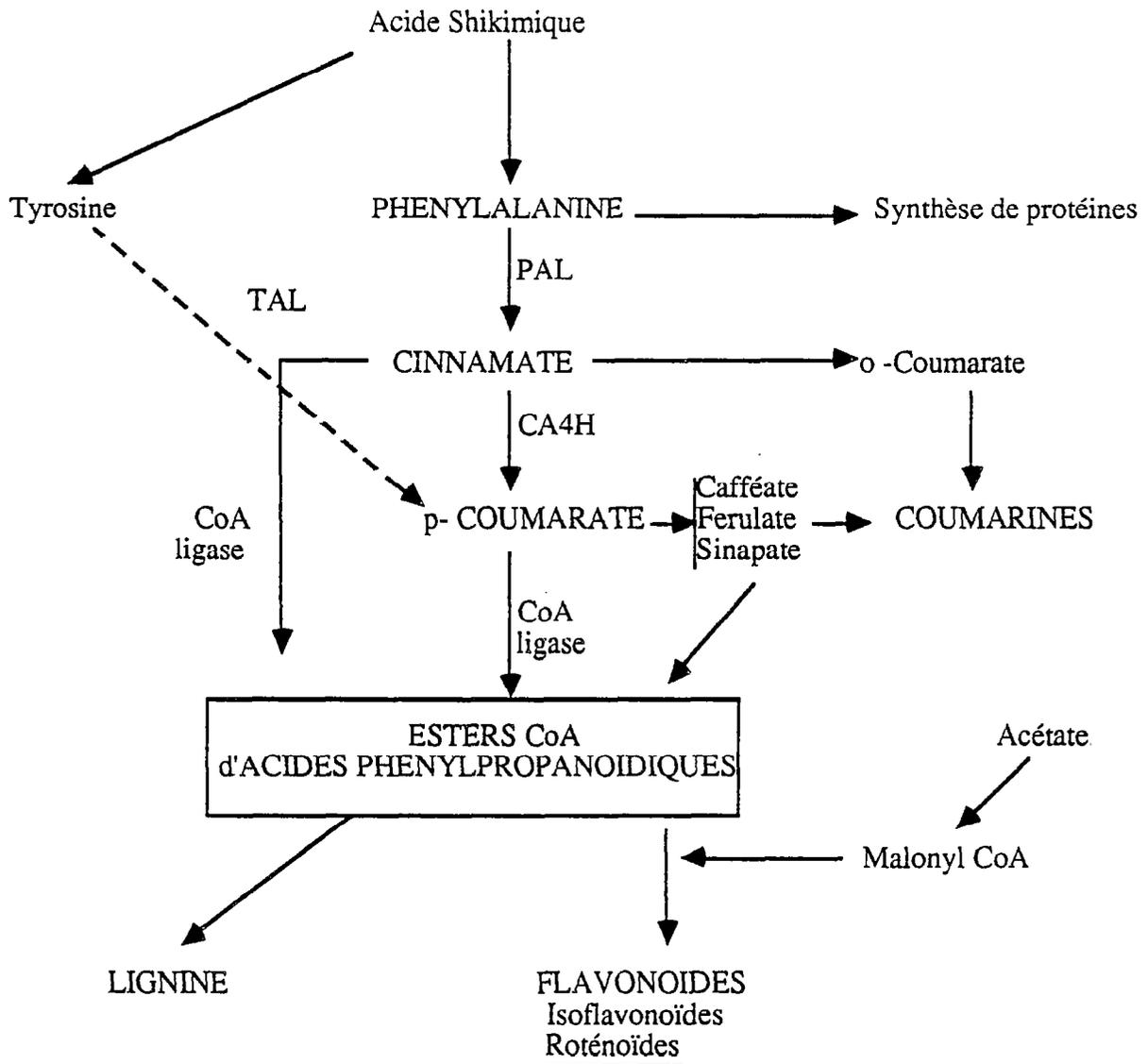


Figure 1 : VOIE DE BIOSYNTHESE DES ROTENOÏDES (d'après SMITH et al., 1977)

(TAL : Tyrosine Ammonia-Lyase ; PAL : Phénylalanine Ammonia-Lyase ;
CA4H : Acide Cinnamique 4 Hydroxylase).

(utilisée pour des expérimentations en Laboratoire). Les principaux agents de commercialisation de ces produits sont Aldrich et Sigma (USA), environ 30 Kg/an à un prix s'échelonnant entre 3 500 et 4 000 FF/Kg. (communication personnelle Mr. GRINDA, Saphir Antibes).

Un des débouchés également prometteur de la roténone est son activité helminthicide, pouvant être utilisée en pharmacie vétérinaire et humaine. (Communication personnelle Mr. GRINDA)

La synthèse par voie chimique de la roténone n'est pas rentable actuellement.

La roténone est aujourd'hui exclusivement extraite d'une *Papilionaceae* sud-américaine : *Derris elliptica*, liane robuste de 7 à 10 m de long, dont les racines contiennent en moyenne 8 % de roténoïdes totaux. La récolte a lieu à la fin de la 2^{ème} année. Seules les extrémités racinaires sont exploitées pour leurs fortes teneurs en roténone active (PARIS et MOYSE, 1967).

La grande majorité des racines de *Derris* provient du Pérou et plus particulièrement d'une région qui connaît actuellement de sérieux problèmes politiques.

Les contraintes de techniques culturales (cycle long, faible masse d'extrémité racinaire), les importations massives et coûteuses de plantes soumises aux aléas climatiques et conjoncturels nous autorisent à considérer *Tephrosia vogelii* comme une **source potentielle de roténoïdes permettant d'envisager à long terme, une certaine autosuffisance aux Pays en Voie de Développement (en Afrique) en matière d'insecticides biodégradables** (LAMBERT *et al.*, 1988).

* Les roténoïdes appartiennent biogénétiquement à la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Cette voie de biosynthèse a été beaucoup étudiée et l'on connaît actuellement en partie les mécanismes de sa régulation (ALIBERT *et al.*, 1977 ; HAHLBROCK, 1977 ; MACHEIX *et al.*, 1981 ; JONES, 1984 ; DIXON et BOLWELL, 1986 ; IBRAHIM, 1987).

Les produits issus de cette voie de biosynthèse (flavonoïdes, isoflavonoïdes, coumarines et furocoumarines ...) ne sont pas actuellement d'une grande importance économique. Cependant, suffisamment d'informations sont maintenant disponibles sur les modes de régulation enzymatique de leurs formations, pour faire de cette voie de biosynthèse, un modèle précieux pour la définition de mécanismes de régulation de portée plus générale.

L'originalité de cette voie de biosynthèse est de faire intervenir une enzyme, la phenylalanine ammonia-lyase qui occupe une place stratégique entre le métabolisme primaire et secondaire. Elle est facilement inductible sous l'effet de différents facteurs ou stress et plus particulièrement de la lumière, facteur essentiel dans les mécanismes cellulaires des végétaux.

Il sera donc intéressant d'analyser la production de roténoïdes en relation avec l'activité PAL, en fonction de la nature des souches cellulaires (hétérotrophe et photomixotrophe) d'une part et de différents stress d'autre part.

CHAPITRE I :

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

A) PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES *IN VITRO*

1) Potentialités biosynthétiques des cellules végétales *in vitro*.

C'est au physiologiste allemand, G. HABERLANDT (1854-1946) que revient le mérite d'avoir, vers les années 1900, imaginé et réalisé les premières cultures *in vitro* de cellules végétales. En 1902, G. HABERLANDT déclarait que "la mise en culture de cellules végétatives séparées de plantes supérieures dans un milieu nutritif simple devrait être riche d'enseignements sur les capacités que la cellule possède comme organisme élémentaire" (KRIKORIAN et BERQUAM, 1969). Ses premiers essais ne permirent qu'une survie temporaire des cellules cultivées, sans reprise d'activité mitotique et finalement l'équipe d' HABERLANDT resta sur un échec.

Il faudra attendre plus de trente ans pour que les résultats obtenus par A. CARRELL, en 1912, sur des cellules animales soient également observés avec des cellules végétales.

Les premiers succès obtenus par P. NOBECOURT et R. G. GAUTHERET, en France et par J. P. WHITE aux Etats-Unis démontraient la possibilité de cultiver des tissus végétaux en dehors du contexte de la plante, de façon indéfinie et sous forme d'amas cellulaires indifférenciés (WHITE, 1939a ; GAUTHERET, 1939 ; NOBECOURT, 1940).

Le perfectionnement des techniques a permis à W. H. MUIR, A. C. HILDEBRANDT et A. J. RICKER en Allemagne, d'établir en 1954, les premières cultures de cellules en suspension, comparables à celles pratiquées pour les micro-organismes (MUIR *et al.*, 1958).

Libérées des contraintes de leur environnement *in vivo*, les cellules végétales, dotées d'un potentiel génétique considérable comparé à celui des microorganismes, sont alors susceptibles d'exprimer des propriétés originales par rapport à la plante dont elles sont issues.

Les cultures de tissus, ou les suspensions cellulaires, sont couramment qualifiées de "dé-différenciées", en ce sens que les cellules qui constituent le végétal ont perdu les caractéristiques particulières qu'elles avaient au sein de l'organisme entier. Par dérépression de leur programme génétique, elles ont regagné une sorte de totipotence

(STECK et PETIARD, 1985).

Les cultures cellulaires végétales ont d'abord trouvé des applications très importantes en agronomie et en agriculture (AUGE *et al.*, 1986 ; CHALEFF, 1986 ; RAO, 1978 ; COCKING, 1985 ; EVANS, 1988).

L'aptitude de certaines lignées de massifs cellulaires à la régénération de la plante entière a été exploitée, non seulement pour produire en un temps limité un très grand nombre de copies conformes d'un même individu (micropropagation), mais aussi en vue d'une amélioration des variétés végétales existantes (meilleure résistance aux affections virales, par exemple) ou pour la création de nouvelles espèces.

Les recherches concernant l'exploitation potentielle des cellules végétales dans un but de production de métabolites secondaires n'ont cependant pas connu un tel essor.

En effet, dans la majorité des cas décrits dans la littérature jusqu'au début des années 70, on ne détectait que peu, ou pas, de métabolites secondaires. Les chercheurs supposèrent alors que certaines structures ou organes spécialisés, rencontrés dans la plante entière, étaient indispensables à la biosynthèse des métabolites secondaires (dans YEOMAN *et al.*, 1982).

Ce n'est qu'à partir de 1977 qu'il a été démontré que des cellules indifférenciées morphologiquement pouvaient synthétiser des métabolites secondaires, en dehors de toute différenciation organogène. L'équipe de ZENK a en effet mis en évidence l'existence d'une variabilité spontanée *in vitro* dans la biosynthèse de métabolites secondaires, selon la souche considérée (ZENK *et al.*, 1977).

Cette diversité naturelle, convenablement utilisée, devrait permettre de sélectionner des souches plus productrices que d'autres.

Le développement des recherches et les progrès réalisés ont ensuite été très rapides et se sont concrétisés par le dépôt de nombreux brevets notamment au Japon et en Allemagne. Puis en 1983, a eu lieu la première commercialisation d'un produit issu de culture *in vitro* par la firme japonaise Mitsui Petrochemicals. Il s'agit de la shikonine, un colorant extrait de cultures cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon* (TABATA et FUJITA, 1985).

De l'ensemble des travaux réalisés et publiés à ce jour, plusieurs faits importants se dégagent.

Il s'avère maintenant possible, par clonage, de sélectionner des souches produisant

autant, et même plus, que la plante entière (Tableau I).

Cette variabilité *in vitro*, peut également s'exprimer de manière qualitative et permettre l'apparition de métabolites originaux, absents de la plante mère.

Ainsi à partir d'une souche de *Catharanthus roseus* l'isolement et l'analyse structurale de 13 alcaloïdes ont montré que seuls 7 d'entre eux avaient été précédemment identifiés dans cette espèce (PETIARD *et al.*, 1982). Trois autres étaient déjà connus dans d'autres espèces de la même famille et les trois derniers n'avaient jamais été décrits comme existant à l'état naturel.

ARENS *et al.* (1982), pour leur part, ont isolé de suspensions cellulaires de *Picralima nitida* deux alcaloïdes indoliques, la péricine et la péricalline, qui présentent des activités analgésiques. Le premier composé n'avait jamais été décrit.

Ceci montre que la déstabilisation du métabolisme cellulaire lors du passage *in vitro* peut ouvrir de nouvelles voies de biosynthèse (STECK et PETIARD, 1985). Ces composés originaux pourraient constituer une source intéressante de principes actifs pour la pharmacie.

Une autre forme possible d'exploitation des cultures cellulaires végétales repose sur leur capacité de biotransformations *in vitro* (hydroxylation, glucosylation, déhydrogénation, hydrogénation, ouverture de cycles...), dont les applications sont nombreuses.

Une des plus intéressantes, pour l'industrie pharmaceutique, est l'hydroxylation par des suspensions cellulaires de *Digitalis lanata* de la digitoxine (en position 12 B) en β methyl digoxine (REINHARD ET ALFERMANN 1980).

Les cellules végétales peuvent également produire des molécules nouvelles lorsqu'on leur fournit un substrat inhabituel. Ainsi, une suspension cellulaire de *Mallotus japonicus*, peut glycosyler l'acide salicylique (UMETAMI *et al.*, 1982).

Dans tous les cas, pour une souche donnée, la production de métabolites secondaires *in vitro* est largement dépendante de facteurs biologiques et de l'environnement, déterminés par la composition du milieu de culture et les conditions de culture.

2) Régulation de la production de métabolites secondaires *in vitro*

Dans un système de culture discontinue, la production de métabolites secondaires

TABLEAU IQUELQUES EXEMPLES RECENTS DE PRODUCTIVITE *IN VITRO*

(D'après STECK et PETIARD, 1985)

COMPOSE	ESPECE	RAPPORT DE TENEUR SOUCHE/PLANTE	REFERENCE
Vomilenine	<i>Rauwolfia serpentina</i>	x 51	STOCKIGT <i>et al.</i> 1981
Jatrorrhizine	<i>Dioscoreophyllum cuminsii</i>	x 100	FURUYA <i>et al.</i> 1983
Caféine	<i>Coffea arabica</i>	x 92	WALLER <i>et al.</i> 1983
Berbérine	<i>Coptis japonica</i>	x 6	YAMADA 1984
Tripdioline	<i>Trypterygium wilfordii</i>	x 4,3	MISAWA <i>et al.</i> 1983

par les cellules est modifiée au cours du cycle de la culture en réponse à une modification du taux de croissance ou à la disponibilité en substrat. L'accumulation de métabolites secondaires en relation avec la croissance peut se réaliser suivant deux modèles :

1) L'accumulation de produits s'effectue durant la phase stationnaire de croissance, il y a alors antagonisme entre croissance et accumulation de métabolites. C'est le cas de nombreux métabolites secondaires : anthocyanines dans des cultures cellulaires de *Daucus carota* (NOE *et al.*, 1980), ajmalicine et serpentine dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* (AMBID *et al.*, 1982 ; MERILLON *et al.*, 1983), acide rosmarinique chez *Anchusa officinalis* (DE-EKNAMBUL et ELLIS, 1984) et composés phénoliques dans des suspensions cellulaires d'*Acer pseudoplatanus* (PHILLIPS et HENSHAW, 1977).

2) L'accumulation de métabolites est concomitante à la phase exponentielle de croissance, comme pour la biosynthèse de bétacyanines chez *Phytolacca americana* (SAKUTA *et al.*, 1986) ou de diosgénine chez *Dioscorea deltoidea* (DRAPEAU *et al.*, 1986b). De même chez *Galium* (WILSON et MARRON, 1978), *Berberis* (HINZ et ZENK, 1981) ou encore chez *Coleus blumei* (ZENK *et al.*, 1977), la production a lieu simultanément avec la croissance, le maximum d'accumulation étant finalement obtenu en fin de phase exponentielle.

Ainsi, il est clair que des conditions qui sont optimales pour la croissance, ne le sont pas toujours pour la biosynthèse de métabolites secondaires.

FUJITA *et al.*, (1981a, b) ont montré que le milieu favorisant la croissance de suspensions cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon* était différent de celui qui induisait la production de shikonine. Sur la base de ces données, ils ont établi un milieu de production (M9), sans ammonium et avec des teneurs en nitrates, phosphates, sulfates et saccharose légèrement modifiées par rapport au milieu initial de WHITE (1939 b). Après une croissance optimale sur le premier milieu, les cellules sont transférées sur ce milieu de production.

De même, ZENK *et al.* (1977) ont mis au point un milieu de production permettant l'accumulation d'importantes teneurs en alcaloïdes dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*. Ce milieu diffère du milieu standard de culture, notamment par la présence d'AIA, de Benzyladénine, de 5% de saccharose et de 0,05 % de L-tryptophane.

Parmi les facteurs de l'environnement susceptibles d'affecter l'expression du

métabolisme secondaire au sein des cellules végétales cultivées *in vitro*, les hormones de croissance et en particulier les auxines (connues notamment pour leurs effets sur l'auxesis et la meresis) jouent un rôle important.

L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), par exemple, exerce des effets divers sur la production de métabolites secondaires. L'accumulation de diosgénine et de solasodine, en particulier, est optimale lorsque le 2,4-D est apporté à la concentration de 1 à 9 μM aux cultures de *Dioscorea deltoidea* (MARSHALL et STABA, 1976) et de *Solanum laciniatum* (HOSADA *et al.*, 1979).

Par contre, le 2,4-D aux concentrations de 2,2 et 4,5 μM peut inhiber intensément la formation de nicotine dans les cellules de *Nicotiana tabacum* (TABATA *et al.*, 1971 a) de serpentine et d'ajmalicine dans celles de *Catharanthus roseus* (ZENK *et al.*, 1977 ; KNOBLOCH et BERLIN, 1980 ; ROUSTAN *et al.*, 1982).

De la même façon, la synthèse de shikonine dans des cultures cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon* est totalement inhibée par le 2,4-D et l'ANA, l'AIA ayant un effet fortement positif. Le 2,4-D semble bloquer, dans ce cas, le métabolisme du géranylhydroquinone, intermédiaire clé dans la biosynthèse de la shikonine (TABATA *et al.*, 1982 ; INOUE *et al.*, 1979).

Il en est de même pour la production de composés phénoliques qui est inhibée, dans des cultures cellulaires d'*Acer pseudoplatanus*, par la présence de 2,4-D (PHILLIPS et HENSHAW, 1977), alors que l'ANA et l'AIA stimulent la formation d'anthocyanines dans des suspensions cellulaires de *Populus* (MATSUMOTO *et al.*, 1973). Dans des suspensions cellulaires d'*Anchusa officinalis*, l'ANA a également un effet stimulateur sur la formation d'acide rosmarinique (DE-EKNAMKUL et ELLIS, 1985 b).

Les cytokinines (qui interviennent sur la caulogénèse et dans la régulation de l'activité mitotique en étroite relation avec les auxines) peuvent avoir des effets très différents suivant le type de métabolites et l'espèce végétale considérés. Par exemple, la 6-benzyladenine (BA) et la kinétine stimulent l'accumulation d'anthocyanines dans des suspensions cellulaires d'*Haplopappus gracilis* (CONSTABEL *et al.*, 1971) et la production de berberine dans des cultures de *Thalictrum minus* (NAKAGAWA *et al.*, 1986).

Par contre, la kinétine inhibe la formation d'anthocyanines dans des suspensions cellulaires de *Populus* (MATSUMOTO *et al.*, 1973) et la synthèse de caroténoïdes dans les cultures de carotte (MOK *et al.*, 1976).

Peu d'études à notre connaissance ont été réalisées sur l'effet des autres hormones végétales.

La gibbérelline (très largement impliquée dans la croissance des entre-noeuds, des feuilles et dans la germination de certaines semences) inhibe la production de shikonine dans des cals de *Lithospermum* mais n'affecte pas la croissance (YOSHIKAWA *et al.*, 1986).

L'acide gibbérellique et l'acide abscissique (inhibiteur naturel très répandu), suppriment l'accumulation d'anthocyanines dans des suspensions cellulaires de carotte (OZEKI et KOMAMINE, 1986).

Un autre facteur pouvant intervenir dans la teneur et la nature des composés produits est la source azotée.

L'effet de l'azote sur la production de métabolites secondaires doit être considéré en tant que rapports C/N et $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$.

WESTCOTT et HENSHAW (1974) ont montré que la formation de tannins dans des suspensions cellulaires de sycomore était promue en augmentant le rapport C/N.

YAMAKAWA *et al.* (1983), ont également établi que la production d'anthocyanines dans des suspensions cellulaires de *Vitis* était sous l'influence du rapport C/N du milieu de culture.

Chez *Dioscorea deltoidea*, l'ammonium et le nitrate sont tous les deux indispensables pour l'obtention d'une croissance et d'une production de diosgénine optimale (TAL et GOLDBERG, 1982 ; TAL *et al.*, 1982).

Par contre FUJITA *et al.* (1981a) ont démontré que l'abaissement de la concentration en ammonium chez *Lithospermum erythrorhizon* augmentait la teneur en dérivés de la shikonine, le nitrate ayant pour sa part une action stimulatrice.

Le phosphate, autre élément entrant dans la composition des milieux de culture influe également sur la production de métabolites secondaires, mais son action peut être très contradictoire.

Le phosphore inorganique peut avoir un effet inhibiteur sur la biosynthèse des métabolites secondaires. Ainsi, de fortes teneurs en phosphates diminuent la synthèse d'alcaloïdes chez des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*, de cinnamoyl-putrescine chez *Nicotiana tabacum* (KNOBLOCH et BERLIN, 1980 ; 1981), et d'acide rosmarinique dans des suspensions cellulaires d'*Anchusa officinalis* (DE-EKNAMKUL

et ELLIS, 1985 a) .

Contrairement à ces résultats, l'augmentation de la teneur en phosphate stimule la formation de digitoxine chez *Digitalis purpurea* (HAGIMORI *et al.*, 1982). De même l'accumulation de bétacyanines chez *Phytolacca americana* est augmentée en présence de phosphate (SAKUTA *et al.*, 1986).

Parmi les facteurs du milieu pouvant modifier la production des métabolites secondaires, la source carbonée est un élément important, car elle peut agir non seulement sur le niveau de production mais aussi sur la croissance cellulaire (DOUGALL, 1980).

La mise en évidence d'un effet positif du saccharose (ou d'un autre glucide) sur la production de métabolites secondaires a été réalisée par MIZUKAMI *et al.* (1977) sur des cals de *Lithospermum erythrorhizon* mais également par BALAGUE et WILSON (1982) sur des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* cultivées temporairement dans un milieu appauvri en substrat carboné. Des observations similaires ont été faites sur des cultures en batch de nombreuses espèces végétales lors d'apport de concentrations croissantes en glucides, sur la production de polyphénols (WESCOTT et HENSHAW, 1976), d'anthocyanines par *Daucus carota* (OZEKI et KOMAMINE, 1985) d'acide rosmarinique dans des suspensions cellulaires d'*Anchusa officinalis* (DE-EKNAMKUL et ELLIS, 1985 a) et d'anthocyanines dans des cultures cellulaires de *Catharanthus roseus* et de *Vitis* (KNOBLOCH *et al.*, 1982 ; YAMAKAWA *et al.*, 1983).

L'augmentation de la teneur en sucres peut cependant avoir un effet négatif sur la production, comme dans le cas de l'obtention de l'ubiquinone par *Nicotiana tabaccum* (IKEDA *et al.*, 1976).

La lumière joue également un rôle dans un certain nombre de voies métaboliques. Trois possibilités dans ces relations lumière / voie métabolique :

1) La lumière stimule la production de métabolites secondaires.

Il est maintenant reconnu que la production de composés phénoliques *in vitro* est influencée à la fois par la qualité et l'intensité de la lumière.

La lumière blanche induit ou stimule la formation de dérivés flavones (BRUNET et IBRAHIM, 1973 ; KREUZALER et HAHLBROCK, 1973) et des anthocyanines (KNOBLOCH *et al.*, 1982).

La lumière bleue est beaucoup plus efficace sur la biosynthèse des polyphénols (SUZUKI *et al.*, 1981).

L'effet stimulateur de la lumière sur la production de composés phénoliques est à relier à ses effets sur la régulation des enzymes de la voie de biosynthèse de phénylpropanoïdes (HAHLBROCK, 1977).

2) La lumière inhibe la biosynthèse de métabolites secondaires.

C'est notamment le cas des cultures cellulaires de *Lithospermum* dont la production de dérivés de la shikonine (issue de la voie de l'acide shikimique) est complètement inhibée en présence de lumière blanche et de lumière bleue (TABATA *et al.*, 1974).

3) La lumière n'a aucun effet direct sur la production de métabolites secondaires, mais pourrait influencer les phénomènes de compartimentations cellulaires.

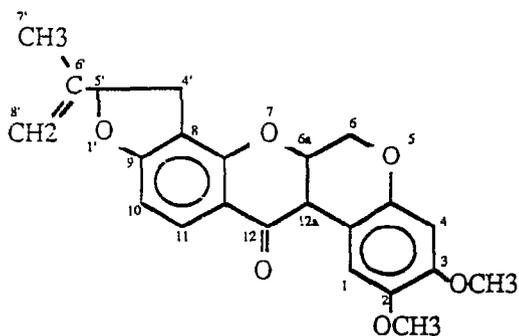
3) La production de roténoïdes

a) Isolement des principes actifs

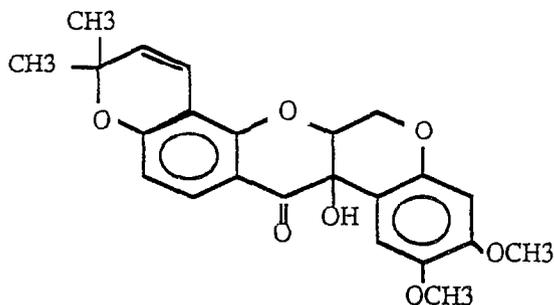
Tephrosia vogelii accumule de la roténone et des roténoïdes essentiellement dans ses feuilles (CASTAGNE, 1938 ; IRVINE et FREYRE, 1959 ; DELFEL *et al.*, 1970).

La roténone, le principe actif majeur, a d'abord été isolée sous forme d'une poudre puis obtenue à l'état cristallisé au début du siècle. Sa constitution fut définitivement établie par BUTENANDT en 1928.

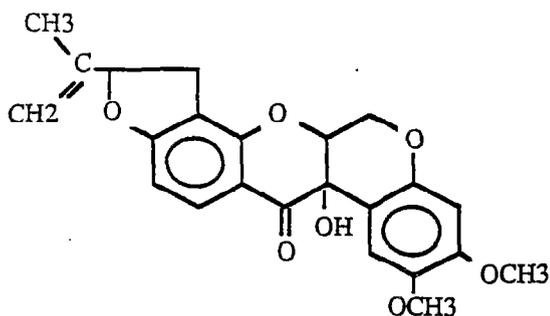
Parmi la dizaine de composés isolés, quatre principes actifs majeurs ont été pris en considération durant notre étude. Ce sont :



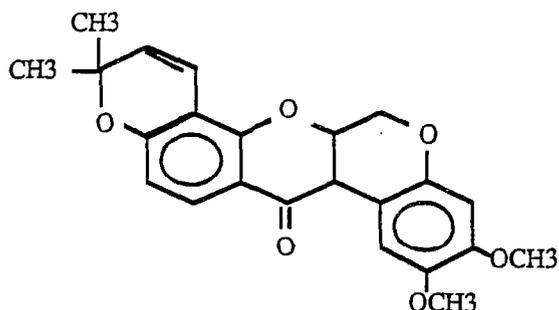
ROTENONE



TEPHROSINE



ROTENOLONE



DEGUELINE

La répartition de ces composés dans les feuilles de *Tephrosia vogelii* récoltées sur nos parcelles expérimentales est la suivante :

ROTENOLONE	TEPHROSINE	ROTENONE	DEGUELINE	ROTENOIDES TOTAUX
0,095	0,083	0,32	3,65	4,15
2,3 %	2,0 %	7,7 %	88 %	

Résultats obtenus après 3 répétitions sur notre matériel en plein champ en dehors de la période de floraison de la plante, exprimés en % de MS.

Cette forte concentration en déguéline dans les feuilles de *Tephrosia vogelii* a déjà été observée par de nombreux auteurs. La roténone ne représente quant à elle qu'une très

faible part des roténoïdes totaux (7 à 12 %) et peut être même parfois absente de certains clones (DELFEL *et al.*, 1970 ; CARLSON et TALLENT, 1970).

b) Propriétés et utilisations

Les propriétés insecticides de la roténone, ont été étudiées systématiquement en Europe et aux Etats-Unis vers 1930.

La toxicité de la roténone s'exerce sur les animaux à sang froid par ingestion ou simple contact et pour des dilutions de l'ordre de 1×10^{-6} . La dégueline est environ 10 fois moins active, la téphrosine 40 fois moins que la roténone (PARIS et MOYSE, 1967).

Chez l'homme et les animaux à sang chaud, ces différentes substances sont pratiquement dépourvues de toxicité par voie buccale (la DL_{50} pour le rat est de 133 $mg.kg^{-1}$, Index Merck), mais par injection intraveineuse, elles peuvent provoquer la paralysie respiratoire et la mort par asphyxie.

La roténone inhibe à 10^{-7} M le transfert des électrons du $NADH_2$ vers la flavine à la fois dans les mitochondries animales et végétales (ERNSTER *et al.*, 1963 ; IKUMA et BONNER, 1967).

c) Voie de biosynthèse

La figure 2 montre les étapes successives de la voie de biosynthèse de la roténone. Il est tiré d'une part des travaux de CROMBIE *et al.* (1971, 1982) sur la biosynthèse du roténoïde amorphigénine, d'après des expériences d'incorporation dans des graines en germination d'*Amorpha fruticosa*, et d'autre part, de divers articles sur la biosynthèse des flavonoïdes (EBEL et HAHLBROCK, 1982).

Les roténoïdes sont des isoflavonoïdes complexes qui comportent, avec le noyau isoflavone $C_6-C_3-C_6$ (cycles A C B) une unité isoprène attachée sur la position 8 du cycle A. Le cycle B porte des groupes méthoxyles.

Il est bien établi que le premier intermédiaire formé dans la biosynthèse de tous les flavonoïdes est une chalcone (7) ; le cycle A dérive de la condensation tête-queue de trois unités acétate et l'unité C_6 (cycle B)- C_3 dérive de la phénylalanine *via* le métabolisme général des phénylpropanoïdes (HAHLBROCK et GRISEBACH, 1979 ; EBEL et HAHLBROCK, 1982).

Dans une seconde étape, la chalcone isomérase catalyse la formation stéréospécifique de la (2S)-flavanone (8) à partir de la chalcone correspondante (DIXON *et al.*, 1982).

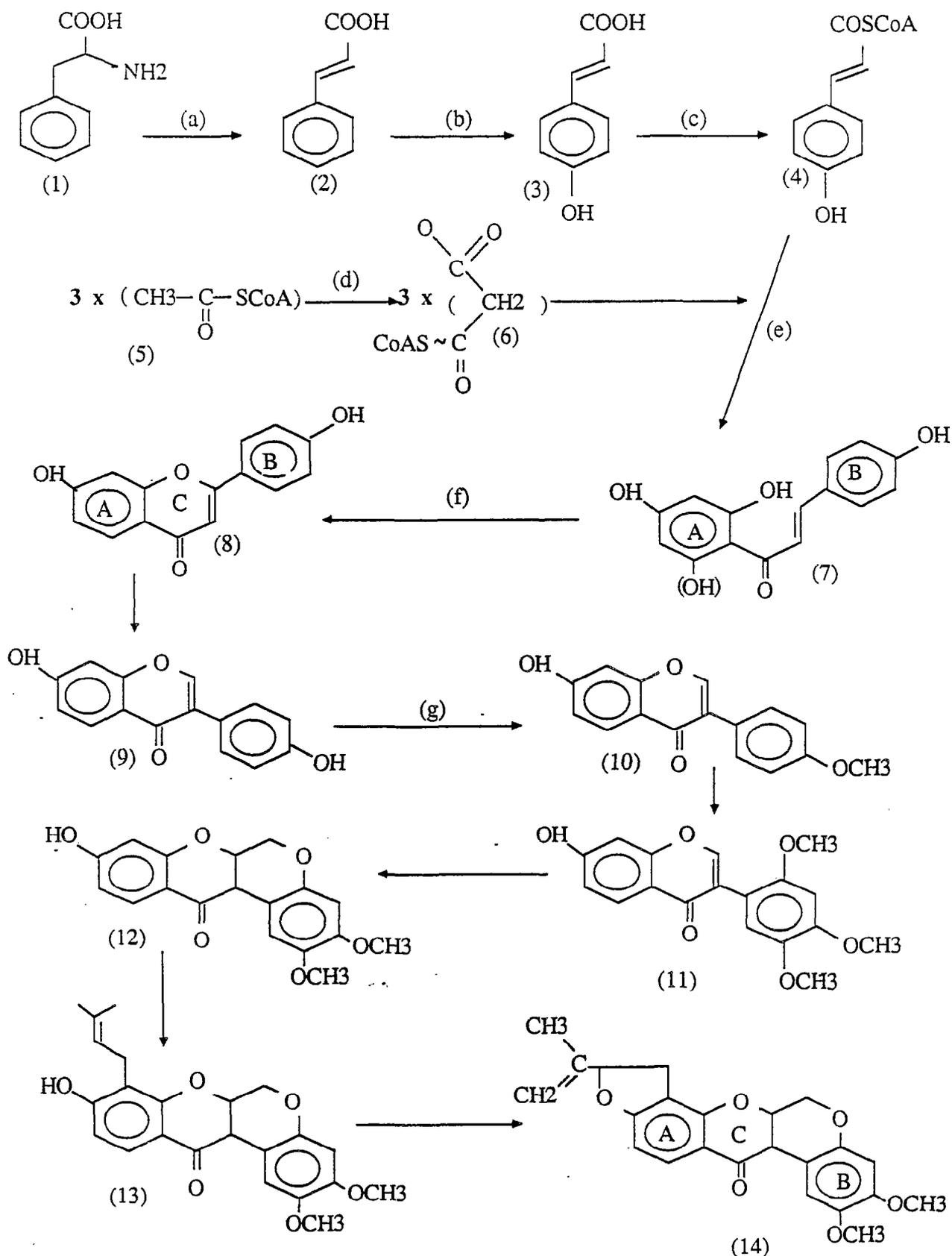


Figure 2 : SCHEMA DE BIOSYNTHESE DE L'ISOFLAVONOIDE ROTENONE

(1) Phénylalanine ; (2) Cinnamate ; (3) 4-Coumarate ; (4) 4-Coumaroyl-CoA ; (5) Acétyl-CoA ; (6) Malonyl CoA ; (7) Trihydroxychalcone ; (8) Dihydroxyflavone ; (9) Daidzéine ; (10) Formonétine ; (11) 7-Hydroxy-2', 4', 5'-triméthoxyisoflavone ; (12) 9-Deméthylmuduserone ; (13) Acide roténonique ; (14) Roténone .

ENZYMES : (a) Phénylalanine ammonia-lyase ; (b) Cinnamate 4-hydroxylase ; (c) 4-Coumarate CoA ligase ; (d) Acetyl CoA carboxylase ; (e) Chalcone synthase ; (f) Chalcone isomérase ; (g) S-adenosyl-méthionine isoflavone 4-méthyltransferase.

Il semble démontré que les isoflavones (9) dérivent des chalcones et des flavanones bien que le mécanisme de la migration du cycle B de C₂ à C₃ ne soit pas connu.

Un argument favorable : l'accroissement de l'isoflavonoïde glycéolline dans des suspensions cellulaires de soja coïncide avec une forte augmentation des activités des enzymes du métabolisme général phénylpropanoïde, de la chalcone synthase et de la chalcone isomérase (ZHRINGER *et al.*, 1979).

L'isoflavone formononétine (10) est un intermédiaire dans la formation des roténoïdes : roténone et amorphigénine chez *Amorpha fruticosa*.

Les enzymes impliquées dans les réactions ultérieures ne sont pas connues. Une phényltransférase est présente dans des extraits de cellules de soja cultivées en suspension (ZHRINGER *et al.*, 1979) ; elle catalyse *in vitro* l'isoprénylation de l'isoflavonoïde 3,6a,9-trihydroxyptérocarpane (LEUBE et GRISEBACH, 1983).

La localisation subcellulaires de cette voie de biosynthèse n'est pas connue ; cependant il semblerait, d'après les données bibliographiques disponibles, que les chloroplastes soient largement impliqués.

Ainsi, les chloroplastes de nombreuses espèces végétales contiennent des phénylpropanoïdes et/ou des flavonoïdes ainsi que des enzymes du métabolisme phénolique (WEISSEMBOCK et SCHNEIDER, 1974 ; WIERMANN, 1981 ; HANSON et HAVIR, 1981). De plus, l'isoprénylation dans les roténoïdes pourrait être liée au chloroplaste. L'enzyme HMG-CoA réductase régulateur de la formation du mévalonate est présent dans les chloroplastes (BROOKER et RUSSEL, 1975 ; GRUMBACH et BACH, 1979). La phényl transférase catalysant l'ortho-prénylation de la 7-hydroxycoumarine est une enzyme chloroplastique (DHILLON et BROWN, 1976).

B) LES CULTURES CELLULAIRES PHOTOMIXOTROPHES ET PHOTOAUTOTROPHES

1) Obtention de cultures cellulaires photoautotrophes

In vitro, les cellules issues d'explants foliaires de végétaux supérieurs se comportent de manière hétérotrophe : la présence d'une source de carbone organique, telle que le saccharose, dans le milieu de culture, est nécessaire à leur croissance. Même à la lumière, elles n'expriment plus, ou peu, leur aptitude à la photosynthèse. Ainsi, cette voie de

TABLEAU II

QUELQUES EXEMPLES DE SUSPENSIONS CELLULAIRES PHOTOAUTOTROPHES

PLANTE	CONDITIONS DE CULTURE			REFERENCES
	MILIEU	LUMIERE	CO2	
<i>Nicotiana tabacum</i>	M. S. 2,4-D 0,1 mg.l-1 Kin 0,05 mg.l-1	2500 lux (continue)	2% dans l'air	CHANDLER <u>et al.</u> (1972)
<i>Chenopodium rubrum</i>	M. S. 2,4-D 0,02 mg.l-1	8000 lux (continue)	2% dans l'air	HUSEMANN & BARZ (1977)
<i>Nicotiana tabacum</i>	L. S. ANA 2 mg.l-1 Kin 0,2 mg.l-1	14 000 lux (continue)	1 % dans l'air	YAMADA & SATO (1978)
<i>Marchantia polymorpha</i>	M. S. 2,4-D 1 mg.l-1	13 W.m2 (continue)	1 % dans l'air	KATOH <u>et al.</u> (1979)
<i>Spinacia oleracea</i>	M. S.	120 μ E.m-2.s-1 (continue)	1 % de CO2	DALTON (1980)
<i>Nicotiana tabacum</i>	L. S. ANA 2 mg.l-1 Kin 0,2 mg.l-1	3000 - 8000 lux (continue)	1 % CO2 14 % O2 85 % N2 ou 1% dans l'air	YAMADA <u>et al.</u> (1981)
<i>Chenopodium rubrum</i>	M. S.	8000 lux (continue)	Solution tampon 2M KHCO3 / K2CO3	HUSEMANN (1981)
<i>Asparagus officinalis</i>	M. S. ANA 1 mg.l-1 Kin 0,5 mg.l-1	120 μ E. m-2.s-1 16H de photopériode	1% dans l'air	PEEL (1982)
<i>Chenopodium rubrum</i>	M. S.	10 000 lux (continue)	Solution tampon 2M KHCO3 / K2CO3	HUSEMANN (1983)

biosynthèse qui fait l'originalité des cellules chlorophylliennes, n'est généralement pas développée par les cellules maintenues *in vitro*.

Ce n'est qu'en soumettant les cellules préalablement sélectionnées à des conditions de cultures particulières que l'on peut les amener à utiliser leur matériel chloroplastique leur permettant d'acquérir l'autotrophie.

L'évolution des cultures vers la photoautotrophie est marquée par un état dit photomixotrophe au cours duquel les deux voies métaboliques, hétérotrophes et autotrophes, coexistent et participent à la croissance cellulaire.

Quelques exemples de suspensions cellulaires autotrophes sont rassemblés dans le tableau II.

L'ensemble de ces travaux ont permis de dégager une méthodologie générale d'obtention de cellules photoautotrophes.

a) Choix du matériel végétal

Le matériel végétal de départ peut être constitué soit de cultures déjà établies en hétérotrophie (cals ou suspensions), soit d'explants chlorophylliens primaires. Les cultures les plus chlorophylliennes sont sélectionnées et placées dans des conditions particulières de culture.

b) Conditions de culture

Tout d'abord, le milieu de culture doit être judicieusement choisi pour : la croissance des cellules vertes, le maintien de l'aspect vert, le passage progressif à l'autotrophie.

Certains éléments paraissent être déterminants pour ces cultures : les substances de croissance, l'apport glucidique, la lumière et la disponibilité en CO₂.

Les substances de croissance

* Si les auxines favorisent la prolifération cellulaire, elles n'ont pas généralement un rôle promoteur de la chlorophyllogénèse. Ainsi, le 2,4-D inhibe souvent la chlorophyllogénèse, sur des feuilles intactes ou des cellules *in vitro* (SHEWRY *et al.*, 1971 ; SUNDERLAND, 1966), aux doses habituellement utilisées.

L'AIA et l'ANA peuvent cependant induire un verdissement cellulaire mais l'ANA est l'auxine la plus utilisée (YAMADA *et al.*, 1978), l'AIA présentant l'inconvénient d'être photolabile.

TABLEAU II (SUITE)

PLANTE	CONDITIONS DE CULTURE			REFERENCES
	MILIEU	LUMIERE	CO2	
<i>Marchantia polymorpha</i>	M. S. 2,4-D 1 mg.l-1	90-165 μ E.m-2.s-1	1 % dans l'air	KATOH (1983)
<i>Glycine max</i>	M. S. ANA 1 mg.l-1 Kin 0,2 mg.l-1	200-300 μ E.m-2.s-1	5 % dans l'air	HORN <u>et al.</u> (1983))
<i>Solanum tuberosum</i>	M. S. . 2,4-D 3 mg.l-1 Kin 0,2 mg.l-1	90-110 μ E.m-2.s-1 Photopériode de 16h	2 % dans l'air	LA ROSA <u>et al.</u> (1984)
<i>Euphorbia characias</i>	M. S. ANA 1 mg.l-1 BAP 1 mg.l-1	100-130 μ E.m-2.s-1 Photopériode de 16h	2% dans l'air	HARDY <u>et al.</u> (1987)
<i>Dianthus caryophyllus</i>	M. S. ANA 2 mg.l-1 BAP 0,2 mg.l-1	100-120 μ E.m-2.s-1 (continue)	1% dans l'air	REBEILLE (1988)

Néanmoins, certaines cultures sont réalisées en présence de 2,4-D (HUSEMAN et BARZ, 1977 ; TYLER *et al.*, 1986).

* Les cytokinines, qui régulent la cytodifférenciation avec les auxines, sont connues par contre pour induire le verdissement dans des cals non chlorophylliens (KAUL et SABHARWAL, 1971).

Des souches hétérotrophes, se développant sans cytokinines nécessitent la présence de ces hormones pour obtenir un verdissement (NEUMANN et RAAFAT, 1973 ; EL HINNAWAY, 1974).

La kinétine (K) et la Benzyl aminopurine (BAP) sont les deux cytokinines les plus fréquemment utilisées .

D'une façon générale, les optimums de concentration (auxines et cytokinines) pour les cultures autotrophes diffèrent de ceux utilisés pour les cultures hétérotrophes (SATO *et al.*, 1981).

__ L'apport glucidique

L'addition d'une source carbonée organique est nécessaire pour la callogénèse.

Or, la présence de sucres, et notamment de saccharose, inhibe la chlorophyllogénèse et l'activité photosynthétique des cellules cultivées *in vitro* (KAUL et SABHARWAL, 1971 ; NEUMANN et RAAFAT, 1973 ; YAMADA et SATO, 1978).

D'autres sources de carbones, telles que le glucose (DALTON et STREET, 1977 ; EDELMAN ET HANSON, 1972), ou l'amidon (JASPAR, 1965), n'exercent pas une inhibition aussi marquée sur le verdissement.

Les cals chlorophylliens initiés sur un milieu riche en glucides, doivent être progressivement transférés sur un milieu sans sucre favorisant la photoautotrophie.

__ La lumière

* La synthèse de chlorophylle a été étudiée *in vitro* sur différents matériels : des cellules de cals de tabac (BERGMANN et BERGER, 1966) et de carotte (DUBOIS, 1973). Du point de vue qualitatif, ces auteurs ont montré l'influence des radiations dans le rouge et le bleu sur la synthèse des chlorophylles, celle-ci n'ayant cependant pas lieu sous un éclairage uniquement rouge.

* Du point de vue quantitatif, dans bien des cas, l'intensité lumineuse agit comme un facteur limitant de la croissance des cellules chlorophylliennes (DALTON, 1980 ; NATO *et*

al., 1982 ; PEEL, 1982 ; DALTON et PEEL, 1983 ; KATOH, 1983) en interaction étroite avec la teneur en CO₂ (HANSON et EDELMAN, 1972), et en saccharose (YAMADA et SATO, 1978).

DUBOIS (1973) a montré, sur des tissus isolés de carotte, que la durée journalière d'éclairement conditionnait la croissance et la synthèse des pigments, les jours longs favorisant la chlorophyllogénèse.

— Le CO₂

L'enrichissement des cultures en dioxyde de carbone compense la diminution de l'apport en saccharose, et favorise la voie autotrophe.

Il est en effet très difficile de cultiver tout type de cellules photoautotrophes en fournissant seulement de l'air aux cultures (environ 0,03 % en CO₂).

Ainsi, YAMADA et SATO (1978) n'obtiennent une croissance prolongée de leur suspension cellulaire autotrophe de tabac qu'en présence d'air enrichi en CO₂ : la teneur optimale est voisine de 1 %.

HUSEMANN et BARZ (1977) doublent le taux de croissance de leur culture photoautotrophe de *Chenopodium rubrum* en augmentant le pourcentage de CO₂ de 0,5 à 1 %. La teneur en chlorophylle, et la fixation photosynthétique du CO₂, sont également augmentées sensiblement.

Ces travaux indiquent que pour obtenir des cultures photoautotrophes en croissance active, la teneur en CO₂ de l'air est insuffisante. Ce fait peut s'expliquer :

- * par une mauvaise diffusion dans les cellules à cause du phénomène d'agrégation ;
- * par un transfert gaz ---> liquide non optimal dans les cultures liquides ;
- * par une faible activité anhydrase carbonique (TZUZUKI *et al.*, 1981) ;
- * par une photorespiration importante (HORN et WIDHOLM, 1984).

L'apport nécessaire de CO₂ excédentaire aux cultures cellulaires autotrophes peut se faire directement, sous forme gazeuse (air enrichi en CO₂) ou, plus rarement, sous la forme d'une solution de carbonate (KHCO₃/K₂CO₃).

2) Autotrophie et production de métabolites secondaires

Le rétablissement de la fonction chlorophyllienne entraîne-t-il des différences qualitatives et /ou quantitatives, au niveau de la production de métabolites secondaires ?

Chez le lupin (*Lupinus polyphyllus*), la synthèse d'alcaloïdes est très fortement stimulée dans des conditions de culture photomixotrophe (5 à 10 fois) et semble dépendante de l'activité photosynthétique. Ceci est en accord avec la synthèse chloroplastique au moins partiellement de ces composés ou de leurs précurseurs (HARTMANN *et al.*, 1980 ; WINK et HARTMANN, 1982). Ces auteurs ont observé une corrélation positive entre synthèse d'alcaloïdes et teneur des cellules en chlorophylles.

Une corrélation similaire a été retrouvée par YEOMAN *et al.* (1982) dans une étude plus détaillée sur plusieurs espèces de Solanacées et de Légumineuses.

IGBAVBOA *et al.* (1985) ont démontré, pour leur part, que la synthèse d'antraquinone dans des suspensions cellulaires de *Morinda lucida* est liée à l'hétérotrophie, alors que la synthèse de lipoquinone semble plus spécialement liée à l'activité photosynthétique.

Ceci est en accord avec les observations faites sur la plante entière, où les lipoquinones sont synthétisées dans les chloroplastes alors que les anthraquinones sont accumulées au niveau des racines.

La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, *in vitro*, semble toute indiquée pour étudier l'intérêt de l'autotrophie ou encore de la mixotropie par rapport à l'hétérotrophie.

La PAL, enzyme clé de cette voie de biosynthèse, a été localisée au niveau des chloroplastes de nombreuses espèces (ALIBERT *et al.*, 1977 ; HANSON et HAVIR, 1981).

De plus, un effet positif de la lumière sur la production de phénylpropanoïdes a déjà été observé, notamment dans des cultures cellulaires de *Petroselinum hortense* (HAHLBROCK *et al.*, 1976) où la lumière induit la synthèse des composés flavonoïdiques. La production est alors corrélée à l'activité optimale de toutes les enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes, (et notamment de la PAL), et de la voie des flavonoïdes (EBEL et HAHLBROCK, 1977).

ALIBERT *et al.*, (1977) ont proposé un mode d'organisation original des différentes séquences du métabolisme phénolique au niveau subcellulaire, dans lequel les chloroplastes sont largement impliqués (Figure 3).

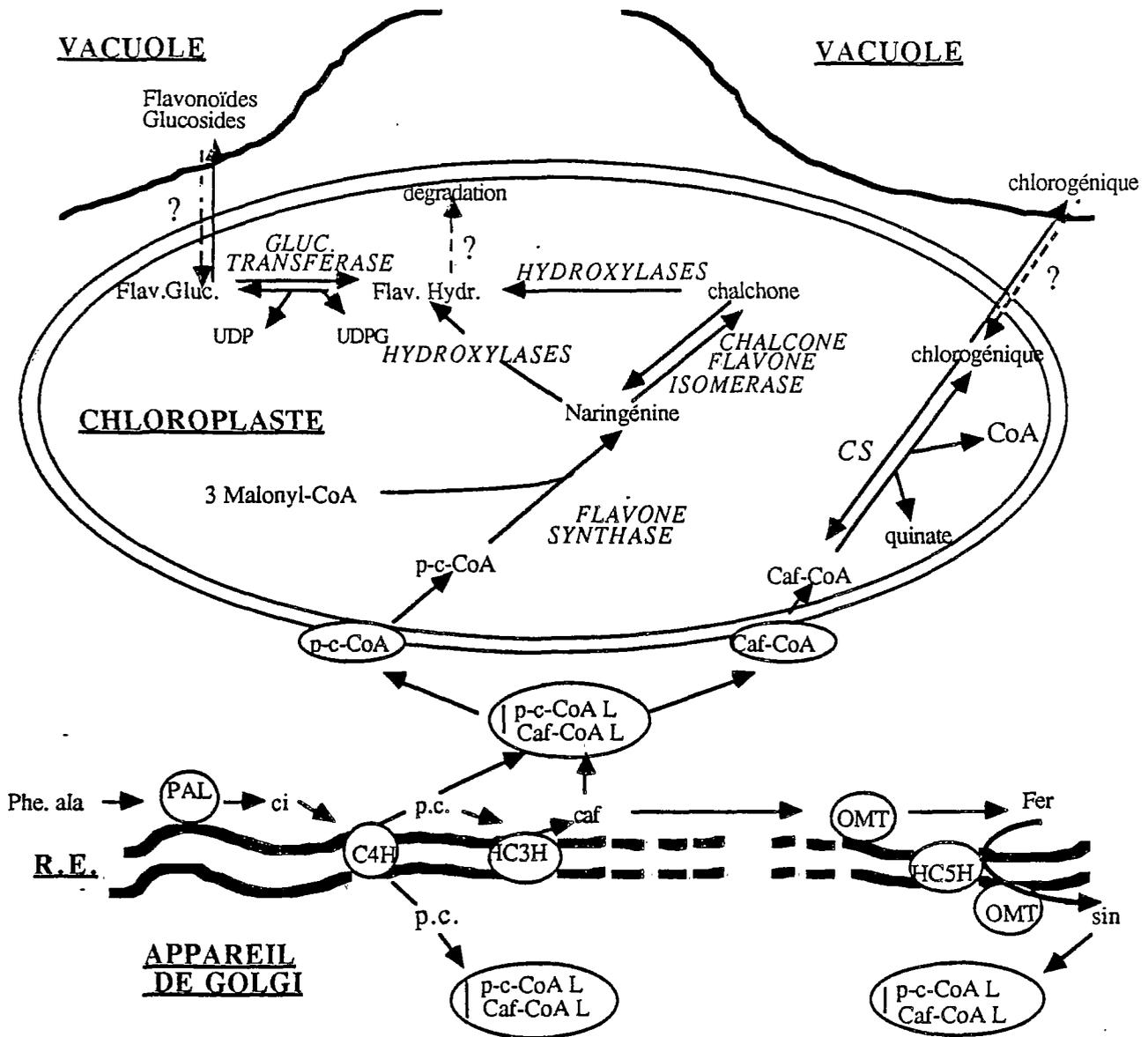


Figure 3 : ORGANISATION SUBCELLULAIRE DES VOIES DE BIOSYNTHESE DES ESTERS CINNAMIQUE ET DES FLAVONOÏDES (D'après ALIBERT *et al.*, 1977).

ABREVIATIONS : Caf-CoA : Caféoyl-CoA ; Caf-CoA L : Caféoyl-CoA Ligase ; ci : Cinnamique ; C4H : Cinnamate 4-hydroxylase ; C.S. : Chlorogénate synthase ; Flav. gluc. : flavonoïdes glucosylés ; Flav. Hydr. : Flavonoïdes hydroxylés ; HC3H : 4-hydroxycinnamate 5-hydroxylase ; HC5H : 3,4-hydroxycinnamate 5-hydroxylase ; OMT : O-méthyltransférase ; p-c. : p-coumarique ; p-c.CoA : p-coumaroyl CoA ; p-c.CoA L : p-coumaroyl CoA Ligase ; Phe ala. : Phénylalanine ; sin : sinapique.

De plus, d'après STAFFORD (1981) les chloroplastes semblent jouer un rôle prépondérant dans la biosynthèse des composés phénoliques. La localisation de la voie de biosynthèse des composés phénoliques dans les chloroplastes est une hypothèse séduisante, cependant une certaine prudence s'impose, les techniques employées se révélant parfois génératrices d'artéfact.

Au vue de ces différents résultats, l'obtention de suspensions cellulaires possédant des chloroplastes efficaces semble fortement favorable à la production de métabolites cellulaires tels que les flavonoïdes.

Cependant, il faut noter que le passage de l'hétérotrophie à l'autotrophie n'est pas toujours suffisant pour induire le métabolisme secondaire caractéristique des feuilles. Ce fait est très bien illustré par les recherches effectuées par TYLER *et al.* (1986) sur des cultures cellulaires de *Catharanthus roseus*, où aucune accumulation de vindoline ou d'alcaloïdes dimériques n'a été observée dans des cultures autotrophes, contrairement à ce qui était attendu.

Dans de tels cas, une autre différenciation, en plus de la présence de chloroplastes actifs devrait permettre aux cellules de retrouver leur potentialité à synthétiser certains métabolites secondaires.

De plus, les cultures photoautotrophes sont généralement moins productrices que les cultures photomixotrophes ou hétérotrophes (BARZ et HUSEMANN, 1982 ; HAGIMORI *et al.*, 1984 a, b).

Enfin, il faut considérer que la photosynthèse se traduit, non seulement par la synthèse de molécules carbonées, mais aussi par la production d'énergie, sous forme d'ATP et de composés à haut pouvoir réducteur.

Ces produits jouent un rôle important, en tant que cofacteur de certaines étapes enzymatiques du métabolisme secondaire (DALTON et PEEL, 1983).

Le rétablissement de la photosynthèse *in vitro*, activité essentielle de la cellule chlorophyllienne *in vivo*, pourrait peut-être se traduire alors par une stimulation des capacités biosynthétiques des cultures, tant quantitativement que qualitativement.

C) OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES *IN VITRO*

Dans les conditions de culture *in vitro*, les substances recherchées sont le plus souvent présentes en quantité très faible par rapport à la plante mère.

Aussi, de nombreux essais d'optimisation de la production ont été effectués, parmi lesquels l'apport d'éliciteurs ou de précurseurs des molécules recherchées.

1) L'apport d'éliciteurs

a) Définition du terme éliciteur

D'après la littérature traitant des interactions Hôte / Pathogène, il apparaît qu'un grand nombre de métabolites secondaires appartiennent au groupe des phytoalexines, c'est-à-dire des substances synthétisées par les plantes en réaction à un stress d'origine chimique, physique, ou correspondant à une attaque par un agent pathogène (PAXTON, 1981).

Le terme d'éliciteur au sens large, est donné aux molécules ou aux agents qui induisent la synthèse de phytoalexines dans les plantes :

* éliciteurs biotiques : infection par microorganismes ;

* éliciteurs abiotiques : irradiation, U.V., ions métalliques, substances chimiques.

Lors du "Sixth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Minneapolis, 1986", une utilisation plus précise et restrictive du terme éliciteur a été donnée ; seules les substances d'origine biologique sont désignées sous le nom d'éliciteur, les autres traitements seront alors nommés stress abiotique (EILERT, 1987).

b) Réponses obtenues lors d'élicitation

La présence d'éliciteur de *Pythium aphanidermatum*, dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*, provoque l'induction de certaines enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques (Tryptophane décarboxylase et Strictosidine synthase) (EILERT *et al.*, 1986b).

Il est reconnu maintenant, qu'en présence d'un éliciteur, l'accumulation de métabolites est précédée par une activation des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de ces produits. Ainsi, dans le cas des légumineuses, l'activité de la PAL (et d'autres enzymes telles que la chalcone synthase) impliquées dans la synthèse des phytoalexines isoflavonoïdes, est induite par des glycoprotéines présentes dans les parois

cellulaires et les filtrats de culture de champignon (ALBERSHEIM et VALENT, 1978 ; HAHLBROCK *et al.*, 1981).

Il faut remarquer qu'un même éliciteur peut stimuler le métabolisme secondaire de cultures cellulaires provenant d'espèces végétales très différentes. Ainsi, la présence d'éliciteur de *Botrytis* peut induire l'accumulation de phaséolline chez *Phaseolus vulgaris*, la formation de rutacridone dans des cultures de *Ruta graveolens* et la production de sanguinarine par des cultures de *Papaver somniferum* (Tableau III).

Différents paramètres tels que la concentration en éliciteur, la durée de contact avec l'éliciteur, mais encore la lignée cellulaire considérée et le stade de la culture où est effectué l'élicitation, jouent un rôle prépondérant sur l'intensité et la nature de la réponse obtenue. Ainsi, un temps de contact avec l'éliciteur de moins de 48 heures est généralement suffisant pour induire chez *Papaver* une accumulation de métabolites sans aucune lésion au niveau cellulaire. Par contre, au delà d'une certaine durée, l'éliciteur peut devenir létal pour les cultures cellulaires (EILERT *et al.*, 1985 ; EILERT et CONSTABEL, 1985).

La présence des produits de l'élicitation dans le milieu de culture a été souvent observée. Ainsi, dans les cultures cellulaires de *Catharanthus roseus* (EILERT *et al.*, 1986 a), et de *Papaver somniferum* (EILERT *et al.*, 1985), environ 10 à 20 % des métabolites synthétisés sont retrouvés dans le milieu. Il peut s'agir, soit d'une excrétion, soit d'un relargage dû à un éclatement des cellules. Cependant, il a été démontré par EILERT et CONSTABEL (1985) que des cellules de *Papaver somniferum*, mises en présence d'homogénat de *Botrytis*, ne présentaient pas d'anomalies structurales (aucune rupture au niveau du tonoplaste et du plasmalemme).

Par contre, des modifications de perméabilité membranaire dues à l'action d'éliciteurs fongiques ont été décrites récemment (YOUNG *et al.*, 1982 ; DARVILL et ALBERSHEIM, 1984).

Cette excrétion, ou cette diffusion, des métabolites après élicitation est d'un grand intérêt, puisqu'il s'avère alors possible d'extraire les métabolites directement du milieu de culture et de recycler ensuite les cellules.

Une autre phase d'élicitation est alors, à nouveau, envisageable. Cela a été réalisé avec des suspensions cellulaires de soja. 24 heures après le premier traitement, une nouvelle induction de la PAL a été observée, ainsi qu'une accumulation de glycéolline

TABLEAU IIIELICITEURS STIMULANT L'ACCUMULATION DE METABOLITES
SECONDAIRES DANS DES CULTURES CELLULAIRES *IN VITRO*(d'après EILERT *et al.*, 1985 ; EILERT , 1987)

ELICITEUR	ESPECE	PRODUIT	REFERENCE
Eliciteurs abiotiques			
Na ₃ VO ₄	<i>Vigna angularis</i>	Isoflavonoïdes	HATTORI et OHTA (1985)
VO SO ₄	<i>Catharanthus roseus</i>	Catharanthine Ajmalicine	SMITH <i>et al.</i> (1987)
Eliciteurs biotiques			
Actinomycine	<i>Papaver somiferum</i>	Codéine	HSU (1981)
Chitosan	<i>Glycine max</i>	Isoflavonoïdes	EBEL <i>et al.</i> (1976)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Isoflavonoïdes	KOHLÉ <i>et al.</i> (1984)
	<i>Ruta graveolens</i>	Acridone-epoxides	EILERT <i>et al.</i> (1984)
Nigeran	<i>Glycine max</i>	Isoflavonoïdes	EBEL <i>et al.</i> (1976)
	<i>Solanum melongena</i>	Polyacétylènes	OHTA <i>et al.</i> (1987)*
	<i>Vigna angularis</i>	Isoflavonoïdes	HATTORI et OHTA (1985)
	<i>Solanum melongena</i>	Diacétylènes	IMOTO et OHTA (1988)
Poly-L-lysine	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phaséolline	DIXON et BENDALL (1978)
Levure	<i>Glycine max</i>	Glycéolline	FUNK <i>et al.</i> (1987)
	<i>Thalictrum rugosum</i>	Berberine	
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Anthraquinones	WIJNSMA <i>et al.</i> (1987)*
	<i>Rubia tinctoria</i>	Anthraquinones	
	<i>Morinda citrifolia</i>	Anthraquinones	VAN DER HEIJDEN <i>et al.</i> (1988)
	<i>Tabernaemontana sp.</i>	Triterpenes	
<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Papaver somniferum</i>	Codéine	HEINSTEIN (1985)
	<i>Papaver somniferum</i>	Morphine	HEINSTEIN (1985)

(FUNK *et al.*, 1987).

En conclusion, l'emploi d'éliciteurs (de diverses origines) offre une nouvelle approche, pour une obtention rapide de métabolites secondaires.

Les produits accumulés dans les cultures cellulaires en réponse à une élicitation sont donnés dans le tableau IV. La grande diversité de ces composés montre les potentialités intéressantes de cette technique d'induction du métabolisme secondaire.

Son application commerciale possible dans l'induction de métabolites secondaires d'importance économique a été sérieusement discutée par DICOSMO et TALLEVI, 1985.

L'élicitation peut améliorer l'efficacité de l'accumulation de métabolites dans des cultures cellulaires de plusieurs manières :

- * Le temps d'obtention du produit peut être réduit ;
- * Un transfert de milieu (milieu de production) n'est plus nécessaire ;
- * Les métabolites peuvent être accumulés pas seulement dans les cellules ; des teneurs importantes peuvent être excrétées dans le milieu de culture ;
- * La "réélicitation" permet une production semi-continue.

Il est également possible, après étude *in vitro*, d'utiliser l'élicitation pour la stimulation du métabolisme secondaire sur des cultures végétales en plein champ.

2) Incorporation de précurseurs

Un autre facteur essentiel pouvant stimuler la production de métabolites secondaire, est l'ajout de précurseurs biosynthétiques (ZENK *et al.*, 1977).

* En ce qui concerne la production d'alcaloïdes indoliques, des résultats contradictoires ont été obtenus lors de l'incorporation de tryptophane ou de tryptamine, suivant les lignées cellulaires considérées. Ces deux composés sont des intermédiaires obligatoires dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes.

Si certaines lignées répondent de façon positive à cette incorporation (ZENK *et al.*, 1977), chez d'autres on observe une diminution de la formation d'alcaloïdes, lors de l'ajout de l'un ou des deux précurseurs (DOLLER *et al.*, 1976 ; KNOBLOCH et BERLIN, 1980).

La L-phénylalanine ou la L-tyrosine incorporée à des cultures cellulaires de *Coleus blumei* est transformée en acide rosmarinique (RAZZAQUE et ELLIS, 1977 ; ZENK *et al.*, 1977). L'addition de phénylalanine augmente également l'accumulation d'esters

TABLEAU III (SUITE)

ELICITEUR	ESPECE	PRODUIT	REFERENCE
<i>Alternaria carthami</i>	<i>Petroselinum hortense</i>	Bergaptène	TIETJEN <i>et al.</i> (1983)
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phaseollus vulgaris</i>	Phaséolline	DIXON et LAMB (1979)
<i>Botrytis allii</i>	<i>Ruta graveolens</i>	Rutacridone epoxide	WOLTERS et EILERT (1982)
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Papaver somniferum</i>	Sanguinarine	EILERT <i>et al.</i> (1987)*
<i>Gliocladium deliquescens</i>	<i>Capsicum annum</i>	Capsidioï	BROOKS <i>et al.</i> (1986)
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Phaseollus vulgaris</i>	Isoflavonoïdes	LAWTON <i>et al.</i> (1980)
<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Bidens pilosa</i>	Polyacétylènes	DICOSMO <i>et al.</i> (1982)
	<i>Catharanthus roseus</i>	Tryptamine Ajmalicine Catharantine	TALLEVI <i>et al.</i> (1987)*
	<i>Catharanthus roseus</i>	Strictosidine Ajmalicine Tabersonine Lochnéicine Catharantine	EILERT <i>et al.</i> (1987)*
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Diosgénine	ROKEM <i>et al.</i> (1984)

* Résumés . VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. D.A.Somer, B.G. Gengenbach, D.D. Biesboer, W.P. Hackett et C.E. Green , eds., University of Minneapolis Press, Minneapolis, MN (1987).

hydroxycinnamoyl dans des cultures cellulaires de pomme (KOUMBA et MACHEIX, 1982), de polyphénols dans des cultures de tabac (SAHAI et SHULER, 1984) et de naphtoquinones chez *Lithospermum* (MIZUKAMI *et al.*, 1977).

Dans des cultures de *Datura* ou de *Scopolia* TABATA *et al.*, (1971b) ont montré que la production d'alcaloïdes tropaniques pouvait être largement augmentée par l'apport d'acide tropanique, le précurseur direct dans la voie de biosynthèse de ces métabolites.

Des essais d'amélioration de la production de sapogénines stéroïdiques par des cultures de tissus de Fenugrec ont été également réalisés (TRISONTHI *et al.*, 1980). Des incorporations de certains précurseurs biosynthétiques des sapogénines, proches comme le cholestérol ou plus en amont comme l'acide mévalonique, ont été étudiées. L'acide mévalonique s'est révélé le plus favorable à la production de sapogénines.

Cependant, l'incorporation de précurseurs directs n'entraîne pas nécessairement, une augmentation du produit final.

Ainsi, l'apport de phénylalanine, à des cultures cellulaires de *Lithospermum* augmente plus de trois fois la production de shikonine, alors que l'incorporation de précurseurs plus directs, tel que l'acide p-hydroxybenzoïque, n'a aucun effet sur la production (TABATA *et al.*, 1976).

WILSON et BALAGUE (1985) ont montré pour leur part que l'apport d'acide orthosuccinylbenzoïque (précurseur de la biosynthèse d'antraquinones), dans des suspensions cellulaires de *Galium*, augmente considérablement la synthèse d'antraquinone dans des conditions limitantes en phosphate, mais pas dans des conditions de culture limitantes en saccharose.

Une meilleure connaissance de la période optimale d'apport de précurseur, mais également, de leur compartimentation en relation avec les enzymes impliquées dans leur utilisation, devrait permettre une meilleure utilisation de ces composés par les cellules végétales et ainsi une meilleure expression de la production de métabolites secondaires (IBRAHIM, 1987).

3) Culture à grande échelle

Dans le but de réaliser une application industrielle de production de métabolites secondaires par voie biotechnologique, certaines conditions sont requises.

* Le taux de croissance et de production doit être suffisamment élevé pour

TABLEAU IV**PRODUITS COMMERCIALISES
OU EN COURS DE DEVELOPPEMENT**

(D'après STECK et PETIARD, 1985)

PRODUIT	ESPECE	USAGE	PRIX (sous reserve)	FIRME	PAYS
Shikonine	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Pharmacie Cosmétique Teinturerie	4000 \$/Kg	mitsui Petrochemicals	Japon
Berberine	<i>Coptis japonica Thalictrum minus</i>	Pharmacie		mitsui Petrochemicals	Japon
Biomasse	<i>Panax ginseng</i>	Diététique	30 \$/Kg	NITTO DENKI KOGYO	Japon
Peroxydase	<i>Raphanus</i>	Diagnostic	2000 \$/Kg	TOYOBO	Japon
Geraniol	<i>Geranium</i>	Parfumerie		KANEBO	Japon
Acide rosmarinique	<i>Coleus blumei</i>	Pharmacie		NATTERMAN	RFA
Digoxine	<i>Digitalis lanata</i>	Pharmacie	3000 \$/Kg	BOEHRINGER	RFA

l'obtention d'un bon pourcentage de produit fini en un minimum de temps.

Or, les cellules végétales se multiplient beaucoup plus lentement que les bactéries (environ 100 fois moins vite).

A la suite d'essais d'amélioration de ce taux de croissance, NOGUSHI *et al.* (1977), ont obtenu un temps de doublement de 15 heures, pour une suspension cellulaire de *Nicotiana tabacum*, à l'échelle de 20 m³. Le rendement en matière sèche peut atteindre 5 à 10 g.l⁻¹.jour⁻¹.

* Les cultures cellulaires doivent être génétiquement stables pour assurer un taux constant de production.

* Les métabolites devront être accumulés dans les cellules, sans être catabolisés rapidement, ou mieux encore, excrétés dans le milieu de culture.

Il est important de rechercher, à ce sujet, les facteurs favorisant la diffusion des produits, et/ou leur excrétion, dans le milieu de culture.

Il peut s'établir un gradient de concentration du métabolite, comme le propose le modèle de RENAUDIN (RENAUDIN et GUERN, 1982), basé sur l'étude de distributions d'alcaloïdes exogènes marqués (valable seulement pour des molécules chargées).

Cette répartition des alcaloïdes entre cellules et milieu semble dépendre de la forme ionique de l'alcaloïde considéré et du gradient de pH existant entre le milieu intérieur et le milieu extérieur (NEF *et al.*, 1986).

* Au vu du coût de la mise en oeuvre d'une telle technologie, seule la production de substances à haute valeur ajoutée, peut relever de la culture en bioréacteur.

STECK et PETIARD (1985) ont rassemblé, les informations accessibles sur l'exploitation industrielle des cultures cellulaires végétales (tableau IV) ; ce tableau date hélas de 1985. Quatre ans après la publication de ce tableau, quelles ont été les innovations en ce domaine ? Les cultures industrielles citées ou en voie de développement ont-elles été maintenues ?

Très peu de renseignements sont actuellement disponibles et accessibles à ce propos.

Il semblerait tout de même que l'équipe japonaise (Mitsui, Petrochemicals) travaillant sur la shikonine et ses dérivés, utilisés notamment en pharmacie comme cosmétique mais également comme colorant, ait maintenu ces activités.

En ce qui concerne les autres équipes de recherche de part le monde, trop peu de publications font mention de l'état d'avancement de leurs recherches quant à la production industrielle de métabolites secondaires par voie biotechnologique.

Le problème auquel se heurte actuellement la production industrielle de métabolites *in vitro* n'est plus de démontrer la faisabilité d'un tel système, cela a déjà été réalisé, mais bien souvent de prouver la rentabilité et la compétitivité d'un tel système face à des procédés de production déjà en fonctionnement (extraction classique, synthèse ou hémisynthèse), avec les investissements lourds déjà consentis.

Dans le secteur pharmaceutique, il faut aussi remarquer que le coût de la substance active ne représente qu'une faible part du coût de la mise au point d'un médicament. Il n'existe actuellement que trois ou quatre produits d'origine naturelle (vinblastine, ...) dont le prix et le volume de marché justifieraient d'envisager une production par culture de cellules végétales. Et, de plus, ces composés ne sont pas à l'abri de la découverte d'une autre molécule plus efficace ou moins toxique, qui fasse s'effondrer ce marché potentiel comme ce fut récemment le cas pour la digoxine de *Digitalis lanata*.

Les contraintes sont probablement moins fortes dans les secteurs des arômes, additifs alimentaires, parfums, cosmétiques ou dans l'agro-chimie. Bien que souvent de moindre coût que les principes actifs entrant dans la composition d'un médicament, ces produits représentent des marchés généralement beaucoup plus importants que ceux de la pharmacie.

La maîtrise des techniques de culture de cellules végétales peut trouver une autre voie de valorisation : la découverte de molécules actives originales apparaissant *in vitro* par dérégulation métabolique (cf. page 19), surtout si les tests biologiques systématiques ("screening") peuvent être guidés par des données ethnopharmacologiques, sur la base des recensements effectués auprès des tradipraticiens du monde entier, dépositaires d'un savoir millénaire.

L'amortissement d'une telle recherche sera beaucoup plus lié à l'ouverture de nouveaux marchés qu'au bénéfice résultant d'une éventuelle production par culture de cellules à grande échelle (STECK, communication personnelle).

D) LA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE : SON ROLE DANS LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES

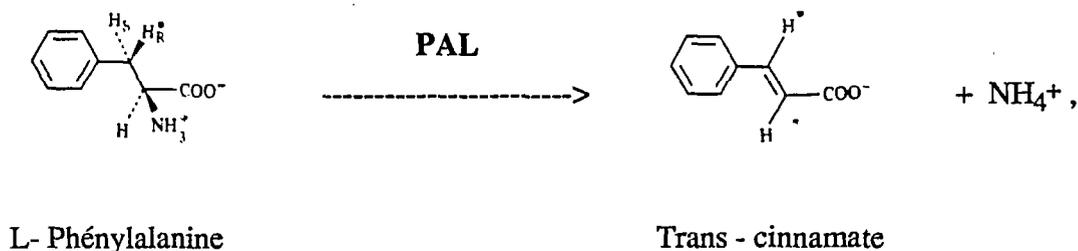
Découverte en 1961 par KOUKOL et CONN, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5.) est l'une des enzymes les plus étudiées en relation avec la production de métabolites secondaires.

Cet intérêt s'explique par sa large répartition dans les végétaux supérieurs et son rôle essentiel dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

En effet, la PAL, qui catalyse la réaction de désamination de la phénylalanine en acide cinnamique, réalise une jonction entre le métabolisme primaire (protéosynthèse) et le métabolisme secondaire (biosynthèse des phénylpropanoïdes) (figure 4).

1) Caractéristiques générales de la PAL

La PAL catalyse la réaction suivante :



première étape de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Elle est inhibée par le produit de sa réaction, le trans-cinnamate (KOUKOL et CONN, 1961).

La PAL est une enzyme homotétramérique. Les poids moléculaires estimés situent la taille normale d'une sous-unité à 83,000 (HANSON et HAVIR, 1981).

Elle possède deux sites actifs, chacun contenant un résidu déhydroalanine, par tétramère (HAVIR et HANSON, 1973).

Elle présente une coopérativité négative vis-à-vis de la L-phénylalanine, d'où l'existence de deux constantes de Michaelis. Chez le persil, par exemple, ces deux constantes sont : $Km^L = 0,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ et $Km^H = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ (ZIMMERMANN et HAHLBROCK, 1975).

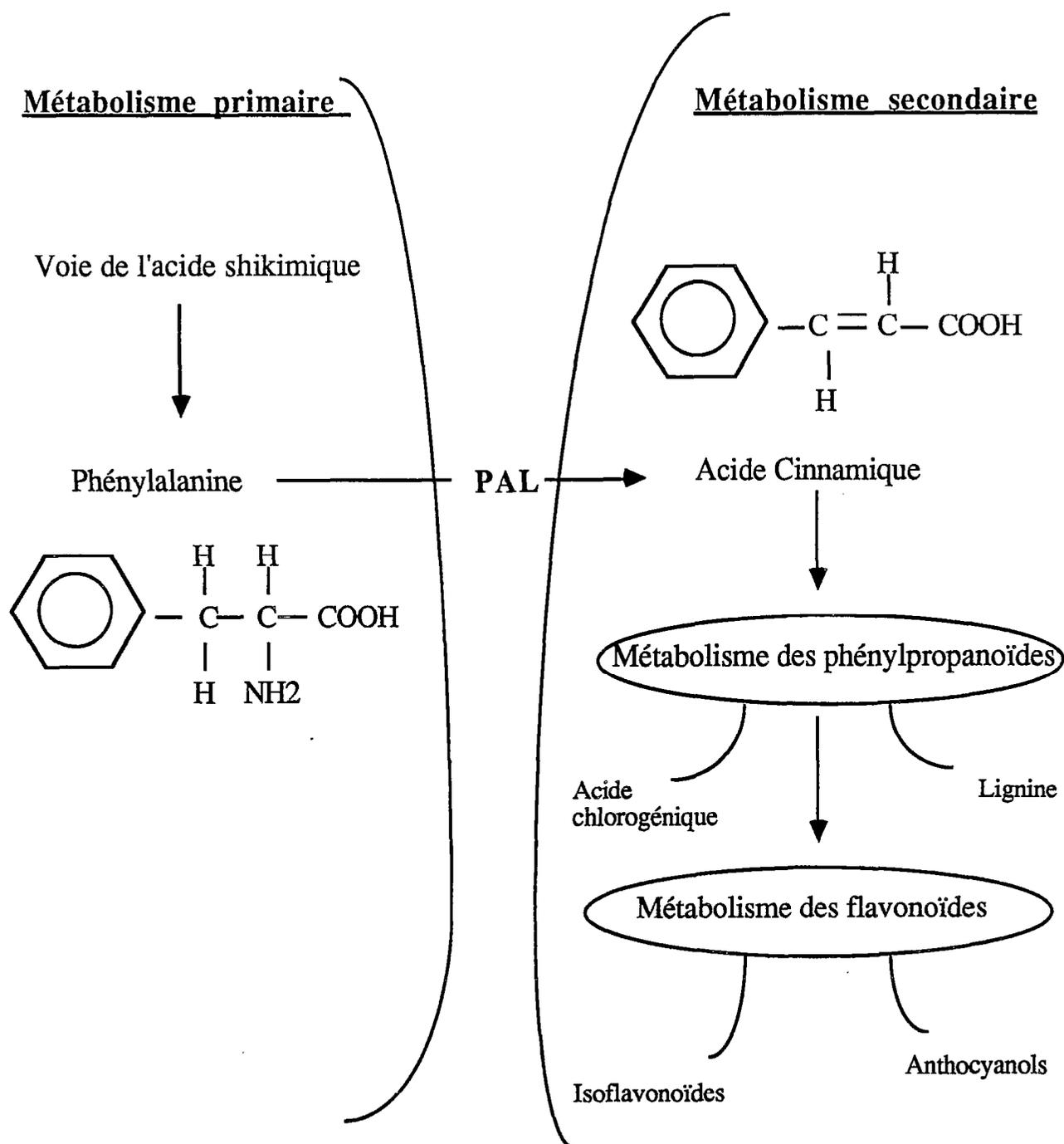


Figure 4 : Position clé de la Phénylalanine entre le métabolisme primaire et secondaire (d'après CREASY, 1987).

D'après les données bibliographiques disponibles, la PAL est une enzyme difficile à purifier. L'extrait cellulaire initial peut subir cinq étapes successives (DIXON et BOLWELL, 1986) :

- * précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium,
- * chromatographie sur colonne échangeuse d'ions,
- * filtration sur gel (tamis moléculaire),
- * parfois chromatographie sur hydroxylapatite (ZIMMERMANN et HAHLBROCK, 1975),
- * et la dernière étape : électrophorèse sur gel polyacrylamide (PAGE).

2) Rôle métabolique et localisation de la PAL

a) Rôle métabolique

La réaction de désamination, catalysée par la PAL, est à la base de nombreuses voies de biosynthèse possibles (figure 1).

L'orientation de la synthèse vers un produit particulier est dépendante du type, du stade de développement du tissu, et également de stimulations extérieures (HAHLBROCK et GRISEBACH, 1979).

b) Localisation subcellulaire

La compartimentation des enzymes considérées à un niveau cellulaire et subcellulaire est un facteur déterminant dans le choix de la voie de biosynthèse qui va prédominer.

Divers sites de désamination de la phénylalanine ont été mis en évidence dans la cellule végétale (Tableau V), (HANSON et HAVIR, 1981).

On peut noter, qu'en dehors de la fraction soluble qui renferme une part importante de l'activité PAL chez tous les végétaux examinés, l'enzyme est également retrouvée dans divers organites ou fractions cellulaires : chloroplastes, mitochondries et microsomes.

Selon SAUNDERS et MAC CLURE (1975) et LOFFELHARDT *et al.* (1973) les chloroplastes de nombreuses Angiospermes possèdent une activité PAL fermement liée aux thylakoïdes. Vérifié chez le Pétunia (ALIBERT *et al.*, 1977), ce résultat ne semble toutefois pas être confirmé pour de jeunes plants de céréales (ZAPROMETOV et SHIPILOVA, 1972).

Les résultats qui viennent d'être évoqués montrent une localisation intracellulaire

TABLEAU VLOCALISATION INTRACELLULAIRE DE LA PHENYLALANINE
AMMONIA-LYASE CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURS

(D'après HANSON et HAVIR, 1981)

LOCALISATION	ESPECES VEGETALES	REFERENCES
PLASTES	<i>Hordeum vulgare</i> (C, E)	SAUNDERS et MC CLURE (1975)
	<i>Ricinis communis</i> (C, T)	RUIS et KINDL (1971)
	<i>Zea mays</i> (C, TK)	LOFFELHARDT <i>et al.</i> (1973)
	<i>Avena sativa</i> (C, E)	WEISSENBOCK <i>et al.</i> , (1976)
	<i>Petunia hybrida</i> (C)	ALIBERT <i>et al.</i> , (1977)
	<i>Spinacea oleracea</i> (C)	NISHIZAWA <i>et al.</i> , (1979)
	<i>Helianthus annuus</i> (C, TK)	LOFFELHARDT <i>et al.</i> (1973)
MITOCHONDRIES	<i>Quercus pedunculata</i>	ALIBERT <i>et al.</i> , (1972)
	<i>Ricinus communis</i>	GREGOR (1976)
PEROXYSSÔMES	<i>Spinacea oleracea</i>	RUIS et KINDL (1971)
	<i>Helianthus annuus</i>	RUIS et KINDL (1971)
MICROSOMES	<i>Fagopyrum esculentum</i>	AMRHEIN et ZENK (1971)
	<i>Cucumis sativus</i>	CZICHI et KINDL (1977)
	<i>Solanum tuberosum</i>	CAMM et TOWERS (1973b) et CZICHI et KINDL (1975)
	<i>Quercus pedunculata</i>	ALIBERT <i>et al.</i> , (1972)

C : Chloroplastes ; E : Etioplastes ; TK : membranes thylakoidales

expérimentaux lors de l'extraction. Le développement de techniques associant l'immunofluorescence et la cytolocalisation (microscopie électronique) devrait apporter beaucoup dans ce domaine.

3) Régulation de l'activité PAL

a) Autorégulation

Dès la mise en évidence de la PAL, KOUKOL et CONN (1961), ont démontré la sensibilité de cette enzyme à l'action inhibitrice du produit de la réaction, l'acide cinnamique, mais aussi de l'acide p-coumarique. Par la suite, un grand nombre de travaux ont généralisé ces premières observations (CAMM et TOWERS, 1973a ; SHIELDS *et al.*, 1982).

De plus, selon LAMB et RUBERY (1976) les variations du taux de phénylpropanoïdes auraient plus d'influence sur l'activité de l'enzyme que celles du substrat en raison de l'existence de phénomènes de coopérativité négative entre les sites de fixation de la phénylalanine sur les sous-unités de la PAL (DURST, 1974 ; NARI *et al.*, 1974).

L'enzyme peut, par ailleurs, exister chez différents végétaux sous deux formes isofonctionnelles soumises à rétroinhibition spécifique (RANJEVA *et al.*, 1977).

b) Influence des facteurs de l'environnement

La PAL est également extrêmement sensible à l'état physiologique de la plante. Une modification de l'activité peut être observée : durant la croissance, après des stress d'origine pathogène ou physique, ou sous l'effet de la lumière et de substances de croissance, etc...

— Lumière

De tous les stimuli examinés, la lumière est celui qui a été le plus étudié, en relation avec les mécanismes d'induction de la PAL, sous l'effet de différentes qualités de lumière ; blanche, rouge clair / rouge sombre, bleue / U.V. (CAMM et TOWERS, 1977 ; SCHOPFER, 1977).

ZUCKER (1965) a été le premier à montrer l'existence d'une induction transitoire de la PAL par la lumière blanche, sur des tubercules de pomme de terre ; le principal métabolite formé étant alors l'acide chlorogénique.

SCHOPFER et MOHR (1972) et WELLMANN (1974, 1975) ont montré,

respectivement sur des plantules de moutarde et des cultures cellulaires de persil, que l'effet du rouge clair et du rouge sombre sur la synthèse de phénylalanine ammonia-lyase était sous la dépendance du phytochrome Pfr (induction de la PAL par le rouge clair et suppression de la réponse par le rouge sombre).

Dans les suspensions cellulaires de *Petroselinum hortense*, la lumière U.V. entraîne une augmentation de l'activité PAL, après un temps de latence de 2 à 3 heures, et la stimulation de la synthèse de flavonoïdes (HAHLBROCK *et al.*, 1976 ; SCHRODER, 1977).

Il a été montré que cette induction transitoire de la PAL, était concomitante à une augmentation du pool d'ARNm codant pour cette enzyme, et que l'enzyme était soumise à un taux constant de dégradation (BETZ *et al.*, 1978 ; SCHRODER *et al.*, 1977 ; SCHRODER *et al.*, 1979).

Cela implique que la transcription (ou encore une étape post-transcriptionnelle) est sous l'influence d'un récepteur UV.

Si la lumière stimule la synthèse de la PAL, l'obscurité elle, n'inhibe généralement que partiellement son activité (THORPE *et al.*, 1971) sauf dans quelques cas comme l'orge (PODSTOLSKI et FRELICH, 1978).

— Effets des stress : excision, blessure, infection.

L'excision ou d'autres blessures induit l'augmentation de l'activité PAL dans de nombreux tissus végétaux. Dans les tubercules de pomme de terre, des composés tels que l'acide chlorogénique sont synthétisés (LAMB et RUBERY, 1976).

La PAL est également induite sous l'effet d'attaque par des pathogènes.

Ainsi, les virus, tels que le virus de la mosaïque du tabac, entraînent une synthèse *de novo* de la PAL (DUCHESNE *et al.*, 1977).

L'induction de la PAL à la suite d'infection pathogène ou encore en présence d'éliciteurs a été longuement étudiée (HAHLBROCK et GRISEBACH, 1979).

Les réponses de l'hôte dans ces cas là impliquent la synthèse de composés tel que la lignine, ou des phytoalexines chez les légumineuses, qui sont des dérivés d'isoflavonoïdes (LAMB *et al.*, 1980).

Dans des suspensions cellulaires de *Petroselinum hortense* mises en présence d'éliciteurs de *Phytophthora megasperma* var *sojae* (Pms), on observe une augmentation

rapide, et importante, des activités PAL et 4-Coumarate CoA ligase.

Ces variations au niveau de l'activité PAL sont causées par des modifications concomitantes du taux d'ARNm codant pour cette enzyme (HAHLBROCK *et al.*, 1981).

La régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, dans des suspensions cellulaires de *Phaseolus vulgaris* synthétisant de la phaséoline, a été bien étudiée, notamment en rapport avec sa réponse à l'élicitation (DIXON et BOLWELL, 1986).

Ainsi, le turn-over de la PAL varie dans ces cultures de cellules, en réponse à des éliciteurs biotiques ou abiotiques (LAMB *et al.*, 1980).

Il a été montré clairement, par différentes techniques de marquage radioactif, d'immunoprécipitation et d'hybridation ADN/ARN, sur ces suspensions cellulaires de haricot, que l'élicitation induisait une synthèse *de novo* de la PAL, sous la dépendance d'une augmentation de la transcription génétique (DIXON et BOLWELL, 1986).

Il a été également démontré dans des suspensions cellulaires de *Vigna angularis*, qu'une augmentation de l'activité PAL, accompagnée par une accumulation de glucosides isoflavones, était induite par différents éliciteurs : Pms (*Phytophthora megasperma* var *sojae*), Nigeran (polysaccharides des parois cellulaires d'*Aspergillus niger*), RNase A autoclavé (HATTORI et OHTA, 1985).

L'augmentation de l'activité PAL est généralement rapide, mais transitoire, et actuellement il semble que la synthèse *de novo* de la PAL soit une règle générale en réponse aux attaques de champignons ou en présence d'éliciteurs.

— Dilution des suspensions cellulaires

Une augmentation de l'activité PAL est observée lorsque des suspensions cellulaires de persil, en phase linéaire de croissance, sont transférées dans un milieu neuf (HAHLBROCK et WELLMAN, 1973), ou dans de l'eau (HAHLBROCK et SCHRODER, 1975). Il existe un temps de latence, de 2 à 3 heures, avant le pic d'activité (12 - 15 heures après la dilution de la culture) et ensuite, on note une chute importante de cette activité.

Deux autres enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont également induites : la cinnamate 4-hydroxylase et la Coa-ligase.

Cette augmentation d'activité PAL dans les cultures cellulaires diluées de persil est également corrélée à une synthèse d'ARNm codant pour cette enzyme. (SCHRODER *et*

al., 1977).

— Substances de croissance

Très peu d'études ont été réalisées sur l'action des hormones de croissance sur l'activité PAL *in vitro*.

Une diminution de l'apport exogène d'auxines et une augmentation de l'apport de cytokinines dans des cultures cellulaires entraînent une amplification de l'activité PAL en moins de quelques jours (JONES, 1984).

Ainsi, DIXON et FULLER (1976) ont observé une augmentation de l'activité spécifique de la PAL, lors de la diminution de la concentration en auxine, dans des suspensions cellulaires de haricot : le 2,4 D à la concentration de 2×10^{-5} M étant inhibiteur à la fois de la croissance cellulaire, de la production de phaséoline et de l'activité PAL.

Dans le cas de la kinétine, (teneur variant de $0,46$ à $2,32 \times 10^{-6}$ M) une augmentation de l'activité est observée 24 heures après (JONES, 1984). L'effet inhibiteur de l'ANA sur l'induction de l'activité PAL (concentration de $1,1 \times 10^{-5}$ M) est supprimé par une concentration plus importante de kinétine.

L'acide abscissique et les gibberellines peuvent également influencer l'activité de la PAL. HADDON et NORTHCOTE (1975) ont montré que l'augmentation de l'activité PAL, obtenue dans les cals de haricot lors de la diminution du rapport Auxine/Cytokinine, pouvait être inhibée par l'incorporation d'acide abscissique et, différée par l'addition d'acide gibberellique. FRY (1979) a trouvé, pour sa part, que l'acide gibberellique (GA_3) réprimait l'activité PAL dans des suspensions cellulaires de *Spinacia*.

L'ABA augmente l'activité PAL chez *Phaseolus vulgaris* (WALTON et SONDEHEIMER, 1968) et chez d'autres espèces, toutefois il peut être également inhibiteur (JONES, 1984 ; JANAS, 1984) ; cela dépend des conditions environnementales aussi bien que de l'état physiologique de la plante.

En conclusion, la phénylalanine ammonia-lyase, enzyme clé de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, possède un système de régulation très complexe, sous la dépendance de nombreux facteurs de l'environnement tels que : la lumière, des stress de différentes origines, des substances de croissance, etc...

Nous nous proposons au cours de cette étude de suivre l'évolution de l'activité spécifique de cette enzyme, durant la culture de suspensions cellulaires hétérotrophes et

photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*, en relation avec l'accumulation de roténoïdes.

L'étude des modifications de l'activité PAL, sous l'effet de certains stress et de l'incorporation de précurseurs, sera également abordée.

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

A) LE MATERIEL VEGETAL

1) Description botanique

Tephrosia vogelii, est une angiosperme, dicotylédone, dialypétale caliciflore.

La classification d'HUTCHINSON (1964) a été adoptée :

- Ordre : Légumineales
- Famille : *Fabaceae* (*Papilionaceae*)
- Tribu : *Tephrosieae*
- Genre : *Tephrosia* (+ de 400 espèces des régions tropicales et subtropicales du monde)
- Espèce : *Tephrosia vogelii* Hook f.

a) Noms vernaculaires

KERHARO et BOUQUET (1950) ont rapportés dans un mémoire détaillé les nombreux noms vernaculaires de *Tephrosia vogelii* : Téphrosie vénéneuse, Diefa, diaba (Bambara), Diabi (Dioula), Kioubi (Adioukrou), Méné (Attié, Ebrié), Go, doua (Dan), Dréyé léréyé (Guéré), Gbessé (Baoulé).

b) Description (figure 5)

Tephrosia vogelii est un arbrisseau ramifié dès sa base, vivace, de 2 m (première année à partir de la graine) à 3 m (2ème et 3ème année après recépage), pubescent. Les feuilles alternes, stipulées, de 20 à 25 cm de long environ, sont imparipennées comprenant une dizaine de paires de folioles allongées de 8-10 cm sur 1,8-2 cm, très tomenteuses à la face inférieure.

Les fleurs, blanches, quelquefois pourpres ou violettes, sont groupées en grappes terminales denses. Les gousses, aplaties, tomenteuses, de 10-12 cm sur 1,2 cm, renferment des graines elliptiques (6 mm sur 3 mm), noires avec une caroncule blanche (BOTTON, 1957).



Figure 5 : *Tephrosia vogelii* Hook f.

a : Rameaux fleuris avec fruits verts à la partie inférieure de l'inflorescence ; **b :** Fleur vue sur la face externe ; **c :** Fragment d'inflorescence montrant le bouton, la bractée et les bractéoles ; **d :** Jeune inflorescence ; **e :** Demi-gousse montrant les graines mûres ; **f :** Stipules ; **g :** gynécée. (d'après BOTTON, 1957)

c) Distribution

Tephrosia vogelii serait originaire de l'Angola d'où il a été largement disséminé par la culture. On le retrouve aujourd'hui dans tout l'Ouest africain depuis le Soudan, où il est rare, jusqu'au Congo.

Il affectionne surtout la forêt équatoriale qui représente assez bien ses limites (KERHARO et BOUQUET, 1950).

2) **Données ethnobotaniques - Utilisations traditionnelles**

Tephrosia vogelii est cultivé en Afrique de l'Ouest (culture en voie de régression actuellement, en Côte d'Ivoire) pour ses propriétés ichtyotoxiques et parasitocides.

Pour la pêche, on prépare une pâte obtenue en mélangeant des feuilles écrasées avec de l'argile. On emploie quelquefois les gousses, seules ou mélangées aux feuilles. On dit "que préparation du toxique et pêche doivent s'accompagner d'invocations, pour que le produit soit efficace et la pêche fructueuse" (KERHARO et BOUQUET, 1950).

La décoction de feuilles est employée par les Apindji (WALKER et SILLANS, 1961), pour tuer les poux, tandis que celle des gousses vertes, des écorces et des feuilles aurait des propriétés abortives.

Tephrosia vogelii est également utilisé comme jachère pérenne de 2 à 3 ans et comme ombrage de jeunes caféiers. Comme engrais vert avec une forte densité de semis, cette plante peut donner de bons résultats, mais son enfouissage doit être précoce, car elle se lignifie très rapidement, au bout de 3 à 4 mois (BOTTON, 1957).

3) **Matériel utilisé.**

Le matériel végétal utilisé pour cette étude provient de prospections réalisées par M.F. TROUSLOT et H. TEHE en Côte d'Ivoire en novembre 1984 ; les graines et les pieds mères ont été récoltés dans deux champs de *T. vogelii*, l'un à Pauléoula (échantillon MFT 487-497), l'autre à Keibly (échantillons MFT 511-517), dans la région de la forêt dense humide de Taï (TROUSLOT, 1984).

Il a été ensuite entretenu et multiplié sur les parcelles expérimentales du centre ORSTOM d'Adiopodoumé. Une collection de semences et de plantes cultivées en plein champ a ainsi pu être mise en place.

Nous avons utilisé des cals chlorophylliens obtenus dès 1985 :

1) à partir de fragments d'hypocotyles, prélevés sur de jeunes plantes issues de graines (échantillon MFT 512-516) en conditions stériles, par T. HARDY et I. HARDY-CLARIS.

Au cours des repiquages, des lignées de cals chlorophylliens friables, productrices de roténoïdes et notamment de roténone, ont été sélectionnées en fonction de leur morphologie et de leur production en roténoïdes ; Code : β , X et D.

2) à partir de la feuille d'une jeune germination stérile (échantillon MFT 494), par M. F. TROUSLOT. Code : F1

Des cals strictement hétérotrophes ont été obtenus par réversion à l'obscurité des cals chlorophylliens appartenant à ces souches.

B) TECHNIQUES DE CULTURE *IN VITRO*

1) Préparation du matériel végétal stérile

Pour désinfecter les graines et le matériel végétal prélevés dans la nature, deux méthodes ont été utilisées.

Première méthode

- Lavage à l'eau stérile
- Passage dans l'alcool 70% pendant 1mn
- Rinçage à l'eau stérile
- Trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium à 7% additionnée de quelques gouttes de Tween 80 pendant 3 minutes.
- Rinçage à l'eau stérile jusqu'à élimination du détergent.

Deuxième méthode

- Passage dans l'alcool 70° pendant 1mn
- Rinçage à l'eau stérile
- Trempage dans une solution de HgCl_2 à 1% pendant 3mn
- Rinçage à l'eau distillée stérile (3 fois)

2) Germinations et microbouturages *in vitro*

Les graines sont ensemencées individuellement en conditions stériles dans des tubes de culture, soit sur un milieu nutritif solide simple, type Knop sans régulateur de croissance, soit sur du papier filtre imbibé d'eau stérile.

La technique de microbouturage mis au point au Laboratoire et appliquée à des vitroplants de *Tephrosia vogelii* est la suivante :

Dans une boîte de Pétri stérile, on isole des fragments de tige feuillée tels que la microbouture corresponde à un noeud caulinaire, sur lequel s'insère la base d'une feuille qui abrite dans son aisselle un bourgeon axillaire.

Les feuilles sont le plus souvent sectionnées. Une partie de l'entrenoeud sous-jacent plonge dans le milieu gélosé. Les microboutures sont cultivées en tubes, sur des milieux solides appropriés, favorisant la rhizogénèse et le développement des pousses feuillées.

3) Ensemencement primaire : initiation de cals de prolifération

Des cals ont été initiés à partir d'explants prélevés sur des germinations stériles et mis en culture sur milieu gélosé dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre contenant environ 40 ml de milieu solidifié.

a) Conditions de culture

— Paramètres physiques

La germination des graines, les microboutures et les cals photomixotrophes sont cultivés dans les conditions suivantes :

- Photopériode : 18H/24H de lumière
 - Température : 28 +/- 3°C
 - Intensité d'éclairement : 120 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (40W.m²)
- l'éclairement est assuré par des tubes fluorescents Cool-White et GroLux en proportions égales.

Les caractéristiques physiques des sources lumineuses utilisées sont déterminées à l'aide d'un appareil LICOR (Li-185A) équipé d'un détecteur de type 190s ($\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Les cals hétérotrophes sont maintenus à l'obscurité dans les mêmes conditions de température.

— Milieu de culture

Le milieu d'initiation et d'entretien des cals contient :

- Les macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962)
- Les microéléments de NITSCH *et al.*, (1968)
- Les composés organiques et les vitamines de NITSCH *et al.*, (1968)

additionnés de glutamine.

La composition détaillée du milieu de base est indiquée dans le tableau VI.

On rajoute à ce milieu :

- Phytohormones (ANA et BAP à 1mg.l^{-1})
- Agar à 6g.l^{-1}
- Saccharose en teneur variable suivant la nature de la culture : 15 ou 30g.l^{-1} (44 ou 88 mM).

La balance hormonale ANA/BAP = $1/1(\text{mg.l}^{-1})$ a été adoptée au Laboratoire à partir des résultats obtenus sur des cultures photomixotrophes de *Cytisus scoparius* (SATO *et al.*, 1981), d'*Euphorbia characias* (HARDY *et al.*, 1987) et d'*Abrus precatorius* (HARDY-CLARIS, 1988).

Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant l'autoclavage. La stérilisation des milieux est effectuée à l'autoclave à 116°C pendant 30 minutes.

b) Entretien du soucier-Repiquage

Les cals chlorophylliens sont cultivés dans des fioles d'erenmeyer de 250 ml ou 300 ml contenant 80 ml de milieu à 88 mM de saccharose, obturées par des bouchons de silicone haute performance (VERSILIC : fabrication Verneret- France).

Les cals hétérotrophes sont entretenus sur le même milieu dans des tubes dont le capuchon est obturé par du Scell-o-frais.

Les cals chlorophylliens et hétérotrophes sont repiquées régulièrement toutes les trois semaines.

TABLEAU VI**COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE**

Macroéléments	mg.l ⁻¹	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20,61
KNO ₃	1900	18,79
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	2,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1,50
KH ₂ PO ₄	170	1,25
Microéléments	mg.l ⁻¹	mM
H ₃ B ₃	10,00	0,16
MnSO ₄ .4H ₂ O	25,00	0,11
ou		
MnSO ₄ .H ₂ O	18,96	0,11
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,00	3,48 10 ⁻²
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,00 10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	1,00 10 ⁻⁴
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	1,14 10 ⁻⁴
Fe SO ₄ .7H ₂ O	27,80	0,10
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,25	0,10
Composés organiques	mg.l ⁻¹	mM
Glycine	2,00	4,44 10 ⁻²
Myoinositol	100,00	0,55
Acide nicotinique	5,00	4,06 10 ⁻²
Pyridoxine Monohydrochloride	0,50	2,40 10 ⁻³
Thiamine	0,50	1,50 10 ⁻³
Biotine	0,05	2,00 10 ⁻⁴
Acide folique	0,50	1,10 10 ⁻³
Glutamine	200,00	1,36

4) Passage en suspension

Le passage en suspension a été réalisé :

- 1) à partir de cals friables et chlorophylliens pour les souches photomixotrophes
- 2) et à partir de cals friables et blancs cultivés à l'obscurité pour les suspensions hétérotrophes.

Environ 10 g de matière fraîche sont légèrement écrasés à l'aide d'une spatule, puis transférés dans un Erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml de milieu liquide à 15 g.l^{-1} (44 mM) de saccharose pour les souches photomixotrophes et 20 g.l^{-1} (58,6 mM) pour les souches hétérotrophes.

Après 7 jours de culture, nous avons obtenu, par filtration en aseptie sur toile à blutter en nylon de 1 mm de maille intérieure (Blutex- Fab. Tripette & Renaud), des suspensions de cellules et des agrégats de cellules.

Lors du premier repiquage la suspension est diluée de moitié avec du milieu neuf.

5) Influence de la densité initiale d'ensemencement

Nous avons testé sur la souche β hétérotrophe et photomixotrophe différentes densités d'ensemencement.

Les figures 6 et 7 montrent au cours du temps l'évolution comparée des volumes sédimentés des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes.

La densité initiale retenue est de 12% pour les suspensions hétérotrophes et de 11% pour les suspensions photomixotrophes. Elle allie une bonne reprise de croissance lors du repiquage à une biomasse finale satisfaisante.

6) Culture des suspensions cellulaires en erlenmeyer

— Les suspensions cellulaires photomixotrophes sont cultivées en Erlenmeyer de 300 ml, dans un agitateur orbital (modèle Gallenkamp) thermostaté à 28°C , avec une photopériode de 18 heures.

Une intensité lumineuse d'environ $100 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (20 W.m^{-2}) est assurée par un mélange de tubes "Cool-White" (50%) et "Gro-Lux" (50%) (SYLVANIA). L'agitation

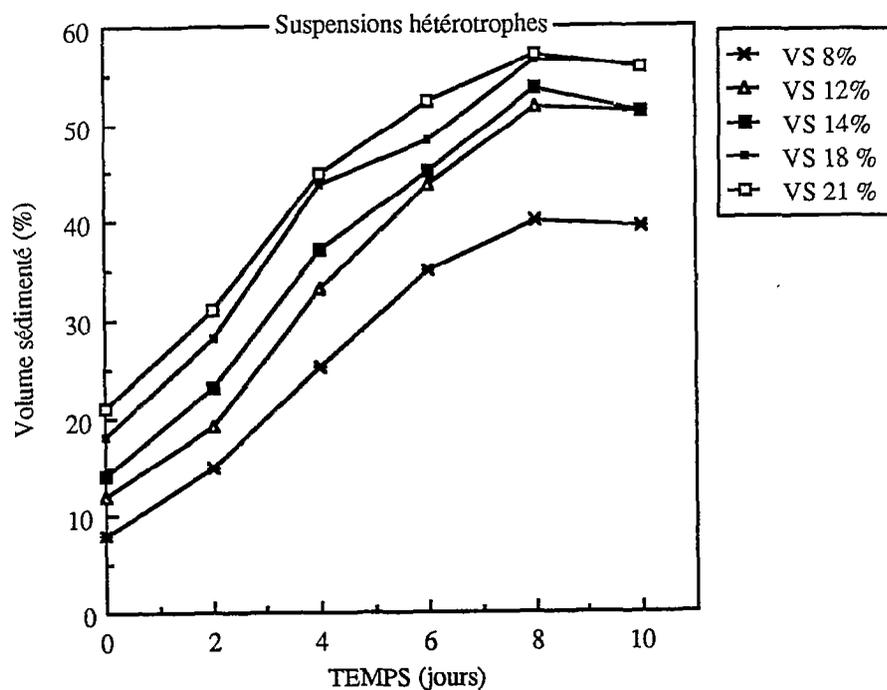


FIGURE 6 : INFLUENCE DE LA DENSITE INITIALE D'ENSEMENCEMENT SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE HETEROTROPHE DE *TEPHROSIA VOGELII*

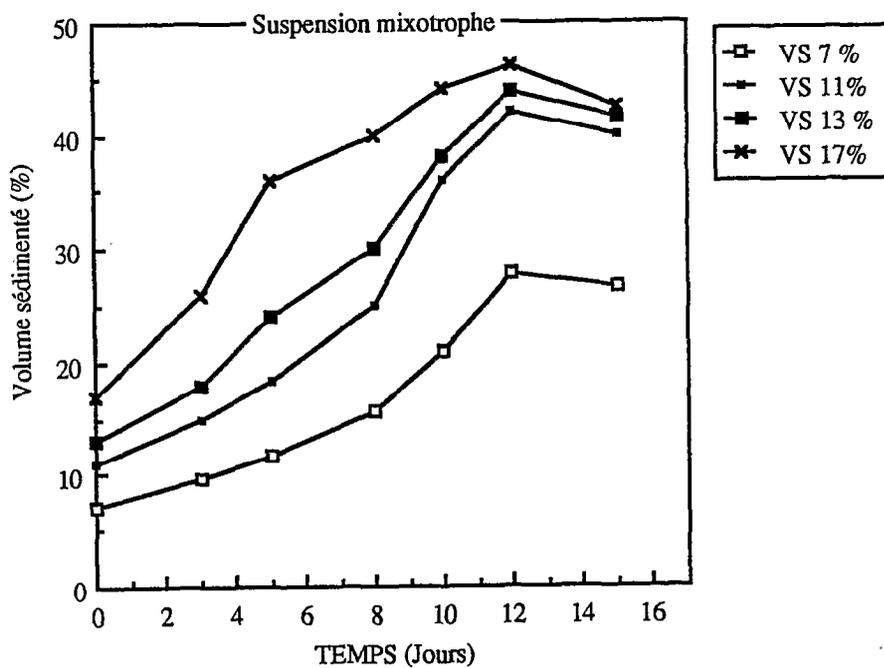


FIGURE 7 : INFLUENCE DE LA DENSITE INITIALE D'ENSEMENCEMENT SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MIXOTROPHE DE *TEPHROSIA VOGELII*

orbitale s'effectue par une plaque Gallenkamp à rotation excentrée tournant à 80 r.p.m.

Les repiquages sont effectués tous les 15 jours (en fin de phase exponentielle), avec une densité cellulaire de 11% (v/v) : 20 ml de la suspension mère sontensemencés dans un Erlenmeyer de 300 ml contenant 60 ml de milieu neuf, obturés par des bouchons de silicone haute performance (VERSILIC : fabrication Verneret- France).

Ces bouchons sont hermétiques et induisent un certain confinement à l'intérieur de la fiole d'Erlenmeyer. Or, durant la croissance des suspensions, la respiration s'accompagne d'une modification de la composition gazeuse dans l'Erlenmeyer : augmentation de la teneur en CO₂ et diminution de celle en O₂. Ainsi, la nature du bouchon utilisé en freinant les échanges gazeux avec l'extérieur, préserve cette atmosphère favorable à la photosynthèse.

— Les suspensions cellulaires hétérotrophes sont entretenues sur une table d'agitation orbitale horizontale (modèle Biolafitte) placée dans une chambre thermostatée à 28 +/- 2 °C, à l'abri de la lumière.

Les repiquages ont lieu tous les 7 jours, dans un milieu à 20 g.l⁻¹ (58,6 mM) de saccharose, avec une densité d'inoculum de 12 % (v/v). Les souches hétérotrophes sont cultivées dans des fioles d'erlenmeyer de 300 ml, obturées par un bouchon de coton et une feuille de papier aluminium.

7) Culture en bioréacteur

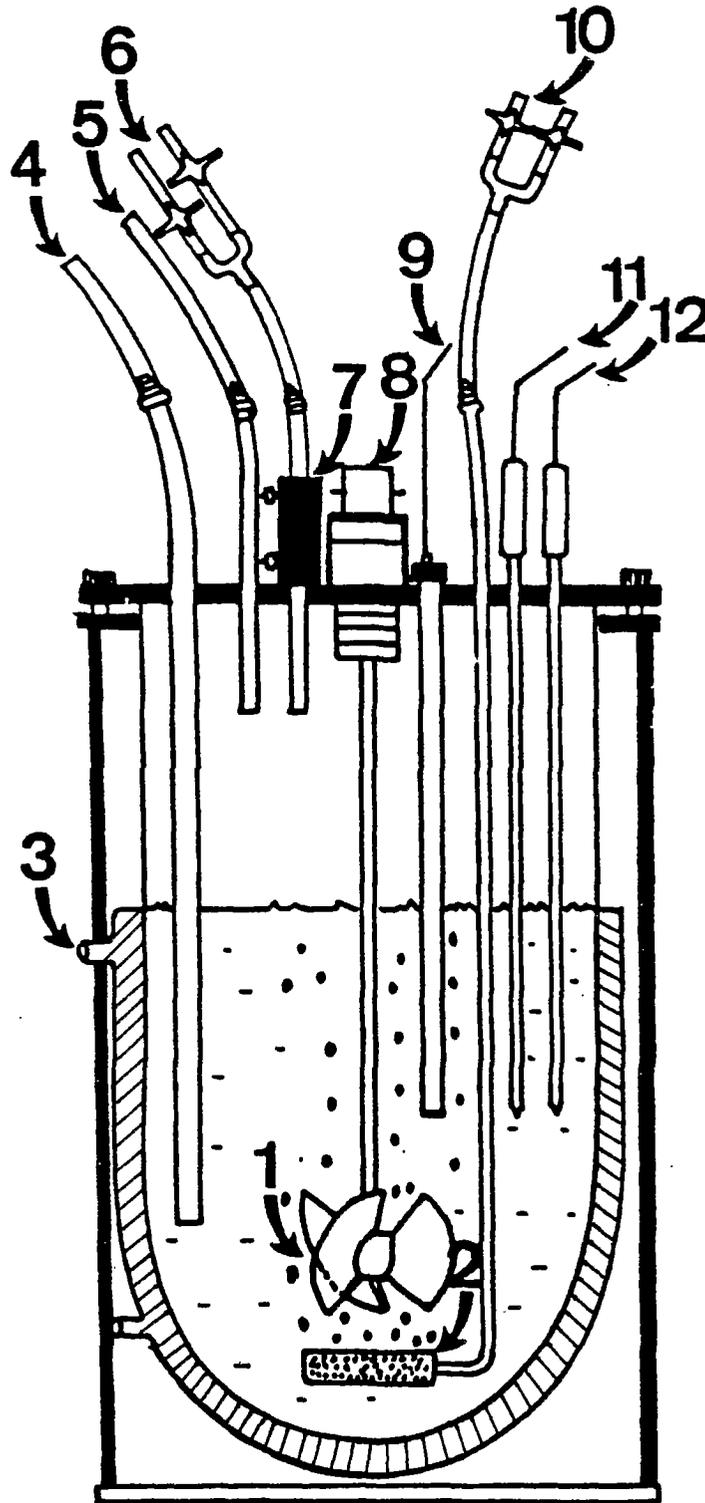
a) Description du matériel

Le bioréacteur utilisé (Figure 8) est un incubateur à cultures cellulaires de marque BIOLAFITTE, à agitation mécanique, d'un volume total de 2,2 litres (capacité utile : 1,7 litres). Il comprend une cuve en verre borosilicaté de 110 mm de diamètre, à double enveloppe, fond hémisphérique, fermée hermétiquement par une platine en acier inoxydable.

L'homogénéisation de la culture est assurée par une turbine à trois pales amovibles, adaptée aux cellules végétales. Son profil en hélice, permet de limiter les contraintes de cisaillement, et d'éviter ainsi une lyse cellulaire trop importante.

Une circulation permanente d'eau thermostatée (27 °C) dans la double enveloppe permet de réguler la température de la cuve.

Le mélange gazeux (air enrichi ou non en CO₂), filtré sur une membrane Millipore



- | | |
|--|----------------------------------|
| 1 : Hélice à trois pales | 2 : Diffuseur du mélange gazeux |
| 3 : Sortie d'eau thermostatée | 4 : Conduit pour prélèvement |
| 5 : Entrée de milieu | 6 : Sortie du mélange gazeux |
| 7 : Condenseur | 8 : Agitation à vitesse variable |
| 9 : Sonde de mesure de l'oxygène dissous | 10 : Entrée du mélange gazeux |
| 11 : Electrode de mesure pH | 12 : Electrode de mesure rH |

Figure 8 : BIOREACTEUR AGITE ET AERE DE 2 LITRES (BIOLAFITTE)

(d'après HARDY-CLARIS, 1988)

(pores de 0,2 μM), est apporté par un diffuseur à la base du réacteur.

La composition du mélange gazeux est assurée en amont par un débitmètre massique de marque BROOKS. Le débit en sortie est contrôlé régulièrement à l'aide d'un débitmètre à bille BROOKS.

Dans le milieu de culture peuvent être immergées une électrode à pH stérilisable (INGOLD), une électrode de mesure du potentiel d'oxydoréduction stérilisable (INGOLD), ainsi qu'une sonde ampérométrique (INGOLD) ou une sonde potentiométrique (BIOLAFITTE) pour la mesure de l' O_2 dissous.

Ces sondes, vissées sur la platine métallique, sont reliées au boîtier central d'alimentation et de contrôle BIOLAFITTE (Figure 9). Un condenseur alimenté en eau refroidie (10°C), placé en sortie du mélange gazeux, limite l'évaporation du milieu de culture, provoquée par le bullage d'air sec.

Un dispositif d'éclairage circulaire composé de tubes fluorescents (SYLVANIA Cool-White 50% et Gro-Lux 50%) entoure le réacteur. Le flux lumineux résultant et arrivant au centre de la cuve est de $110 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (environ 25 W.m^{-2})

La photopériode (18 heures) est commandée par une horloge électrique.

b) Techniques de culture

— *Mise en oeuvre d'une culture en bioréacteur*

Le réacteur équipé de ses sondes, contenant de l'eau bidistillée, est autoclavé à 116°C pendant 45 minutes.

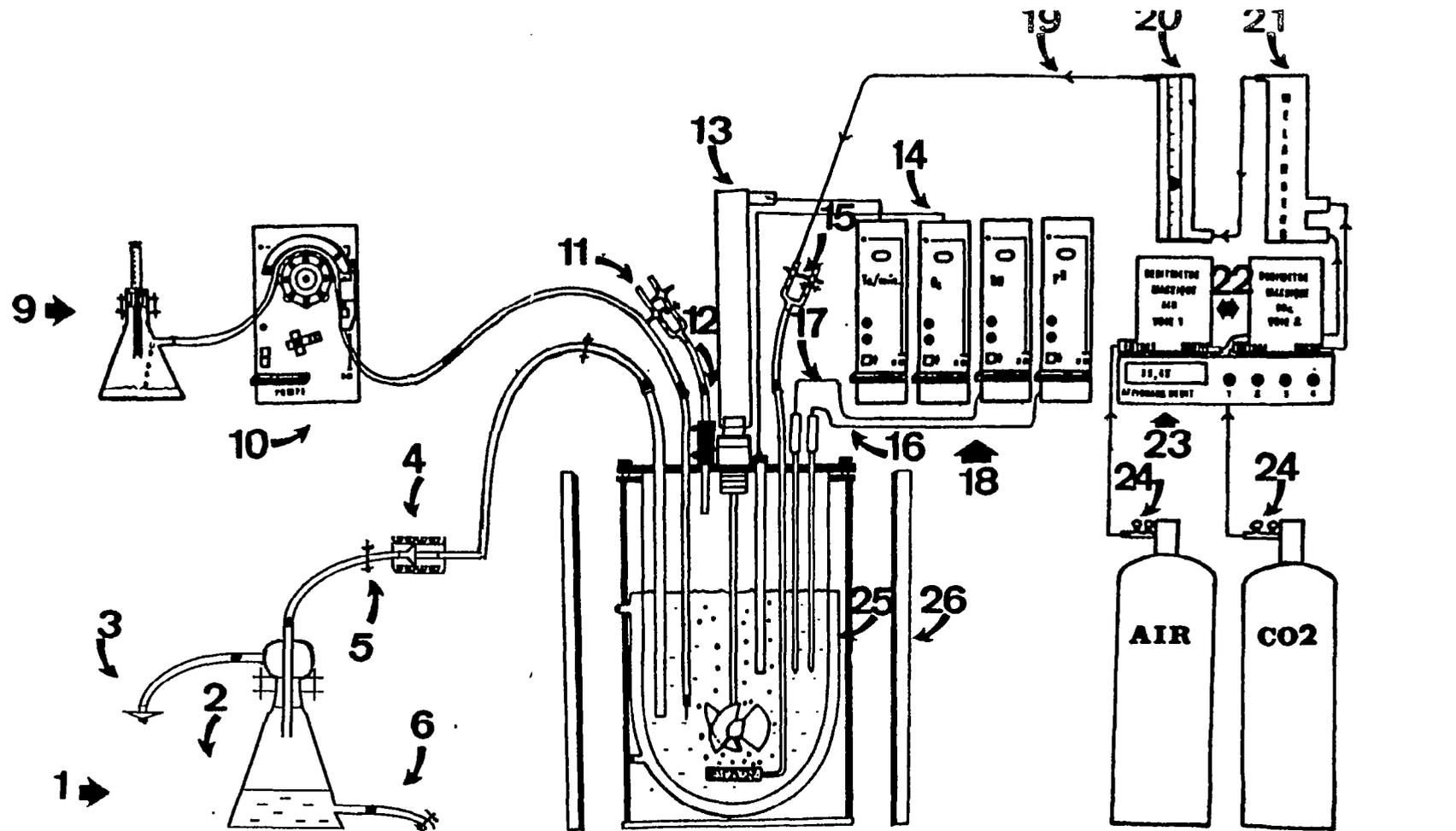
Un deuxième autoclavage est ensuite effectué pendant 30 minutes, la cuve étant remplie alors, de milieu de culture. Le milieu est mis à agiter sous bullage pendant 24 heures au moins, afin de détecter une éventuelle contamination due à un défaut de montage ou à l'autoclavage du réacteur.

L'ensemencement est ensuite réalisé à l'aide d'un inoculum homogène de la souche β , cultivée en Erlenmeyer à la lumière ou à l'obscurité, en fin de phase exponentielle-début de la phase stationnaire.

— *Techniques de prélèvement*

Il a été mis au point au Laboratoire, deux systèmes de prélèvement *in situ* de la suspension :

* Un système de mini-prélèvement permettant de soutirer du bioréacteur un



1 : Prélèvement de cellules + milieu
 2 : Fiole de prélèvement
 3 : Prise d'air
 4 : Raccord rapide
 5 : Pince de Mohr
 6 : Récupération cellules + milieu
 9 : Mini prélèvement de milieu
 10 : Pompe péristaltique

11 : Sortie du mélange gazeux
 12 : Condenseur
 13 : Moteur du système d'agitation
 14 : Système de mesure de l'O₂ dissous
 15 : Entrée du mélange gazeux
 16 : Circuit de mesure pH
 17 : Circuit de mesure du potentiel d'oxydoréduction
 18 : Affichage (agitation, pO₂, pH, etc.)

19 : Sens de circulation du mélange gazeux
 20 : Débitmètre
 21 : Mélangeur
 22 : Débitmètre régulateur
 23 : Affichage électronique de débit
 24 : Mano-détendeur
 25 : Double paroi (régulation thermique)
 26 : Source lumineuse

Figure 9 : SYSTEME DE REGULATION UTILISE POUR LA CULTURE EN BIOREACTEUR

(Modifié d'après HARDY-CLARIS, 1988)

volume réduit de milieu de culture (environ 5 à 10 ml) en modifiant le moins possible le volume total. Ces prélèvements de milieu (après décantation des cellules) sont effectués tous les jours et permettent de suivre l'évolution des sucres et des minéraux dans le milieu.

* Un système de prélèvement (cellules + milieu) par aspiration d'un volume de 30 à 50 ml de suspension au travers d'une fiole sous vide stérile (tous les jours pour les souches hétérotrophes et tous les 2 ou 3 jours pour les souches photomixotrophes).

C) METHODES ANALYTIQUES

1) Evaluation de la biomasse

Trois paramètres rendant compte des phénomènes de multiplication et de grandissement cellulaires ont été retenus pour évaluer la croissance des suspensions :

- Volume sédimenté (VS), exprimé en ml de biomasse pour 100 ml de suspension après décantation dans une éprouvette. Cette mesure peut également être effectuée dans la cuve même du réacteur, après étalonnage.

- Masse fraîche (MF). Les cellules d'une aliquote de la suspension sont recueillies par filtration sous vide partiel sur verre fritté N°2, puis rapidement pesées.

- Masse sèche (MS). L'échantillon précédent est mis à l'étuve à 60°C pendant 48 heures.

Ces deux derniers paramètres sont également utilisés pour évaluer la croissance des cals.

2) Mesure du pH

La mesure du pH de la suspension est effectuée dans la minute suivant le prélèvement. La suspension est agitée le moins possible afin de ne pas faciliter les échanges gazeux entre le milieu et l'atmosphère, échanges qui viennent perturber la mesure (DOREE *et al.*, 1972).

3) Dosage des sucres

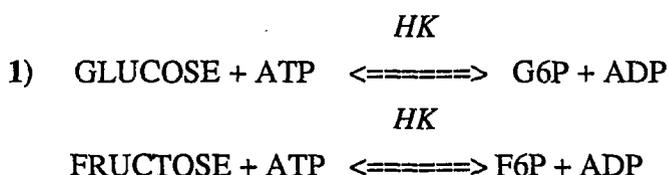
Les glucides intracellulaires, et dans le milieu de culture, sont dosés par la méthode enzymatique de BERNT et BERGMAYER (1974) et BERGMAYER *et al.*, (1974).

Le mode opératoire a été adapté à notre matériel végétal par HARDY-CLARIS (1988) à partir des résultats de REBEILLE-BORGELLA (1983). Cette méthode enzymatique, sensible et très spécifique, a été employée pour déterminer les teneurs en saccharose, fructose et glucoses libres intracellulaires et dans le milieu de culture.

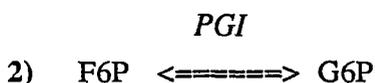
Principe de la méthode : On catalyse, par des enzymes spécifiques du produit à doser, la formation ou la disparition dans des proportions stoechiométriques d'une molécule à haut coefficient d'absorption molaire. Il s'agit ici du NADH ou du NADPH, dont l'absorption est maximale à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$).

a) Dosage du glucose et du fructose

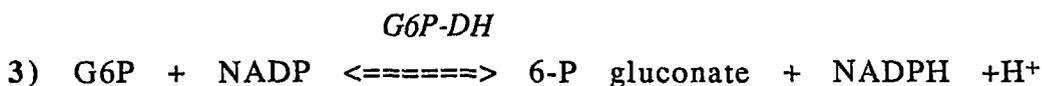
Principe de la réaction:



HK : Hexokinase (EC 2.7.1.1.)



PGI : Phosphoglucose isomérase (EC 5.3.1.9.)



G6P-DH : Glucose 6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49)

Le glucose et le fructose sont phosphorylés en glucose-6-phosphate et en fructose-6-phosphate par l'hexokinase (HK). En présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-P-DH), le 6-P gluconate produit est mesuré indirectement par l'augmentation de la densité optique à 340 nm correspondant au NADPH formé.

La stoechiométrie de la réaction (1 NADPH produit par 6-P gluconate formé) permet de déterminer la concentration en glucose dans l'échantillon en mM. L'addition de Phosphoglucose isomérase (PGI) transforme le F-6-P en G-6-P qui réagit comme précédemment : la différence entre la D.O. obtenue alors à 340 nm et la D.O. précédente nous donne la teneur en fructose en mM.

b) Dosage du saccharose

Le dosage du saccharose fait intervenir une étape supplémentaire qui consiste en une hydrolyse de ce dernier par une β fructosidase, à pH acide.

β fructosidase



β fructosidase ou *invertase* : (EC 3.2.1.26)

La teneur en saccharose est mesurée par la différence des teneurs en glucose avant et après hydrolyse enzymatique par action de la β fructosidase (15 minutes à 25°C).

Les dosages spectrophotométriques sont réalisés sur un spectrophotomètre de marque BAUSCH et LOMB (type : Spectronic 2000).

Les sucres intracellulaires sont dosés comme suit : Les cellules (150 mg de MF), sont essorées et fixées dans 3 ml de NaOH 0,5 N (le saccharose est instable en milieu acide). Les échantillons sont broyés dans un broyeur de potter, avant d'être neutralisés par HCl. Ils sont ensuite centrifugés à 27 000 g durant 15 minutes (Centrifugeuse SORVALL RC5B. Dupont Instruments), en vue d'éliminer les débris cellulaires.

Les concentrations en glucides intracellulaires sont estimées en mM, sur la base d'un volume vacuolaire occupant 95 % du volume total.

4) **Dosage des éléments minéraux**

Méthodes adaptées au matériel végétal *in vitro* par RIVAL (1989).

Le milieu de culture n'étant pas renouvelé, il est nécessaire de suivre l'évolution des éléments minéraux indispensables à la croissance par un dosage périodique.

a) Dosage du phosphore inorganique P_i :

Le phosphore inorganique est déterminé par dosage colorimétrique suivant la méthode de TAUSSKY et SHOOR (1953).

Principe : les ions phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium, en présence de $FeSO_4$ pour former un complexe phosphomolybdique bleu, qui absorbe à 690 nm.

b) Dosage des ions sulfates SO_4^{--} :

Les ions sulfates ont été dosés par néphélométrie selon la technique décrite par FROMAGEOT (1963).

Principe : les sulfates sont précipités, en milieu chlorhydrique, à l'état de sulfate de baryum. Le précipité ainsi obtenu est stabilisé à l'aide d'une solution de Tween 20 ou de polyvinylpyrrolidone soluble. La turbidité des suspensions homogènes est mesurée à 650 nm.

c) Dosage des ions nitrates NO_3^- :

Le dosage des nitrates est effectué suivant la méthode de SNELL et SNELL, (1949).

Principe : les nitrates sont réduits en nitrites par le sulfate d'hydrazine en présence de cuivre. Après diazotation avec la sulfanilamide couplée avec le N-(1-naphtyl) éthylène diamine, les nitrites sont déterminés par spectrophotométrie à 535 nm.

d) Dosage des ions ammonium NH_4^+ :

L'ammonium a été dosé par colorimétrie d'après la technique de SOLORZANO (1969).

Principe : L'ammonium, en milieu alcalin, réagit avec l'hypochlorite pour former une monochloramine. La monochloramine donne ensuite, avec le phénol et l'hypochlorite en excès, le bleu d'indophénol qui absorbe à 640 nm.

Les dosages de minéraux intracellulaires sont réalisés comme suit : environ un gramme de MF de cellules, pesé exactement, est fixé dans 2 ml d'acide trichloroacétique 0,1 N puis broyé au broyeur de Potter et laissé pendant 15 minutes au froid. L'homogénat est ensuite centrifugé à 27 000 g durant 30 minutes. Les éléments minéraux sont dosés dans le surnageant comme pour les milieux de culture.

5) Dosage des chlorophylles totales

Les chlorophylles a+b sont estimées par spectrophotométrie suivant la méthode de MACKINNEY, (1941). La technique a été adaptée au matériel végétal *in vitro* par RIVAL, (1989).

Environ 1 g de cellules fraîches est homogénéisé avec un broyeur de potter dans 4 ml d'acétone pur à l'obscurité et à 0°C. La solution pigmentée et les débris cellulaires sont transférés dans des tubes à centrifugation. Après centrifugation à 27 000 g pendant 10 minutes, le surnageant pigmenté est ramené à un volume de 15 ml puis la densité optique est lue contre l'acétone à 80% aux longueurs d'ondes suivantes : 646 nm - 663 nm.

Les concentrations en chlorophylles a+b sont calculées d'après les équations de LICHTENTHALLER et WELLBURN (1983) :

$$\text{Chlorophylles (a+b)} (\mu\text{g.ml}^{-1} \text{ d'extrait}) = 7,18 \text{ DO}_{663} + 17,32 \text{ DO}_{646}$$

Les résultats sont exprimés en μg chlorophylles. mg^{-1} MS.

6) Mesure des échanges gazeux

Les variations de quantité d'O₂ dissous au cours de la photosynthèse et de la respiration sont mesurées à l'aide d'une électrode polarographique de type CLARK (YSI Model 53 Biological Oxygen Monitor). Les échantillons, environ 5 ml de suspension, sont placés dans une cellule de mesure fermée et thermostatée à 27°C.

L'étalonnage est réalisé en faisant buller dans la cuve de l'air pour régler le 100 %, ce qui correspond à 250 nmoles d'O₂ dissous par ml. Le 0 % est ajusté en faisant buller de l'azote. L'éclairage saturant est assuré par une lampe halogène de 250 watts, focalisée par une lentille à eau, fournissant un rayonnement de 1000 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

L'intensité de la respiration à la lumière et à l'obscurité peut être calculée à l'aide des pentes des enregistrements dans les deux conditions comme suit :

$$R = \frac{250 \times \text{Volume échantillon} \times \text{Pente}}{100 \times \text{Masse Sèche}}$$

Volume de l'échantillon : ml

Pente : % O₂ consommé.min⁻¹

R s'exprime en nanomoles de O₂ consommées.min⁻¹.mg⁻¹ MS

Des mesures *in situ* de l'évolution de l'O₂ dissous ont été réalisées sur les cultures en réacteur Biolaffite équipé de sonde à oxygène. Pour faire des mesures d'échanges gazeux similaires à celles effectuées à l'électrode de Clark, l'aération est coupée. L'entrée et la sortie d'air sont fermées par des pinces de Mohr. On obtient alors un milieu clos identique à celui de la cuve de l'électrode de Clark mais avec cette différence qu'il y a dans les réacteurs une atmosphère au-dessus de la culture. On enregistre, à la lumière puis à l'obscurité et à nouveau à la lumière, les variations de l'O₂ dissous dans la culture qui résultent de l'activité des cellules et des diffusions gaz ---> liquide. Cependant, il est important de noter que ces valeurs obtenues ne peuvent être rapportées à une unité de biomasse.

Un autre critère plus qualitatif a été également utilisé pour caractériser les échanges gazeux des suspensions cellulaires photomixotrophes : la capacité photosynthétique. Ce critère a été défini par DALTON et STREET, (1976) comme suit :

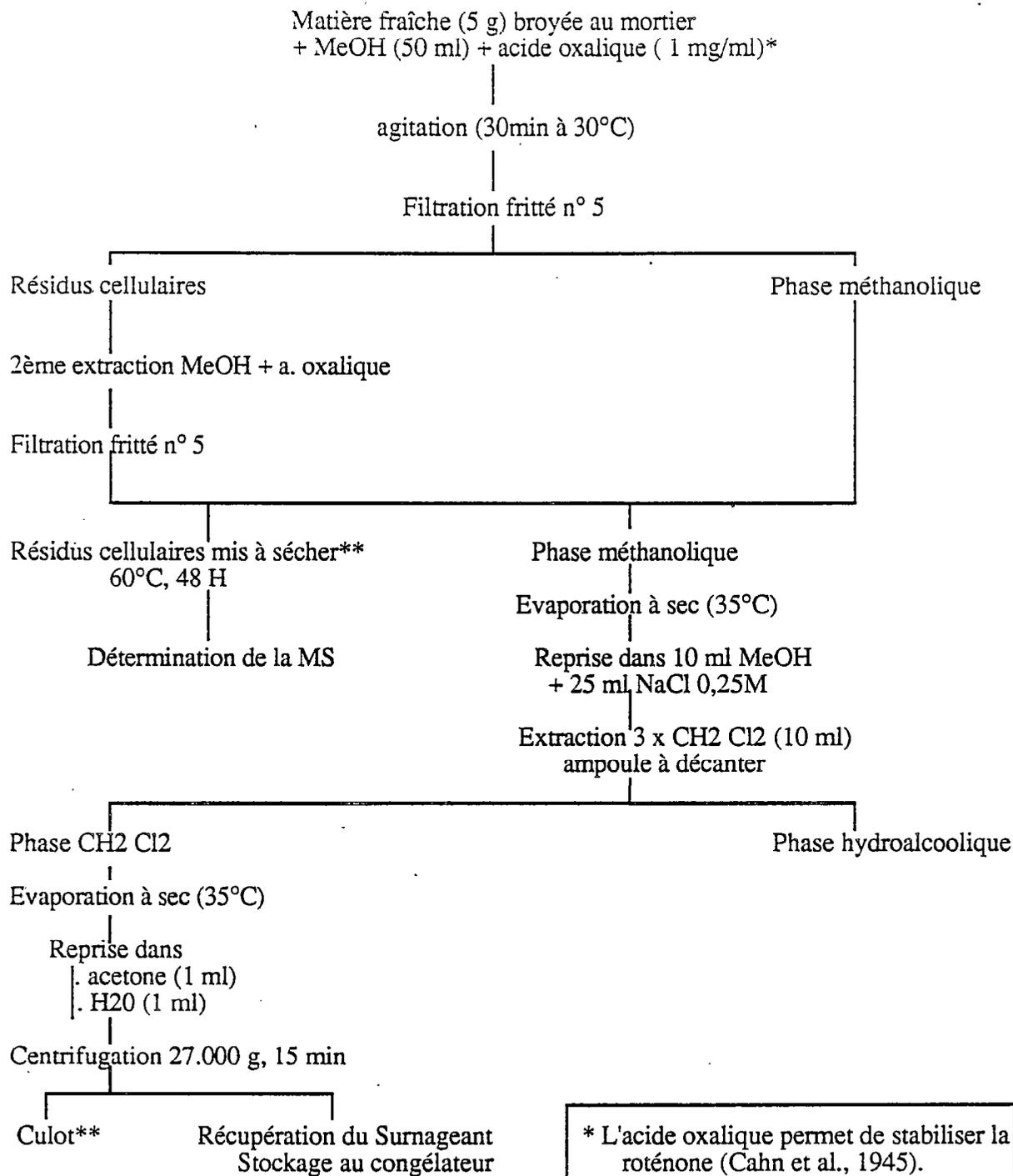
$$CP = 1 - \frac{\text{variation d'O}_2 \text{ à la lumière}}{\text{consommation d'O}_2 \text{ à l'obscurité}} = 1 - \frac{\text{Photosynthèse nette}}{\text{Respiration}}$$

Ce critère renseigne sur l'activité photosynthétiques des cellules.

Une CP > 1 indique une photosynthèse nette positive.

Une CP < 1 indique une photosynthèse nette négative.

La capacité photosynthétique permet d'avoir accès à l'aptitude photosynthétique d'une culture même si celle-ci n'est pas exprimée dans les conditions normales.



** Il a été vérifié que les roténoïdes étaient absents de ces fractions

Figure 10 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ROTENOÏDES DES CELLULES DE *TEPHROSIA VOGELII*

7) Extraction et dosage des roténoïdes

a) Choix et mise au point d'une technique d'extraction

L'isolement et l'analyse quantitative de composés généralement présents en très faibles concentrations sur de petits échantillons supposent des précautions particulières.

Les protocoles extractifs mis au point dans le cas de plantes entières ne présentent pas toujours le même degré d'efficacité sur les cultures de cellules (PETIARD *et al.*, 1982).

Dans l'obligation de choisir un protocole d'extraction adapté à notre matériel *in vitro* différents types d'extraction réalisés sur des plantes entières ont été testés (DELFEL, 1973; DELFEL *et al.*, 1970 ; MORING et Mc CHESNEY, 1979).

Nous nous sommes heurtés notamment à un problème de pureté de l'extrait obtenu. En effet, dans la plupart de ces travaux, les dosages des roténoïdes sont effectués soit par C.C.M. ou encore, par densitométrie ce qui est réalisable sur des extraits bruts. Dans notre cas, l'utilisation de l'H.P.L.C., exige l'obtention d'extraits purifiés.

Un protocole d'extraction de roténoïdes, mis au point sur des cultures cellulaires de *Derris elliptica* (KODAMA *et al.*, 1980) a été également expérimenté.

Les faibles rendements obtenus ainsi que la durée de l'extraction (24 heures) nous a fait abandonner très vite ce protocole.

Finalement, nous nous sommes inspirés des travaux de NEWSOME & SHIELDS (1980) qui proposent une extraction au méthanol puis au dichlorométhane.

De nombreux essais ont été réalisés sur notre matériel végétal *in vitro* (suspensions cellulaires et cals) qui conduisent à proposer la méthode d'extraction donnée dans les figures 10 et 11.

Remarque : la roténone se dégradant à la lumière, les extractions sont effectuées à l'obscurité.

b) Efficacité de la technique :

Nous avons contrôlé l'efficacité de la technique extractive par la méthode des ajouts dosés. En outre, le protocole expérimental utilisé a permis de s'assurer que la méthode retenue n'engendrait pas d'altération des produits dosés (roténone, déguéline, roténolone, téphrosine).

Pour cela, deux échantillons de poids de matière fraîche identiques ont été soumis à

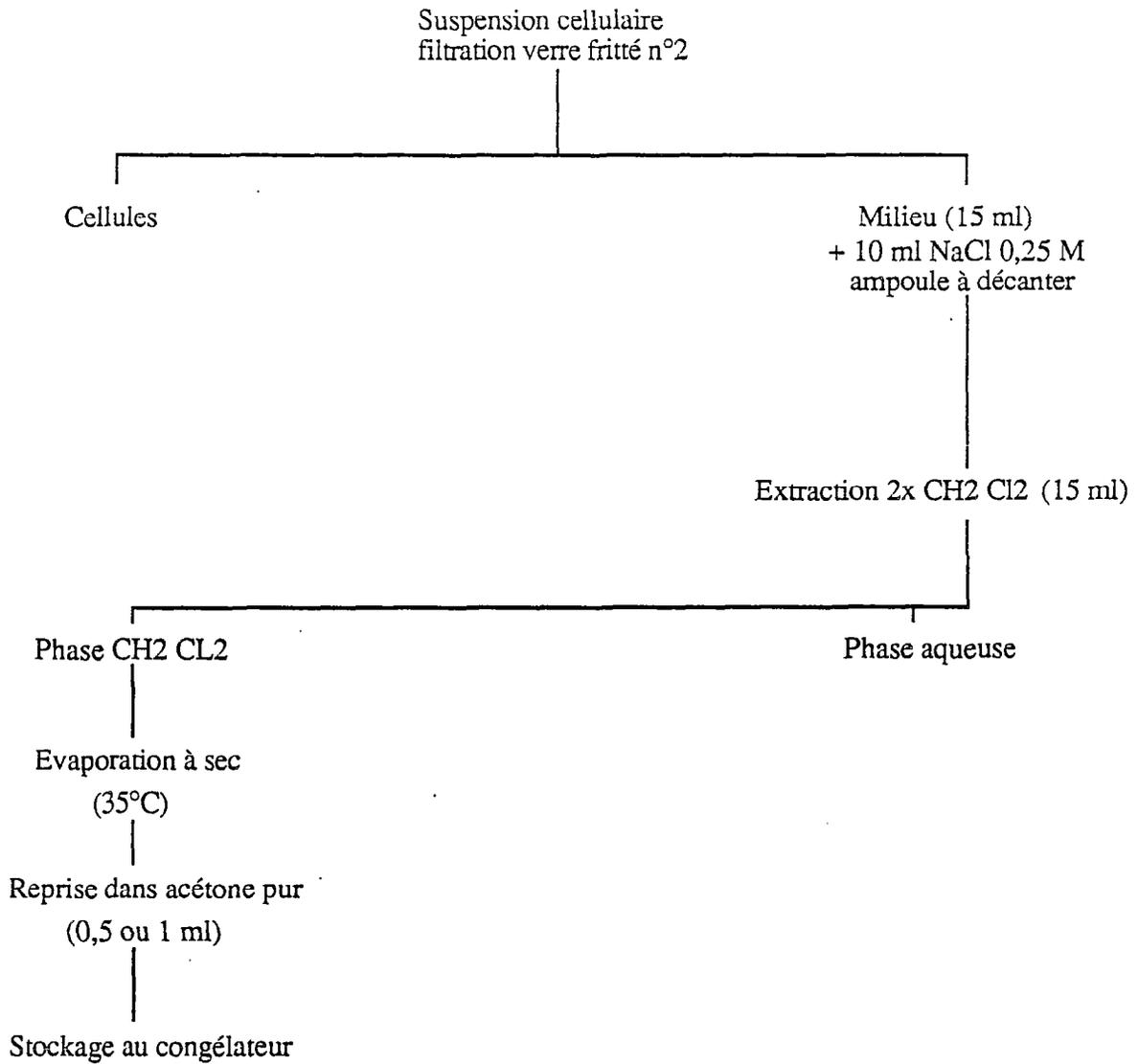


Figure 11 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ROTENOIDES SUR LE MILIEU DE CULTURE

l'extraction. Le premier échantillon (R) est traité directement alors que des concentrations préalablement quantifiées des quatre produits sont ajoutées avant extraction au deuxième échantillon (R_s).

Les résultats du dosage par H.P.L.C. sont portés dans le tableau suivant :

	Roténolone (mg)	Téphrosine (mg)	Roténone (mg)	Dégueline (mg)
R	0,036	0,170	0,043	0,327
R _s	0,701	0,501	0,126	1,007
R _s - R	0,0665	0,331	0,083	0,68
Étalon interne pesée	0,07	0,35	0,089	0,702
Perte sur étalon interne (%)	5	5,4	6,7	3

On constate une perte d'environ 6 % seulement, sur les additions d'étalons internes effectuées et ceci pour les quatre substances. L'extraction est donc reproductible et la dégradation chimique des roténoïdes est quantitativement faible.

c) Analyse des roténoïdes :

— *Chromatographie sur couche mince.*

La séparation des roténoïdes est effectuée sur plaque de gel de silice prêtes à l'emploi sur support d'aluminium avec indicateur de fluorescence (Merck).

Le solvant de migration utilisé est le suivant : Chloroforme/Acétone/Acide acétique (196 : 3 : 1, v./v.).

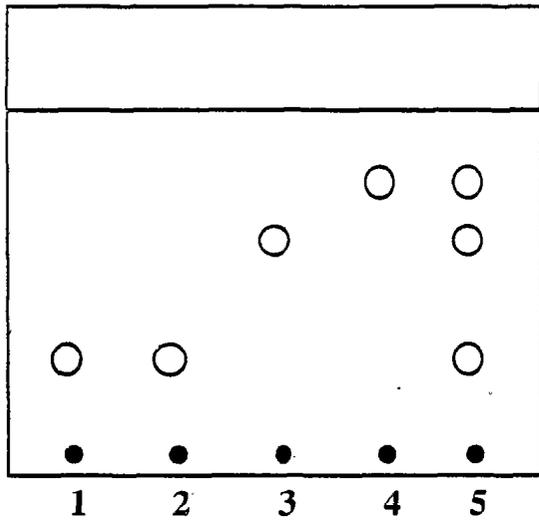


Figure 12 a : ANALYSE EN C.C.M. DE ROTENOIDES

- 1) Roténolone
- 2) Téphrosine
- 3) Roténone
- 4) Déguéline
- 5) Extrait de feuille de *Tephrosia vogelii*

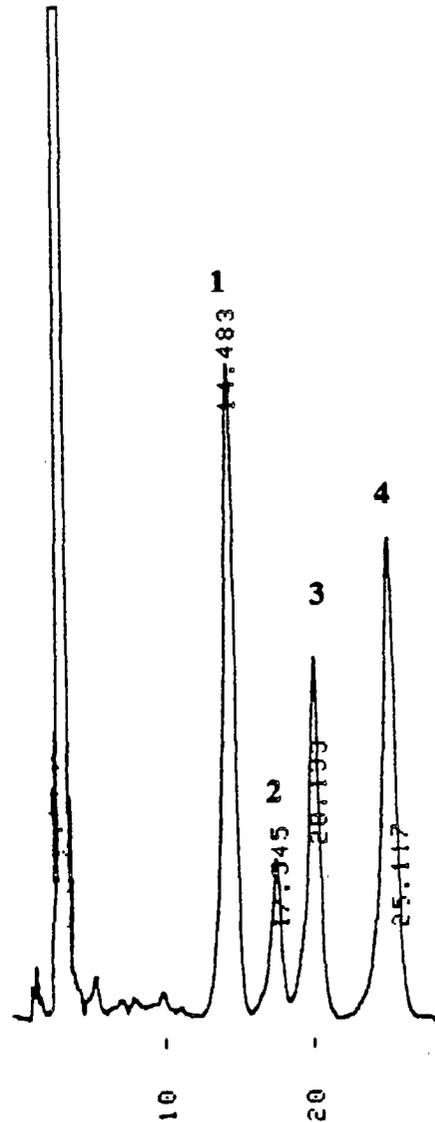


Figure 12 b : ANALYSE H.P.L.C. DE ROTENOIDES

Après migration, l'observation des plaques est réalisée de deux manières différentes:

1) de façon directe à 254 nm :

Les roténoïdes apparaissent alors sous forme de spots de teinte bleu-violet

2) après révélation à la vapeur d'iode :

L'observation est faite à la lumière naturelle, les roténoïdes apparaissant sous forme de taches brunes.

Cette technique d'analyse n'est pas très performante. En effet, elle ne nous permet pas de séparer deux roténoïdes voisins : la roténolone et la téphrosine (figure 12). Elle a donc été vite remplacée par la Chromatographie Liquide à Haute Performance.

Toutefois, cette technique nous est utile pour détecter la présence ou non, de roténoïdes dans des extraits bruts, et d'effectuer ainsi un "screening" assez rapide sur les différentes souches.

— Chromatographie liquide à haute performance :

L'appareil utilisé est un chromatographe à gradient Beckman 332, équipé de deux pompes, et d'un détecteur UV 160 de la même marque. L'intégration des pics est enregistrée par un intégrateur Shimadzu programmable.

La phase mobile, est le mélange suivant : MeOH/H₂O (65 : 35, v./v.). Cette phase mobile est optimale pour la séparation de deux composés : la roténone et la téphrosine , très mal séparées par les techniques d'HPLC trouvées dans la littérature.

Conditions d'analyse :

Débit : 0,8 ml.min⁻¹

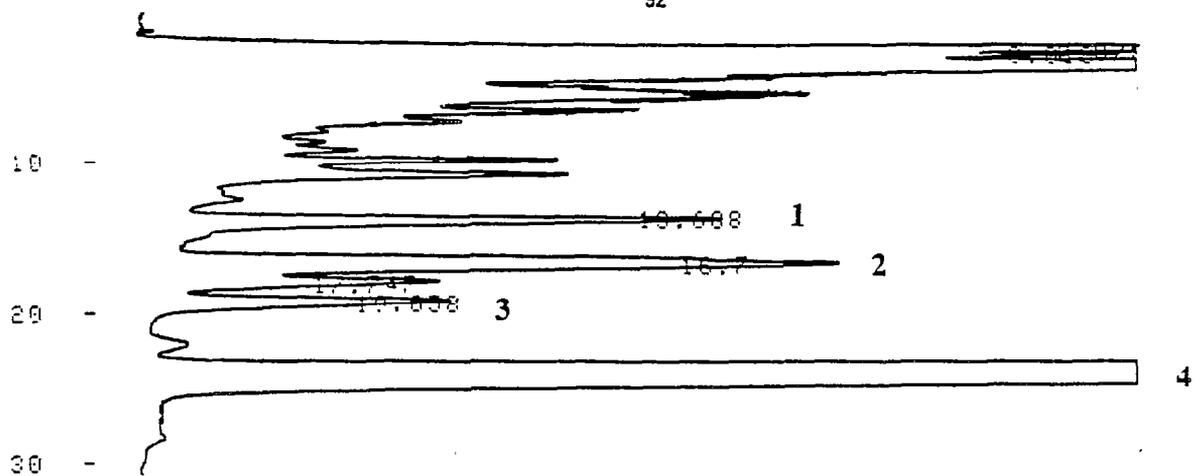
Absorption : 280 nm

Sensibilité : 0,05 AUFS (50 mDO pleine échelle)

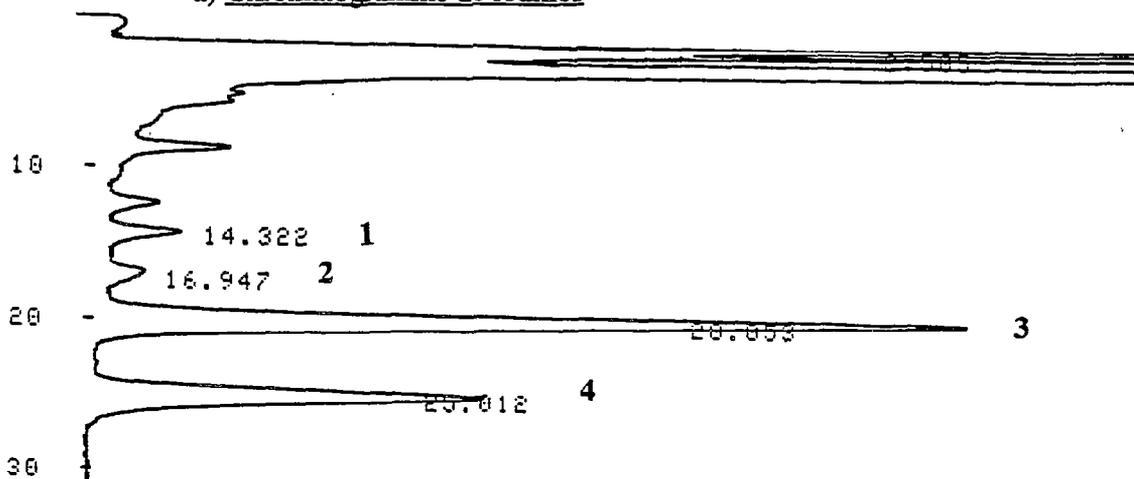
Vitesse de papier : 2 cm.min⁻¹

Atténuation : 2. (1 à 4 mV pleine échelle)

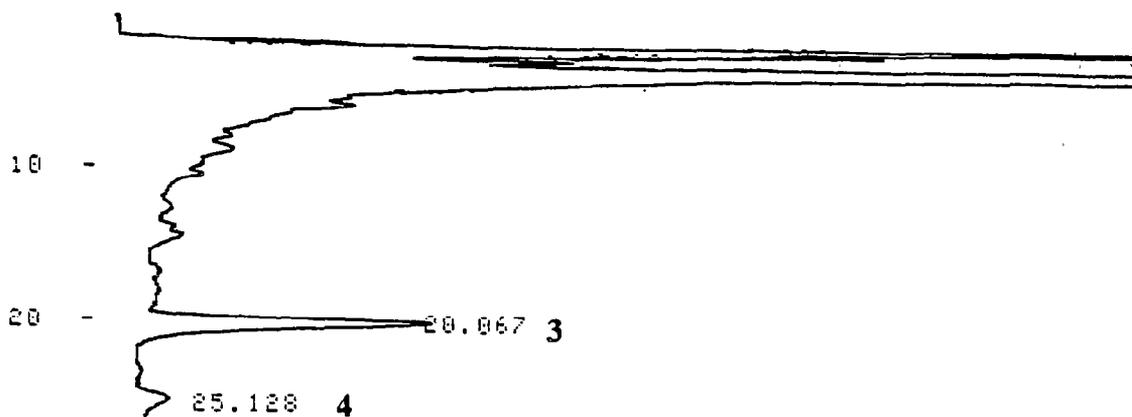
La présence de roténoïdes dans les extraits a été vérifiée après chromatographie sur deux types de colonnes différentes (Lichrospher 100.CH8 et Lichrospher 100.CH18) (MERCK) par co-chromatographie ou comparaison avec des substances de référence.



a) Chromatogramme de feuilles



b) Chromatogramme de cals photomixotrophes



c) Chromatogramme de suspensions cellulaires photomixotrophes

Figure 13 : EXEMPLES DE CHROMATOGRAMMES OBTENUES SUR DES CULTURES CELLULAIRES ET DES PLANTES ENTIERES DE *TEPHROSIA VOGELII*.

- 1) Roténolone
- 2) Téphrosine
- 3) Roténone
- 4) Dégueline

L'origine des substances utilisées est la suivante : roténone pour analyse (Sigma), téphrosine et déguéline (gracieusement fournies par le Dr Delle MONACHE, Istituto di chimica, Universita Catholica del Sacro Cuore, Roma, Italy) et déhydro-roténone, déhydro-déguéline et roténolone (gracieusement fournies par le Dr FUJITA, Department of Agricultural Chemistry-College of Agriculture, Kyoto University, Japan).

Pour les dosages en routine de roténoïdes, la colonne de séparation utilisée est une Lichrospher 100 Ch.8/II (Si-(CH₂)₇-CH₃) (5 µm). Un chromatogramme type témoin est donné sur la figure 12 et des dosages effectués sur les calcs et les suspensions cellulaires de *Tephrosia vogelii* sont illustrés par la figure 13.

8) Extraction et dosage de l'activité PAL

a) Extraction des protéines solubles

Le protocole d'extraction de BERLIN et WIDHOLM (1977) a été adapté à nos cultures cellulaires végétales.

Le matériel végétal (calcs ou cellules isolées), environ 1 g de masse fraîche essoré par filtration sous vide partiel et pesé exactement, est broyé au mortier, à froid (0-4° C), dans du tampon (2 ml de tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,6) en présence de : Polyvinylpyrrolidone insoluble (0,5g), β Mercaptoéthanol (15 µM). Le mortier est rincé avec 2 ml de tampon froid, l'ensemble est filtré sur laine de verre.

Le broyat est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 27 000 g (4°C) (Centrifugeuse réfrigérée SORVALL RC5B. Dupont Instruments). Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique brut.

b) Mise en évidence d'une activité PAL

Afin de mettre en évidence l'existence d'une activité PAL dans notre matériel végétal *in vitro*, trois milieux réactionnels témoins sont réalisés :

- T1 contenant substrat et tampon : témoin d'une éventuelle réaction chimique non enzymatique.
- T2 contenant tampon et extrait enzymatique : la présence du produit final signifierait qu'il est déjà présent dans le milieu réactionnel (témoins extrait végétal).
- T3 contenant substrat et enzyme dénaturée par la chaleur (ébullition pendant 5 min) si le produit n'est pas formé, c'est que l'enzyme est nécessaire pour sa synthèse.

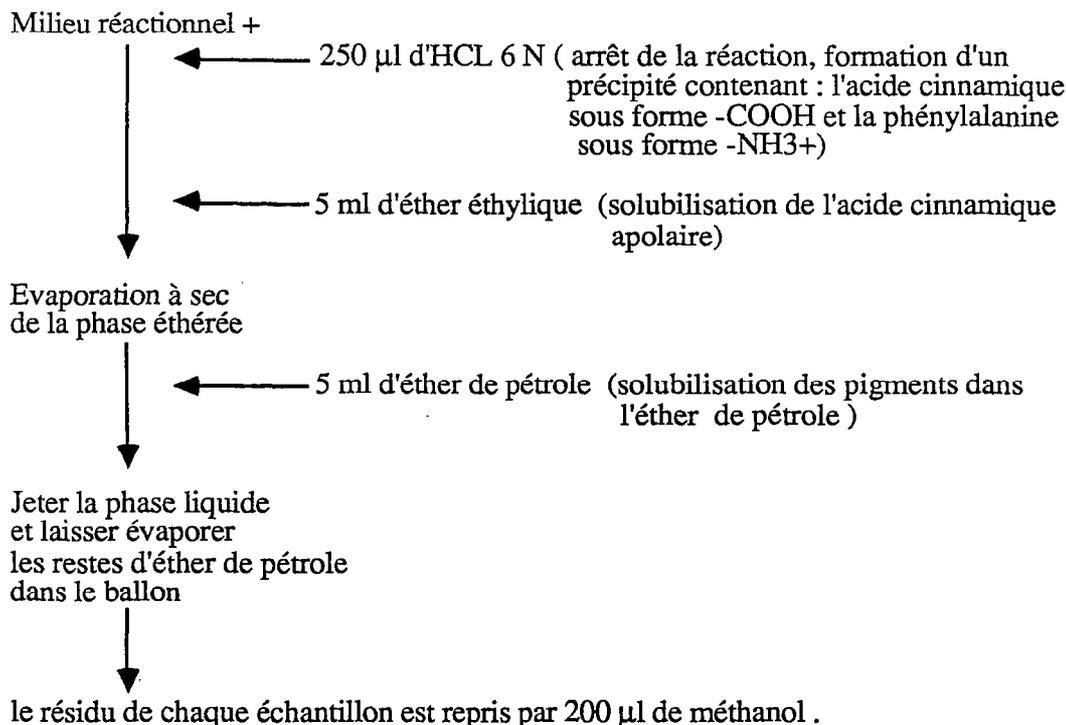
— Composition des milieux réactionnels pour 1,5 ml total

Essais	Extrait enzymatique	Extrait bouilli	Phénylalanine 100 mM	Tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,6
T1	0	0	200 µl	1 300 µl
T2	0	1 300 µl	200 µl	0
T3	1 300 µl	0	0	200µl
E	1 300µl	0	200 µl	0

Chaque échantillon est réalisé en triple exemplaire.

L'ensemble est incubé au bain-marie 25 °C durant 12 heures, afin d'obtenir suffisamment de produit de la réaction enzymatique pour la réalisation d'une chromatographie descendante mono-dimensionnelle.

— Arrêt de la réaction et extraction



On réalise une chromatographie descendante mono-dimensionnelle sur papier Whatmann n° 1 dans le solvant suivant : butanol, acide acétique, eau (6 : 1 : 2- v/v).

100 µl de chaque solution sont déposés sur le papier. A chaque extrémité est déposé également un témoin d'acide cinnamique (50 µg).

Après une migration de 10 heures, les spots d'acide cinnamique sont détectés aux rayons UV. La bande de papier correspondant à ces spots est découpée.

— Mise en solution de l'acide cinnamique et mesures

Chaque zone de papier découpée est éluée par présence de 10 ml de méthanol. Le liquide est filtré sur laine de verre, le filtrat est analysé au spectrophotomètre.

Un blanc est réalisé avec du papier Whatmann n°1 élué avec du méthanol. On réalise un spectre d'absorption de chaque échantillon entre 400 et 200 nm.

Résultats :

T1 contre blanc	pas de réponse
T2 contre T1	idem
T3 contre T1	idem
E contre T2	$\lambda_m = 270 \text{ nm}$ (longueur d'onde correspondant au λ_m de l'acide cinnamique).

Seul l'essai E contient de l'acide cinnamique. On peut ainsi affirmer que la présence d'acide cinnamique est due à l'action d'une enzyme, la PAL, présente dans notre extrait végétal et encore fonctionnelle après l'extraction.

c) Mesure de l'activité PAL

La réaction catalysée par la PAL est irréversible et l'évaluation spectrophotométrique de la vitesse de production d'acide cinnamique donne l'intensité de l'activité enzymatique.

Le coefficient d'extinction molaire de l'acide trans-cinnamique est $\epsilon = 10\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 290 nm alors que la phénylalanine n'a pratiquement aucune absorption à cette longueur d'onde. En conséquence, la désamination du substrat peut être suivie commodément par l'augmentation de la densité optique au cours du temps.

Les mesures sont effectuées en triple exemplaire.

Les milieux réactionnels suivants sont réalisés et mis à incuber à 30 °C pendant 1 heure 30 dans des microtubes Eppendorf. La linéarité en fonction du temps d'incubation a été réalisée, les courbes et les résultats sont présentés dans le chapitre V.

Essais	Témoin	Mesure activité	Concentration finale en mM
Tris-HCL pH 8,6 100 mM	1 300 μl	800 μl	53,3 mM
Phénylalanine 100 mM	0	500 μl	33,3 mM
Extrait enzymatique	200 μl	200 μl	

La réaction est stoppée par adjonction de 100 μl d'une solution d'HCL à 6N. Les tubes sont mis à centrifuger pendant 5 minutes à 10 000 g (Microfuge BECKMANN), afin

de sédimenter les protéines.

Dans ces conditions, la concentration en substrat est saturante et la vitesse d'apparition du produit de la réaction est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans l'extrait (les courbes de ces différentes expérimentations sont présentées dans le chapitre V).

d) Dosage des protéines solubles

Le dosage des protéines solubles est réalisé suivant la méthode de SEDMAK et GROSSBERG (1977), qui allie une bonne reproductibilité et permet de détecter des teneurs en protéines solubles inférieures à 1 µg.

Ce test peut être utilisé pour une grande variété de protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 3 000. La solution de Sedmack est préparée comme suit : Bleu de Coomassie G250 : 0,06 % dans une solution de PCA à 3%.

Les protéines sont dosées spectrophotométriquement à 610 nm.

e) Calculs de l'activité enzymatique

La quantité d'acide cinnamique formée est donnée par la loi de BEER-LAMBERT

$$D.O. = \epsilon \cdot C \cdot d$$

C = concentration en mole.l⁻¹

d = épaisseur de la cuve : 1 cm

ε = Coefficient d'extinction molaire : 10 000 mol⁻¹.l.cm⁻¹

L'activité spécifique de la PAL est finalement donnée par la formule suivante :

$$\frac{\Delta DO \times V \times 1000}{\epsilon \times d \times \Delta t \times v \times C_{\text{protéines}}} \quad \text{en } \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de protéines}$$

V : (l)

ε : 10 000 mol⁻¹.l.cm⁻¹

d : 1 cm

Δt : min

C_{protéines} : g.l⁻¹

9) Essais de stimulation de la production

a) Incorporation de précurseur

Des solutions de L-phénylalanine de différentes concentrations (10 mM ; 1mM ; 0,5 mM ; 0,1 mM ; 0,05 mM ; 0,01 mM), sont ajoutées au milieu de culture déjà autoclavé après filtration stérile sur membrane millipore de 0,45 µm.

Une vingtaine d'Erlenmeyers sont ensemencés (cf. chapitre III) dans les conditions habituelles de culture (densité cellulaire initiale de 11 % pour les suspensions hétérotrophes et de 12 % pour les suspensions photomixotrophes) : trois Erlenmeyers par essais de concentration en L-phénylalanine plus trois témoins. Au 6^{ème} jour de culture pour la souche hétérotrophe et au 12^{ème} jour de culture pour la souche mixotrophe (période précédent le pic de production), les solutions de L-phénylalanine de différentes concentrations, sont ajoutées stérilement dans les Erlenmeyers correspondants (environ 500 µl de solutions), afin de modifier au minimum les conditions de culture à l'intérieur de l'eren.

b) Apport d'éliciteur pathogène

— Préparation du matériel fongique :

A partir de plants de *Catharanthus roseus* présentant des symptômes nécrotiques, des agents pathogènes ont été isolés et cultivés sur milieu nutritif.

Deux souches mycéliennes ont pu être ainsi purifiées : il s'agit de deux *Fusarium* dont l'espèce est en-cours d'identification. Ces deux souches (Fu 123 et Fu 127) sont maintenues en mycothèque au Laboratoire de Phytopathologie de l'ORSTOM d'Adiopodoumé.

La préparation du matériel fongique donnée ici a été réalisée par B. RIO, Phytopathologiste à l'ORSTOM.

Pour les besoins d'une infection, le matériel fongique est cultivé en milieu liquide (100 ml de milieu pour des Erlenmeyers de 250 ml), agité ou non agité.

Composition du milieu liquide :

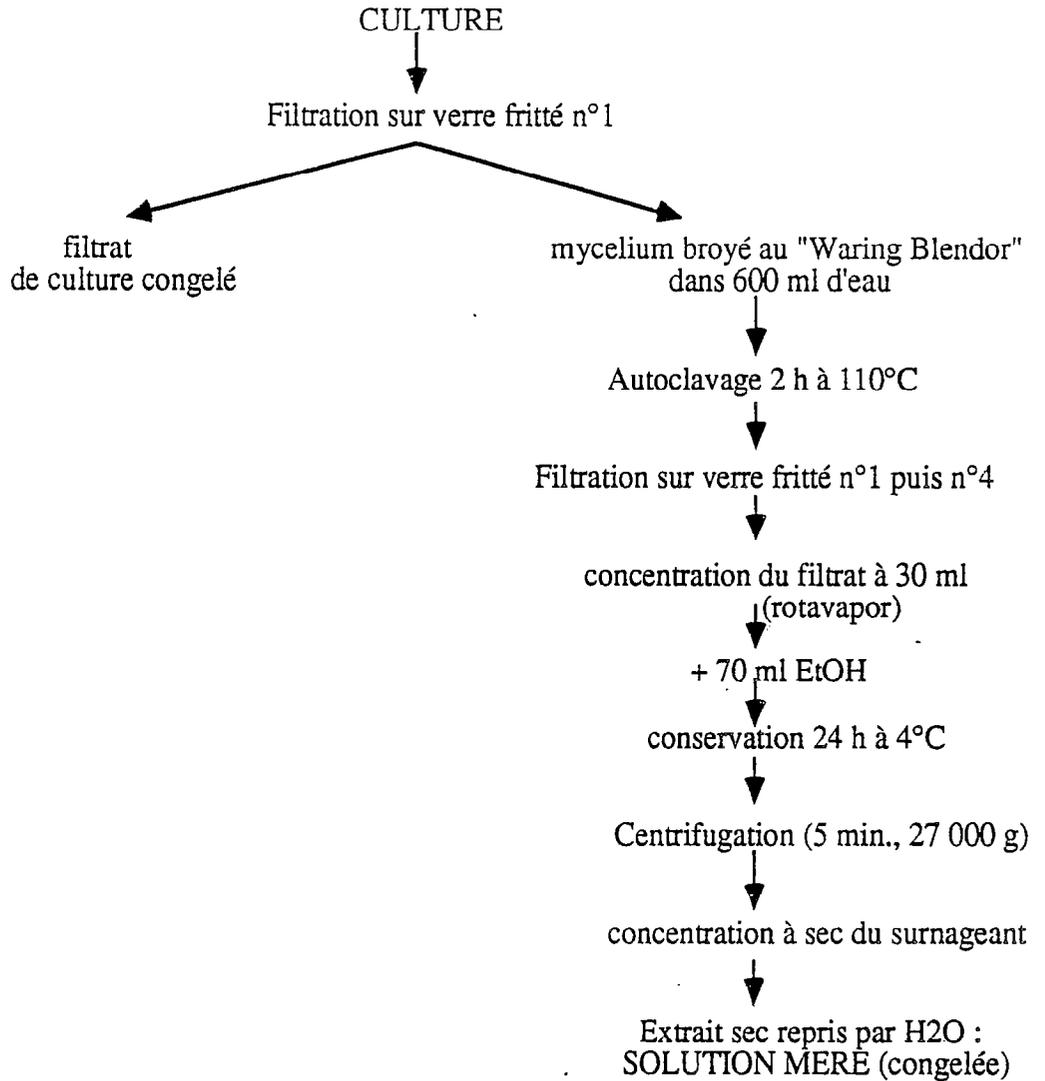
Pour un litre de milieu liquide :

saccharose	20 g
sol.thiamine (0,005 %)	1 ml
sol. d'oligoéléments	1 ml
Asparagine	1 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ H PO ₄	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Mg SO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g

L'expérimentation est menée comme suit :

	MILIEU DE CULTURE SEUL	MILIEU + <i>Fusarium</i> (Fu-123)	MILIEU + <i>Fusarium</i> (Fu-127)
Erlens agités (A)	TA : 2 Erlenmeyers	123A : 7 Erlenmeyers	127A : 6 Erlenmeyers
Erlens non agités (B)	TB : 2 Erlenmeyers	123B : 7 Erlenmeyers	127B : 6 Erlenmeyers

Après huit jours de culture, les échantillons sont traités comme suit :



Protocole :

Une vingtaine d'erlens sontensemencés par pesée dans les conditions habituelles de culture (densité initiale de 11 % pour les suspensions hétérotrophes et 12 % pour les suspensions photomixotrophes) : trois Erlenmeyers par essais de concentration en éliciteurs, plus trois témoins.

Au 6^{ème} jour de culture pour la souche hétérotrophes et au 12^{ème} jour de culture pour

la souche mixotrophe (période précédant le pic de production), 100 μ l et 500 μ l de la solution d'éliciteur 123 B sont ajoutés stérilement dans les Erlenmeyers (la solution d'éliciteur ayant été au préalable autoclavée à 116° C pendant 30 minutes).

c) Apport de solutions tamponnées

Des tampons MES-KOH de différents pH (5,0 ; 5,5 ; 6,0) sont réalisés.

Ces différentes solutions sont ajoutées au milieu de culture à une concentration finale de 5 mM.

Le pH des milieux de culture est mesuré juste après l'adjonction de la solution tampon.

Une vingtaine d'Erlenmeyers sont ensemencés par pesée (cf. chapitre III) dans les conditions habituelles de culture (densité cellulaire initiale de 12 % pour la souche mixotrophe et de 11 % pour la souche hétérotrophe) : trois Erlenmeyers par essai de solutions tampons de pH différents, plus trois témoins.

Au 12^{ème} jour de culture pour les cultures mixotrophes et au 6^{ème} jour pour les suspensions hétérotrophes, les solutions tamponnées de différents pH sont ajoutées stérilement dans les Erlenmeyers (les solutions tampons ayant été au préalable autoclavées à 116°C pendant 30 minutes).

d) Adjonction de fortes concentrations en sels

Une solution de NaCl (2,85 M) est réalisée.

0,25 ml (9 mM concentration finale) ; 0,5 ml (18 mM) ; 1 ml (18 mM) ou 1,5 ml (45 mM) de cette solution sont ajoutés après filtration stérile sur membrane millipore de 0,45 μ m, au milieu de culture des essais.

Une quinzaine d'Erlenmeyers sont ensemencés par pesée (cf. chapitre III) dans les conditions habituelles de culture (densité cellulaire initiale de 11 % pour la souche hétérotrophe et de 12 % pour la souche photomixotrophe) : trois Erlenmeyers par essais de concentration en sels plus trois témoins.

Au 6^{ème} jour de culture pour les suspensions hétérotrophes et au 12^{ème} jour de culture pour les suspensions mixotrophes, les différentes concentrations en NaCl, sont ajoutées stérilement dans les Erlenmeyers correspondants (0,25 ml ; 0,5 ml ; 1 ml et 1,5 ml).

L'ensemble des Erlenmeyers sont alors remis à agiter dans les conditions standards de culture, puis sont utilisés 48 heures après l'apport en sels.

e) Traitement à l'ethrel

Les cultures sont ensemencées dans des fioles à vide comportant un filtre stérile de 0,45 μm de type Millex.

Dans une seconde fiole à vide, on incorpore 10ml de tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8,4 et une petite cupule contenant 100 μl d'ethrel (acide 2-chloroéthylphosphonique appelé encore Ethephon ou CEP), générateur d'éthylène, préparés à l'IRCA (Institut de Recherche sur le Caoutchouc en Afrique, Côte d'Ivoire).

Les fioles à vide sont reliées entres elles, et la cupule contenant l'ethrel est renversée dans la solution tampon ce qui entraîne un dégagement d'éthylène.

Un témoin est réalisé de manière équivalente, mais les 100 μl d'ethrel sont remplacés par de l'eau bidistillée.

CHAPITRE III : OBTENTION ET
CARACTERISATION DES CULTURES
CELLULAIRES HETEROTROPHES ET
PHOTOMIXOTROPHES

CHAPITRE III : OBTENTION ET CARACTERISATION DES CULTURES CELLULAIRES HETEROTROPHES ET PHOTOMIXOTROPHES

A) CROISSANCE ET PRODUCTION SUR MILIEU GELOSE

La croissance en relation avec la production de roténoïdes est étudiée sur des cals chlorophylliens cultivés à la lumière, et sur des cals hétérotrophes stricts, cultivés à l'obscurité.

1) Matériel végétal

*Cals chlorophylliens : souche β ayant subi 16 repiquages successifs à la lumière sur le milieu décrit dans le chapitre matériel et méthodes, additionné de 30 g.l^{-1} (88 mM) de saccharose, cals mères âgés de 22 jours.

* Cals hétérotrophes : souche β ayant subi 25 repiquages successifs à l'obscurité sur le milieu décrit dans le chapitre matériel et méthodes additionné de 30 g.l^{-1} (88 mM) de saccharose, cals mères âgés de 25 jours.

2) Protocole

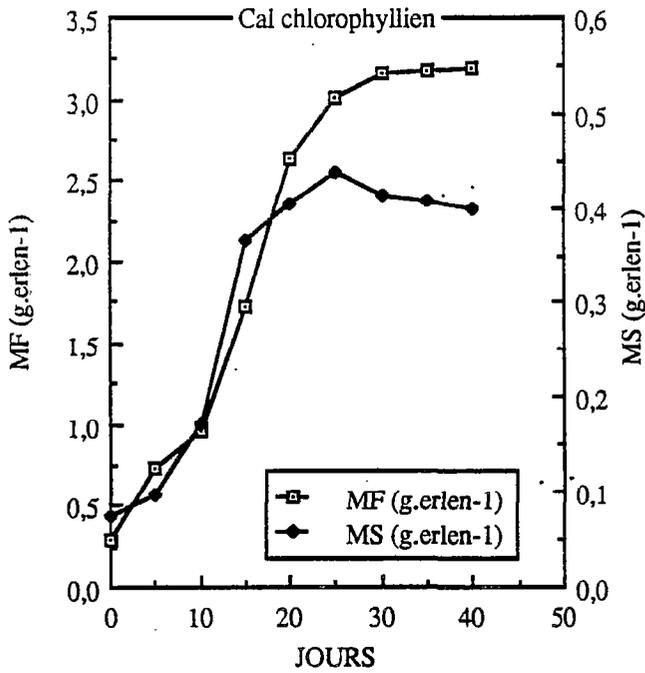
Cinq cals de masse voisine (0,2 g MF) sont ensemencés dans un Erlenmeyer de 300 ml contenant 80 ml de milieu gélosé. Une vingtaine d'erenmeyer sont ainsi préparés. Tous les cinq jours, un Erlenmeyer (deux en début de culture compte tenu de la faible biomasse) est sacrifié.

Les paramètres suivis sont :

- ___ Masse fraîche (MF) par erlen et/ou MF moyen par cal ;
- ___ Masse sèche (MS) sur aliquote ;
- ___ Teneur en chlorophylles (a + b) sur aliquote ;
- ___ Teneur en roténoïdes totaux ;
- ___ Teneur en roténone.

Condition de cultures à la lumière ou à l'obscurité, suivant la souche : cf. techniques de culture.

Figure 14 :



EVOLUTION DE LA BIOMASSE

Figure 15 :

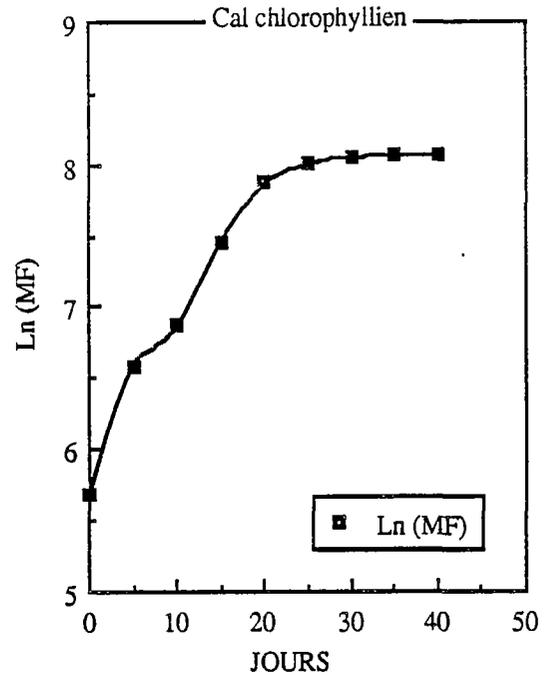
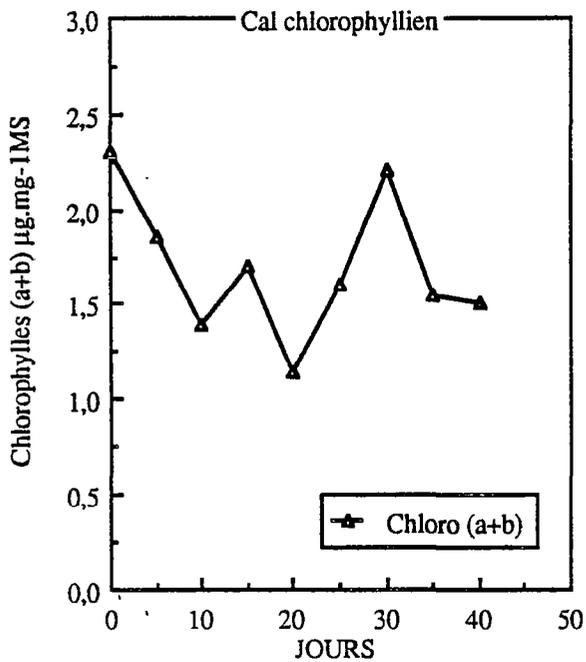
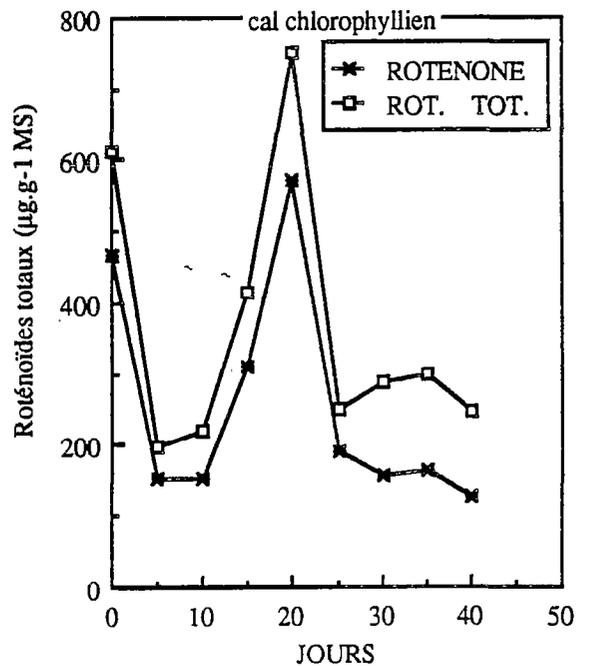


Figure 16 :



EVOLUTION DES CHLOROPHYLLES

Figure 17 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOÏDES

Remarque : Les résultats donnés dans les figures 14, 15, 16 et 17 correspondent à une moyenne faite sur quatre manipulations pour les cals chlorophylliens et ceux donnés dans les figures 18, 19 et 20 pour trois manipulations sur les cals hétérotrophes.

Les teneurs en chlorophylles totales proviennent de manipulations effectuées par M. F. TROUSLOT sur des cals chlorophylliens d'une autre souche de *Tephrosia vogelii*.

3) Résultats

a) Souches cultivées à la lumière :

— Croissance

L'examen de la figure 14 montre que l'évolution de la masse fraîche (MF moyen par cal) en fonction du temps, s'inscrit sur une courbe à phase accélérée suivie d'une phase ralentie, le point d'inflexion se situant au 20^{ème} jour de culture.

Les valeurs expérimentales transformées selon l'expression Ln (Masse fraîche) s'ordonnent sur une droite jusqu'au temps t_{20} , avec un coefficient de corrélation $\rho = 0,997$ (figure 15). La croissance accélérée des cals peut donc être assimilée à une croissance exponentielle. Le rapport de la biomasse fraîche finale moyenne à t_{40} (3,18 g) et de la biomasse fraîche à l'ensemencement t_0 (0,29 g) nous donne un facteur de multiplication de 10,96 pour les cals. La masse sèche est multipliée par 5,3.

La diminution de la teneur en matière sèche à partir du 25^{ème} jour de culture est à corrélérer avec l'augmentation de la friabilité du cal, facteur important pour le passage en suspension (observations visuelles).

La teneur des cals en chlorophylles se situe entre 1,2 et 2,3 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS tout au long de la culture (figure 16).

La forte teneur en chlorophylles au temps t_0 (2,3 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS) est liée à la sélection des parties les plus vertes et les plus jeunes au moment du repiquage.

— Evolution de la Production de roténoïdes (figure 17)

Les cals chlorophylliens de souche β synthétisent principalement de la roténone (environ 76 % des roténoïdes totaux). On observe après l'ensemencement tout d'abord une chute de la production de roténoïdes, puis une augmentation dont le maximum se situe en

Figure 18 :

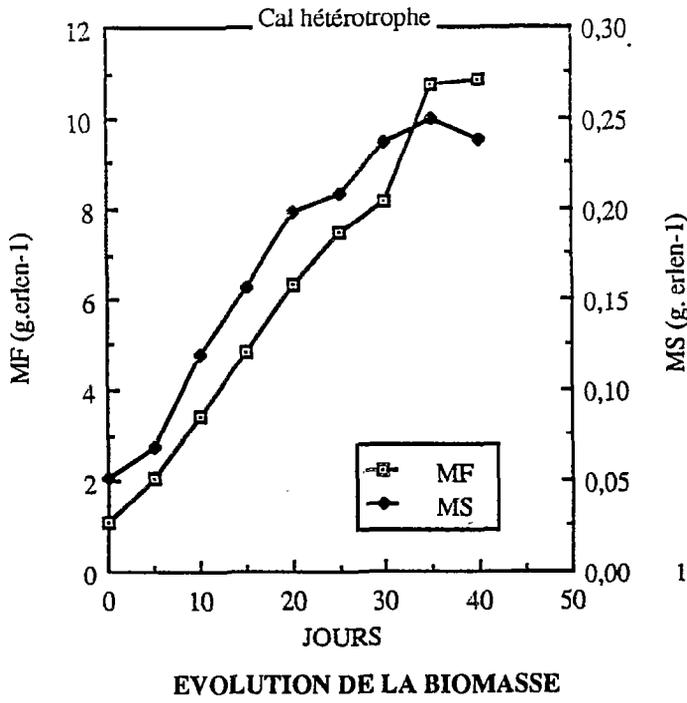


Figure 19 :

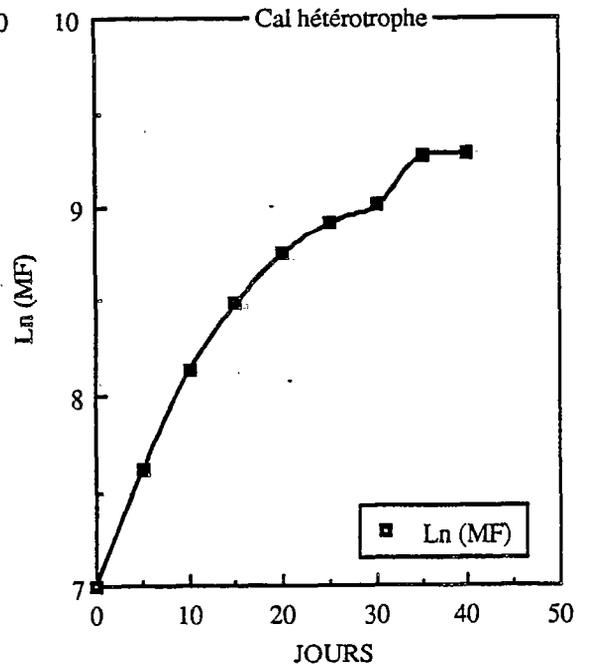
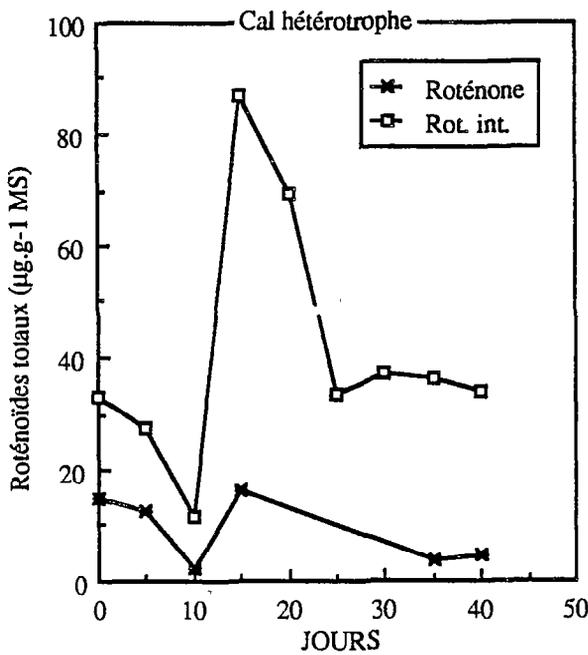


Figure 20 :



pleine phase exponentielle, à t_{20} avec une teneur en roténone de $573 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS ($750 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de roténoïdes totaux) contre une teneur de $469 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS à t_0 . Cette forte teneur en roténone au temps t_0 s'explique par le fait que le repiquage des cals est effectué au 22^{ème} jour de culture, correspondant au maximum de production de cette souche. La production de roténone chute ensuite au 25^{ème} jour de culture ($190 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) et reste faible et relativement stable jusqu'à t_{40} .

b) Souches cultivées à l'obscurité

— Croissance

On note (figure 18) une évolution de la masse fraîche (MF par erlen) sensiblement différente de celle obtenue avec la souche β chlorophyllienne.

Les valeurs expérimentales transformées suivant l'expression $\text{Ln}(\text{MF})$ s'ordonnent sur une droite entre les temps t_5 et t_{25} , avec un coefficient de corrélation de 0,998 (figure 19). La phase accélérée de la croissance des cals peut donc être assimilée à une croissance exponentielle. La biomasse fraîche finale se situe à $10,85 \text{ g}$ (t_{40}) pour un ensemencement de $1,1 \text{ g}$ (t_0), soit un taux de multiplication de 9,86. La masse sèche est multipliée par 5.

— Evolution de la production de roténoïdes (figure 20)

Contrairement aux observations faites sur les cals chlorophylliens de la même souche, l'ensemble des roténoïdes rencontrés dans les plantes entières (dégueline, téphrosine et roténone) sont retrouvés après extraction et dosage des cals hétérotrophes. La production de roténone est très faible par rapport à l'ensemble des roténoïdes totaux (seulement environ 15%), elle est parfois même non dosable.

Après une chute au repiquage, la production maximale de roténoïdes est obtenue au 15^{ème} jour de culture ($87 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS). Après le 20^{ème} jour de culture la production diminue considérablement, pour se stabiliser à t_{40} à $35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

4) Comparaison-Discussion

* Dans les conditions expérimentales utilisées, la croissance des cals chlorophylliens

et hétérotrophes de *Tephrosia vogelii* de souche β est exponentielle puis ralentie.

On note très peu d'écart entre le taux de multiplication des souches hétérotrophes (9,86) et celui des souches chlorophylliennes (10,96).

De même, le facteur de multiplication de la masse sèche est de 5.

La lumière ne semble donc pas jouer de rôle prépondérant sur la croissance des cals de *Tephrosia vogelii*.

Le(s) facteur(s) limitant(s) de la croissance sont probablement d'ordre nutritionnel : pour conserver une souche sur milieu solide, il est impératif de la repiquer à intervalles réguliers sur du milieu neuf. Les cals hétérotrophes et chlorophylliens sont repiqués toutes les trois semaines.

Des courbes de croissance de même type ont été obtenues sur d'autres souches de *Tephrosia vogelii*, (TROUSLOT, communication personnelle) et sur des souches de *Abrus precatorius* (HARDY-CLARIS, 1988).

* La biosynthèse des roténoïdes dans les cals chlorophylliens et hétérotrophes de souche β est réalisée parallèlement à la croissance (maximum de production en pleine phase exponentielle).

Ce type de cinétique a déjà été décrit par BECKER et SCHRALL (1977) lors de l'étude de la croissance de cals de *Sylbinum maritimum*, en relation avec la production de flavonoïdes.

La biosynthèse presque exclusive de roténone dans les cals chlorophylliens (76 % des roténoïdes totaux) est un fait intéressant, puisque, rappelons-le, ce composé (le plus actif) est présent en quantité mineure (seulement 7 à 12 % parmi les roténoïdes totaux des feuilles de *T. vogelii*). Ce phénomène peut être imputé à une déviation métabolique souvent observée en culture *in vitro* (IBRAHIM, 1983), ou encore à une inhibition enzymatique de la transformation de la roténone en d'autres roténoïdes.

On peut également noter une accumulation de roténoïdes plus importante dans les cals chlorophylliens par rapport aux cals hétérotrophes.

Cette observation peut être reliée au fait que la PAL, enzyme clé de la biosynthèse des phénylpropanoïdes et donc des roténoïdes (cf. voie de biosynthèse chapitre I, figure 2) est stimulée à la lumière (HAHLBROCK *et al.*, 1976 ; EBEL et HAHLBROCK, 1977).

Nous aborderons cet aspect métabolique dans le chapitre V.

Un effet positif de la lumière sur la formation de serpentine (ROLLER, 1978), mais aussi d'anthocyanines (CAREW et KRUEGER, 1976), a été également rapporté dans le cadre d'expériences faites sur des cals de *Catharanthus roseus*.

En conclusion, cette étude nous a permis :

- * de définir la période optimale pour le repiquage des souches ; en fin de phase exponentielle : 25^{ème} jour de culture (primordial pour l'entretien et le maintien de la stabilité du soucier) ;
- * de connaître le facteur de multiplication de la biomasse ;
- * de déterminer la période où la production de roténoïdes est maximale : 20^{ème} jour pour la souche chlorophyllienne et 15^{ème} jour pour la souche hétérotrophe.

Aucune différence n'a pu être mise en évidence au niveau de la croissance des cals hétérotrophes et chlorophylliens. La lumière, par contre, semble affecter fortement la biosynthèse et l'accumulation de roténoïdes dans les cals de *Tephrosia vogelii*. En effet, la production de roténoïdes est pratiquement 10 fois plus élevée à la lumière qu'à l'obscurité.

Les résultats obtenus ici, constituent un préalable indispensable à la suite de notre étude. Ils nous ont permis notamment, de sélectionner des souches hétérotrophes et photomixotrophes ayant une bonne croissance et synthétisant des quantités non négligeables de roténoïdes.

Ces souches, ainsi caractérisées, vont servir d'inoculum pour les suspensions cellulaires sur lesquelles seront effectuées de nombreuses études, tant au point de vue de la caractérisation de la croissance, du métabolisme glucidique et azoté, que de la production de métabolites secondaires.

B) ETUDE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES EN ERLLENMEYER

La stratégie la plus couramment utilisée lors de la mise en oeuvre d'une production de métabolites secondaires consiste, en premier lieu, à comparer les cinétiques de croissance et de biosynthèse de métabolites secondaires en culture discontinue ; il est alors possible de s'orienter vers un choix technologique permettant de se placer dans des conditions favorables à la production.

Quand l'accumulation de métabolites s'effectue durant la phase exponentielle, le développement de procédés assurant une croissance optimale permettra l'obtention de quantités plus importantes de métabolites. Ce modèle de production est réalisé notamment par des suspensions cellulaires de *Berberis* (HINZ et ZENK, 1981) synthétisant de la berbérine et des suspensions cellulaires de *Phytolacca americana* synthétisant des béthacyanines (SAKUTA *et al.*, 1986).

En revanche, lorsque production et croissance sont découplées, il est intéressant de maintenir les cellules dans un état de non prolifération après la croissance (TABATA *et al.*, 1974 ; NOE *et al.*, 1980).

La croissance de suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* en relation avec certains aspects du métabolisme et de la production de roténoïdes a été étudiée.

Nous nous sommes plus spécialement attachés à suivre l'évolution des nutriments azotés et glucidiques ainsi qu'à celle du phosphore inorganique et des sulfates, le milieu de culture n'étant pas renouvelé.

Les caractéristiques de la croissance et les modifications du métabolisme glucido-azoté, en relation avec le métabolisme secondaire, ont été suivies au cours du cycle de croissance.

1) Matériel végétal

* Suspension hétérotrophe de *Tephrosia vogelii* : souche β ayant subi 15 repiquages sur un milieu liquide à 20 g.l⁻¹ (58,6 mM) de saccharose.

* Suspension photomixotrophe de *Tephrosia vogelii* : souche β ayant subi 9 repiquages successifs à la lumière sur le milieu liquide donné dans le chapitre "Matériel et Méthodes", additionné de 15 g.l⁻¹ (44 mM) de saccharose.

2) Protocole

* Suspension hétérotrophe :

La suspension initiale âgée de 7 jours (ce qui correspond d'après les expérimentations réalisées au préalable à la fin de la phase exponentielle de croissance) est

filtrée sur toile à bluter de maille 40 μm , de manière à obtenir d'une part, la biomasse fraîche, d'autre part, le milieu conditionné sans lequel la suspension ne pourrait démarrer.

En effet, ce milieu conditionné est recueilli et mélangé à du milieu neuf à raison de 75 ml pour 600 ml de milieu neuf.

Pour une densité d'ensemencement de 12%, environ 8 g de matière fraîche (pesée stérile) sont ensemencés dans 80 ml de milieu dans chaque erlen. 15 Erlenmeyers sont ainsi préparés.

Tous les jours, un erlen (deux en début de culture, compte tenue de la faible densité cellulaire) est utilisé.

Les paramètres suivis sont :

- le pH ;
- le volume sédimenté ;
- la MF de la suspension ;
- la MS sur une aliquote ;
- la respiration ;
- les glucides intra et extracellulaires ;
- les ions ammoniums et le phosphore inorganique intra et extracellulaires ;
- les ions nitrates et sulfates extracellulaires ;
- les roténoïdes totaux intra et extracellulaires ;
- la roténone intra et extracellulaire.

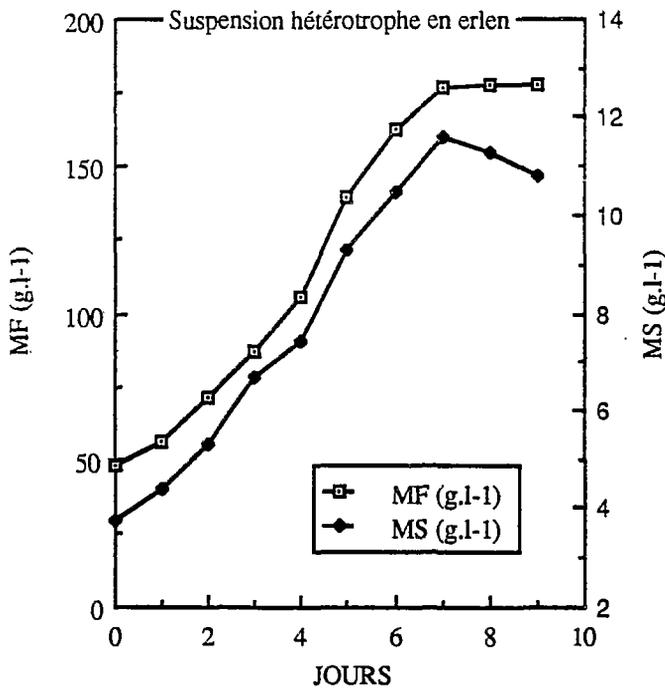
* Suspension photomixotrophe :

La suspension initiale âgée de 14 jours est filtrée sur toile à bluter de maille de 40 μm . 20 Erlenmeyers sont ensemencés à raison de 8 g de matière fraîche (peese stérile) pour 80 ml de milieu (100 ml de milieu conditionné pour 500 ml de milieu neuf), correspondant à une densité cellulaire initiale de 11 %.

Un Erlenmeyer est utilisé tous les deux jours et les paramètres définis pour la souche hétérotrophe sont suivis en y ajoutant :

- la photosynthèse
- la teneur en chlorophylles (a+b)

Figure 21 :



EVOLUTION DE LA BIOMASSE

Figure 22 :

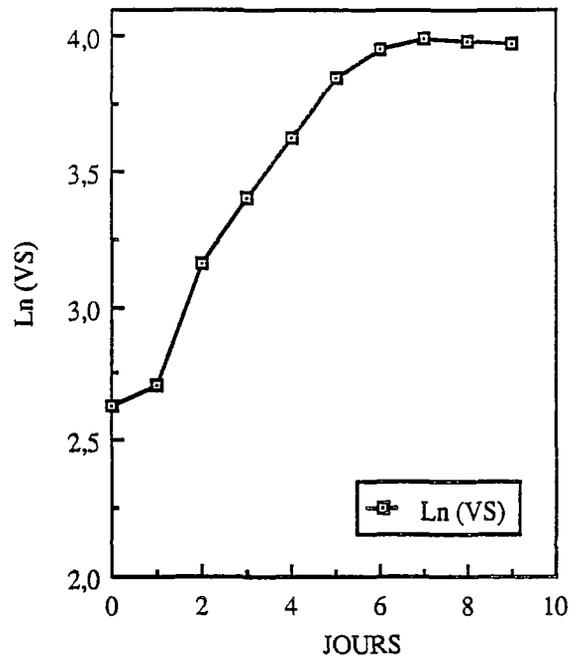
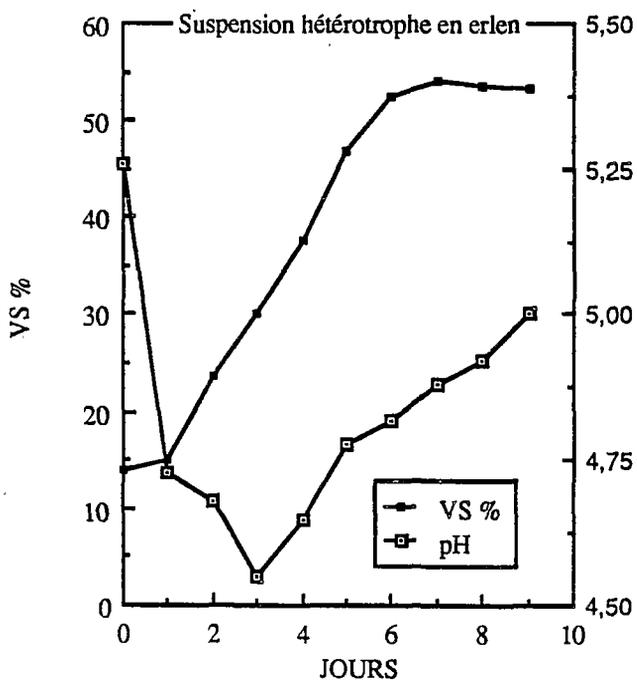
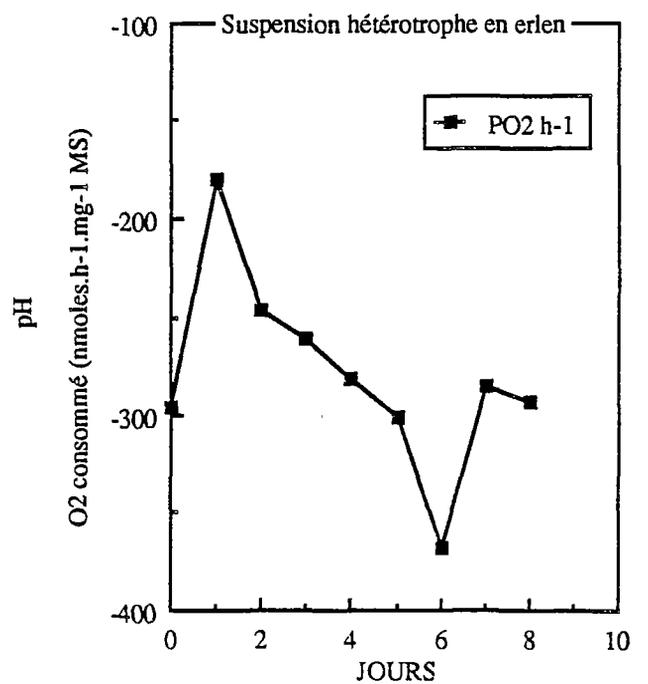


Figure 23 :



EVOLUTION DE LA CROISSANCE & DU PH

Figure 24 :



EVOLUTION DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE

3) Résultats

a) Souche hétérotrophe

Les résultats présentés dans ce paragraphe correspondent à deux répétitions.

— *Evolution générale de la croissance et du pH extracellulaire*

Dans les conditions de culture retenues, la croissance des suspensions cellulaires hétérotrophes de *Tephrosia vogelii* est caractérisée par :

- une phase de latence brève de un jour (pas toujours reproductible et visible seulement au niveau du VS),
- une phase exponentielle de 4 jours (figure 21),
- une phase stationnaire de croissance de 2 jours.

La phase exponentielle se traduit en coordonnée semi-logarithmique par une droite d'équation :

$$Y = 0,22 X + 2,7 \quad Y = \text{biomasse et } X = \text{Temps (avec } \rho = 0,999) \text{ (figure 22)}$$

Le temps de doublement de la population cellulaire (T_d) est ici de 65 heures.

Le maximum de biomasse produite en fin de croissance exponentielle est atteint au 7^{ème} jour de culture (Biomasse finale : 200 g.l⁻¹ en masse fraîche et 13,3 g.l⁻¹ en masse sèche).

La MF est multipliée par 3,5 en une semaine alors que la MS est multipliée par 2,56.

Le pH du milieu de culture varie : il est de 5,25 à l'ensemencement, s'abaisse à 4,5 au 3^{ème} jour de culture et s'élève progressivement à 5,0 au 9^{ème} jour de culture (figure 23).

— *Evolution des échanges gazeux*

L'intensité respiratoire à l'obscurité est faible en début de culture (figure 24). Elle s'intensifie fortement pendant la phase de multiplication cellulaire intense, jusqu'au 6^{ème} jour de culture. En fin de cycle, cette respiration cellulaire diminue sensiblement, ce qui pourrait être mis en relation avec le début de la lyse cellulaire.

Figure 25 :

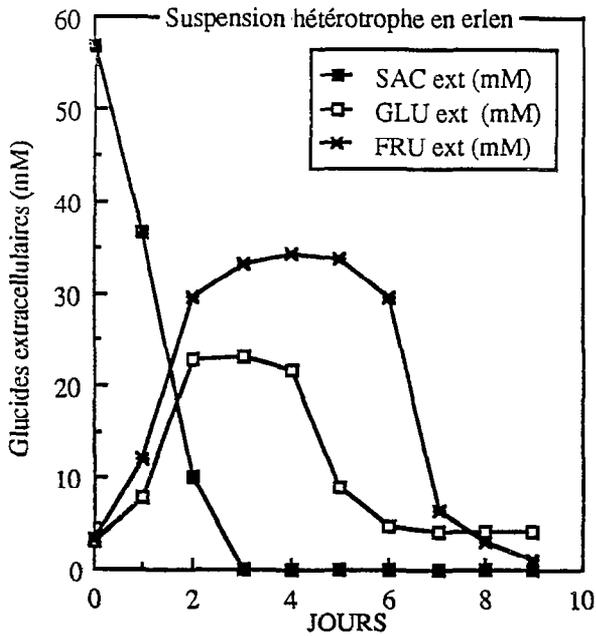
EVOLUTION DES GLUCIDES
EXTRACELLULAIRES

Figure 26 :

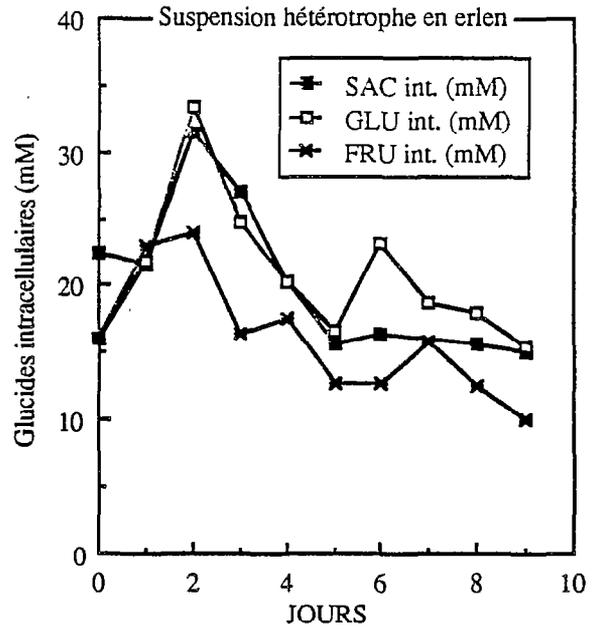
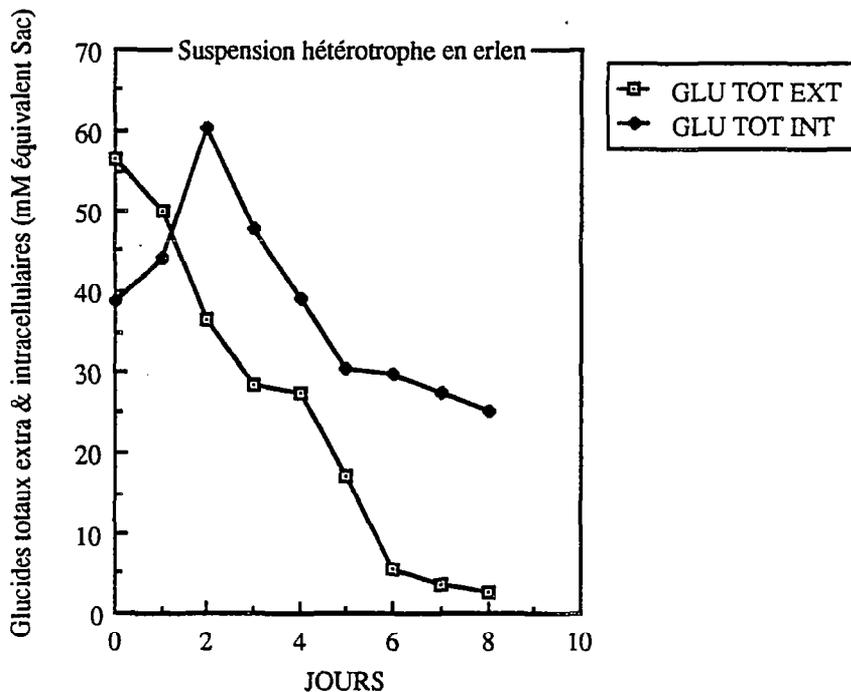
EVOLUTION DES GLUCIDES
INTRACELLULAIRES

Figure 27 :

EVOLUTION DES GLUCIDES TOTAUX INTRA
& EXTRACELLULAIRES

— La nutrition carbonée

* Glucides extracellulaires : (figure 25)

L'hydrolyse du saccharose exogène étant totale dans le milieu de culture après les 3 premiers jours de culture, la croissance s'effectue sur le mélange : glucose + fructose.

La présence de glucose et de fructose à l'ensemencement peut s'expliquer par une hydrolyse partielle du saccharose durant l'autoclavage du milieu de culture.

Le glucose et le fructose ne disparaissent jamais complètement du milieu, le glucose étant cependant consommé préférentiellement au fructose.

En fin de culture, il reste encore 5,5 mM de fructose et 2,5 mM de glucose dans le milieu. L'arrêt de la croissance ne semble donc pas directement imputable à une carence en sucres en fin de culture.

* Glucides intracellulaires : (figure 26)

Le dosage des glucides intracellulaires nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un pool interne important.

Durant les deux premiers jours de culture, le saccharose interne augmente, et passe de 22,5 mM à 31,5 mM. Il est ensuite rapidement métabolisé lors de la phase exponentielle de croissance, et sa teneur en fin de cycle est encore de 15 mM.

Le glucose et le fructose internes évoluent concomitamment au saccharose, un pic d'accumulation transitoire est observable au 2^{ème} jour de culture, ces monosides sont ensuite métabolisés. Le glucose semble être accumulé préférentiellement au fructose, ce dernier étant peut-être plus rapidement métabolisé.

La teneur résiduelle en glucose en fin de culture est de 15,4 mM et en fructose de 10,1mM.

En fin de phase exponentielle, il demeure encore dans le milieu de culture une concentration en glucides intracellulaires de 27,5 mM (en équivalent saccharose) contre 35,25 mM en début de culture.

La figure 27 rend compte de l'évolution des glucides totaux externes et cellulaires exprimés en équivalent saccharose. Un flux important d'entrée des glucides est observé durant les deux premiers jours de la culture, suivi par une consommation rapide de ces éléments jusqu'au 5^{ème} jour. Cette teneur intracellulaire en sucres se stabilise ensuite autour d'une valeur assez proche de celle de l'ensemencement (30 mM).

Figure 28 :

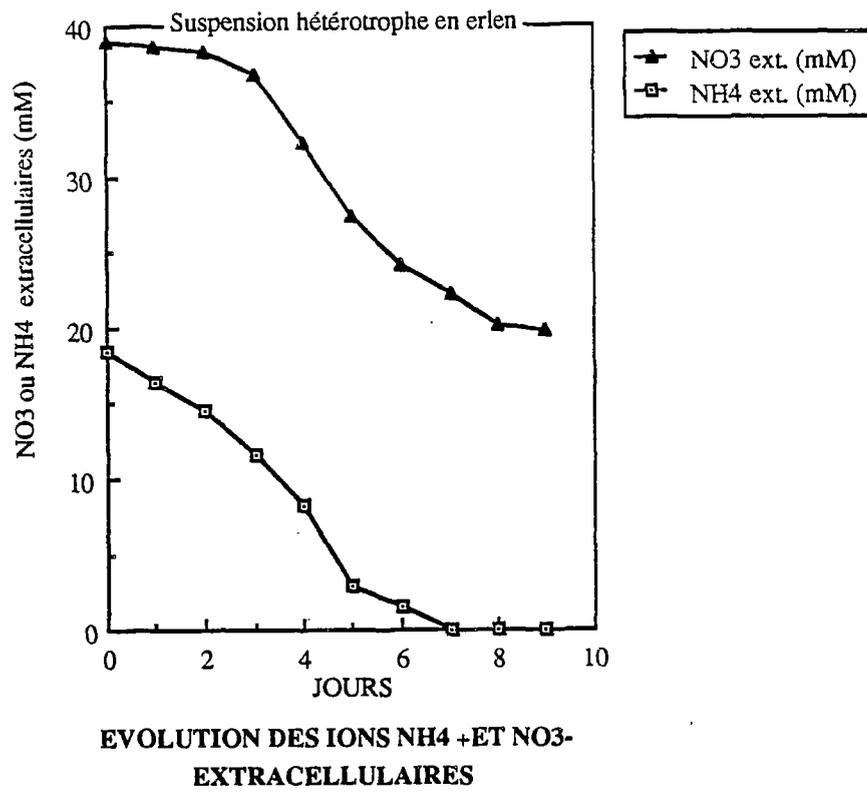
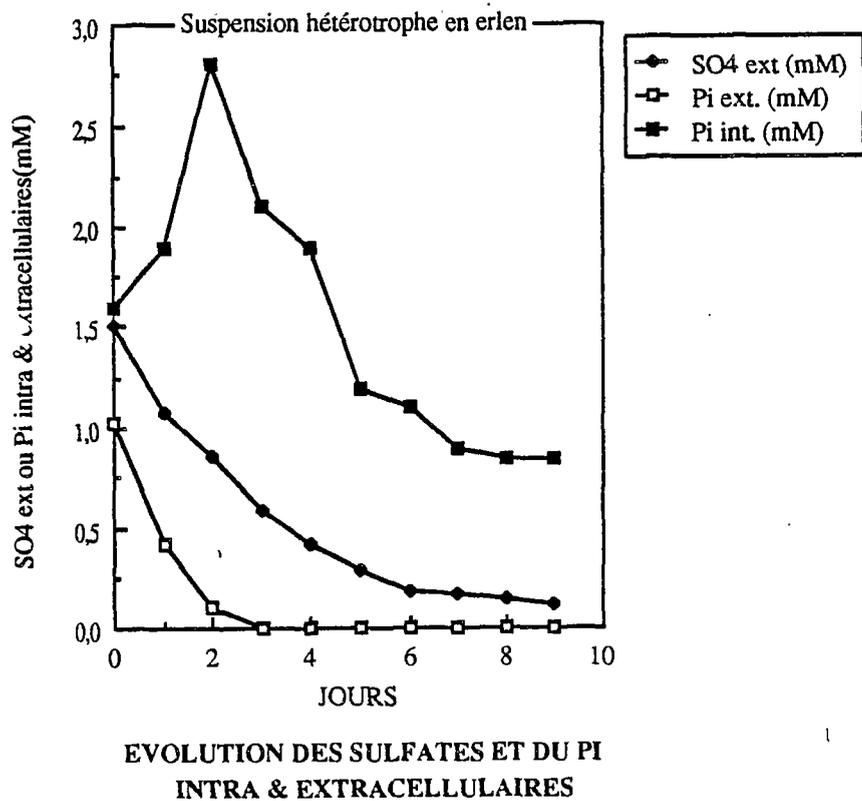


Figure 29 :



Les glucides extracellulaires totaux sont assimilés régulièrement au cours de la croissance jusqu'au 6^{ème} jour de culture. Il reste environs 3 mM de glucides totaux dans le milieu lors de l'arrêt de la croissance.

— Les éléments minéraux

* Les ions NH_4^+ sont absorbés en 7 jours (consommation un peu plus ralentie entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour de culture) (figure 28)

Le dosage des ions ammoniums intracellulaires n'a pas été effectué.

* En revanche, les ions nitrates sont assimilés beaucoup plus lentement et il reste encore 20 mM de nitrates en fin de culture, soit un peu plus du tiers de la concentration à l'ensemencement (figure 28).

* Les sulfates ne disparaissent pas totalement du milieu. La teneur résiduelle en sulfates en fin de culture est de 0,1 mM contre 1,5 mM à l'ensemencement (figure 29).

* Le phosphore inorganique est absorbé très rapidement (en deux jours de culture). Il n'est plus dosable dans le milieu dès le 2^{ème} jour de culture (figure 29).

Le dosage intracellulaire de ces ions nous a permis de constater une accumulation transitoire de ces ions durant les premiers jours de culture (6,9 mM contre 3,25 mM à l'ensemencement), diminuant ensuite très rapidement et atteignant un minimum (2,83 mM) lors de l'arrêt de la croissance.

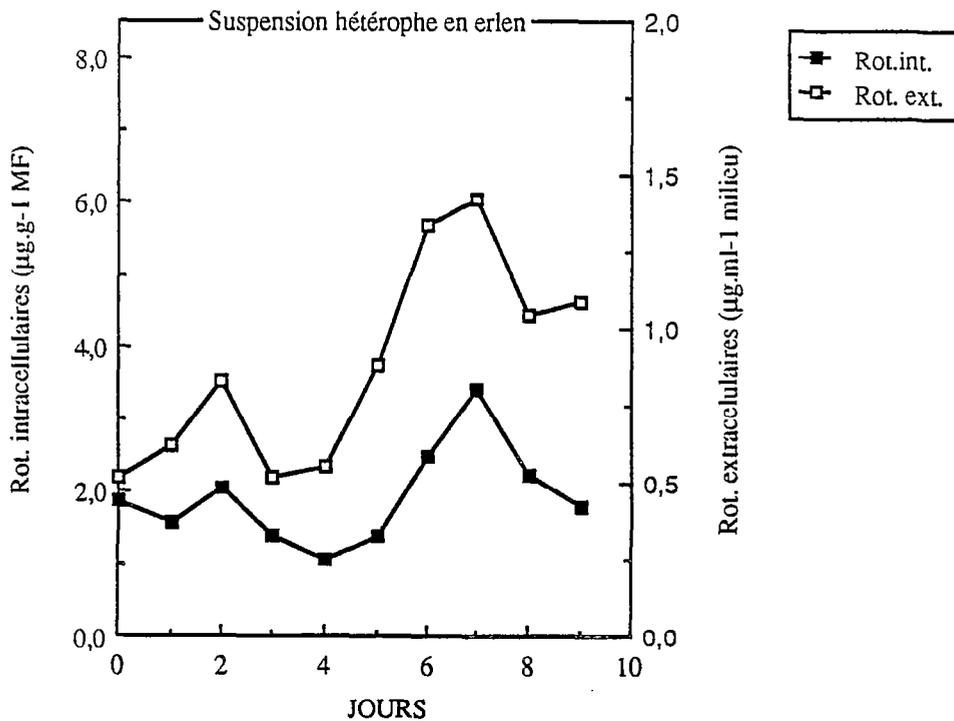
— Evolution des roténoïdes : (figure 30)

Les dosages HPLC effectués sur des échantillons prélevés chaque jour (à la fois sur le milieu et les cellules) révèlent la présence de plusieurs roténoïdes : dégueline, téphrosine, et roténone. La proportion de chacun de ces composés est similaire à celle observée dans les feuilles : le roténoïde majoritaire est la dégueline, suivi de la téphrosine et de la roténone, dont les faibles teneurs ne nous permettent pas toujours de la détecter dans le matériel végétal.

Remarque :

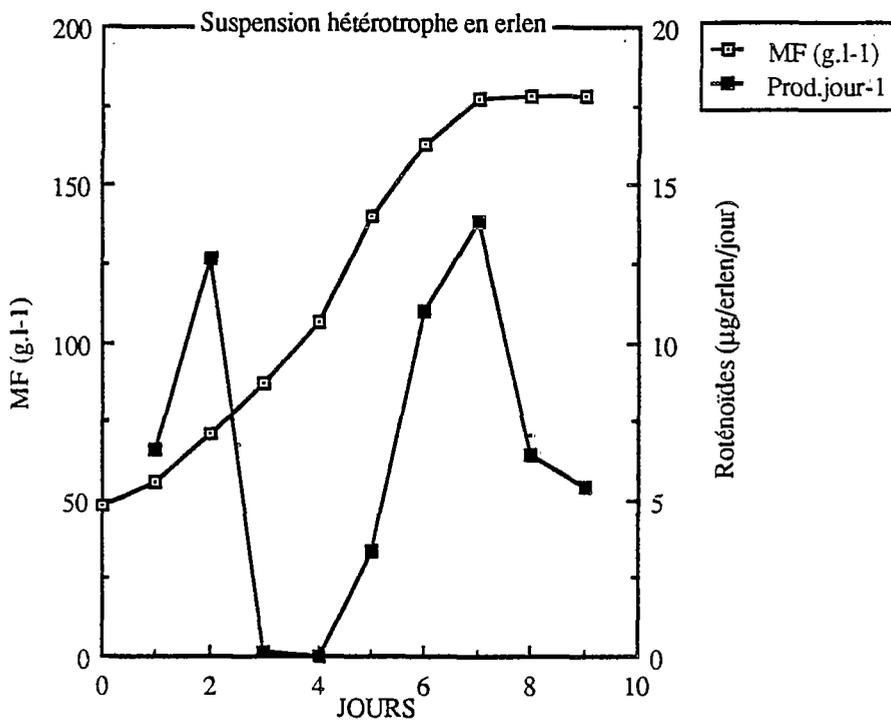
Après extractions et dosages, des roténoïdes ont été détectés à la fois dans les cellules et le milieu de culture. Aussi, avec le souci d'homogénéiser nos résultats, nous avons exprimé les teneurs intracellulaires en roténoïdes en $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF et les concentrations extracellulaires en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de milieu. En effet, les roténoïdes étant très probablement stockés dans la vacuole comme de nombreux flavonoïdes ou

Figure 30 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOÏDES

Figure 31 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTIVITE

phénylpropanoïdes (STAFFORD, 1981 ; GUERN et al., 1987), il nous semble plus judicieux d'exprimer les concentrations par rapport à la masse fraîche comme, RENAUDIN le fait pour l'étude de la compartimentation des alcaloïdes chez *Catharanthus roseus* (RENAUDIN, 1982).

Les roténoïdes totaux (intra et extracellulaires) seront exprimés en $\mu\text{g l}^{-1}$.

* Roténoïdes intracellulaires :

Durant les quatre premiers jours de culture la teneur en roténoïdes a tendance à diminuer à l'exception du deuxième jour, où l'on note un petit pic de production. Dès le 4^{ème} jour s'amorce le début d'un pic de production dont le maximum est atteint au 7^{ème} jour de culture, en fin de phase exponentielle. Le maximum obtenu en roténoïdes totaux est de $3,42 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF contre $1,84 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF à l'ensemencement. Cette concentration en roténoïdes diminue sensiblement lors du 8^{ème} et 9^{ème} jour de culture ($1,59 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF).

* Roténoïdes extracellulaires :

Les roténoïdes retrouvés dans le milieu de culture présentent une cinétique d'apparition identique à celle observée dans les cellules.

Le maximum de production est obtenu après 7 jours de culture : $1,42 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de milieu contre $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de milieu à l'ensemencement. Lors du 8^{ème} et 9^{ème} jour de culture cette teneur diminue jusqu'à une valeur de : $1,09 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de milieu.

b) Souche photomixotrophe

Les résultats présentés correspondent à des manipulations ayant été réalisées trois fois en quelques mois d'intervalle.

— Evolution de la croissance et du pH extracellulaire:

L'évolution de la biomasse en fonction du temps peut se décomposer en :

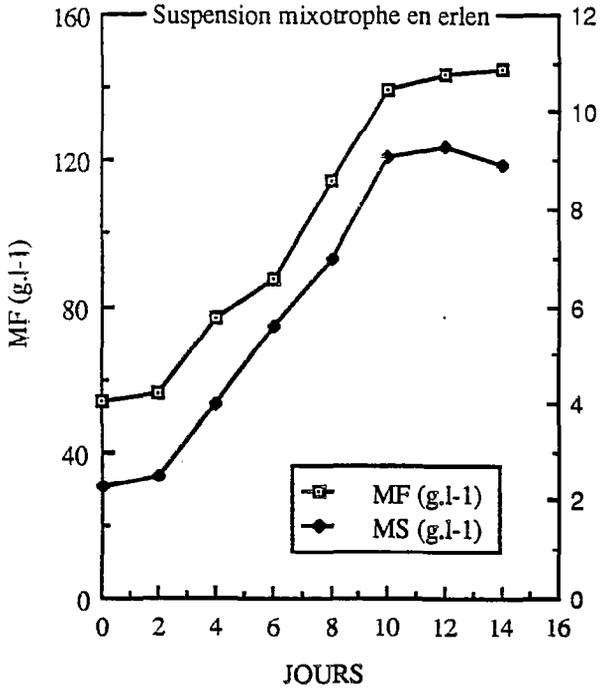
- une phase de latence de 2 jours,
- une phase exponentielle d'une durée de 7 jours au cours de laquelle la population cellulaire a été multipliée par 3 (figure 32). La courbe de croissance transformée en donnée semi-logarithmique, permet d'ajuster une droite entre t_2 et t_{10} , dont l'équation est :

$$Y = 0,11 X + 2,32 \quad (\rho = 0,99) \quad \text{avec un } T_d = 56 \text{ heures.}$$

- une phase stationnaire de croissance de 4 jours.

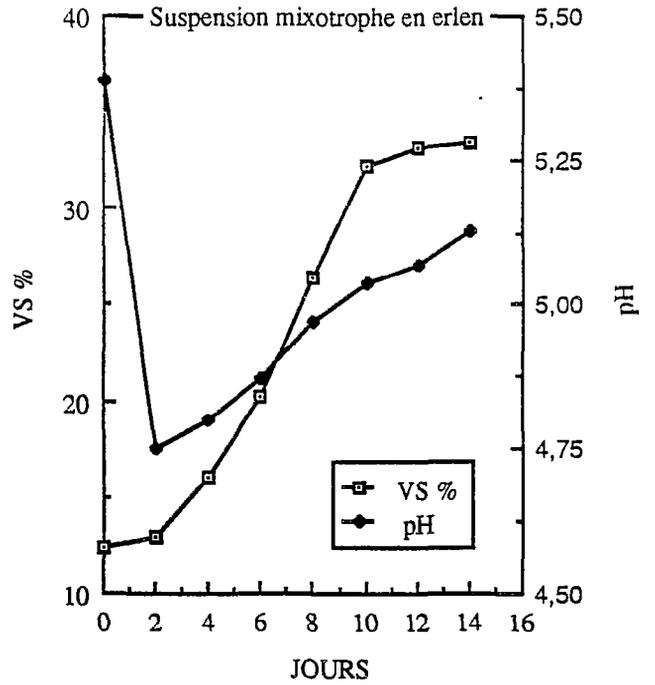
Durant la phase de latence, la masse sèche reste constante. Elle augmente ensuite

Figure 32 :



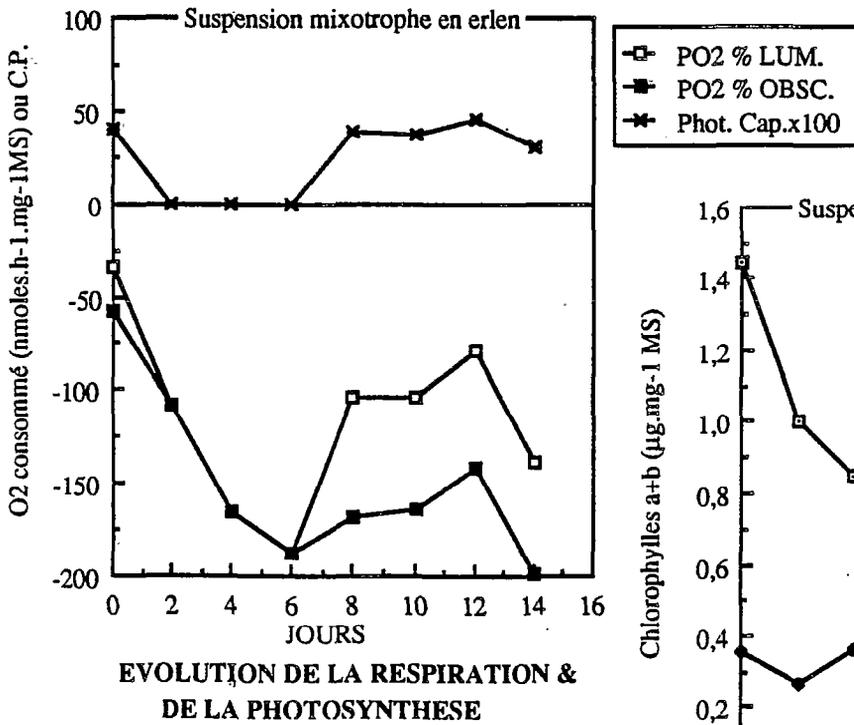
EVOLUTION DE LA BIOMASSE

Figure 33 :



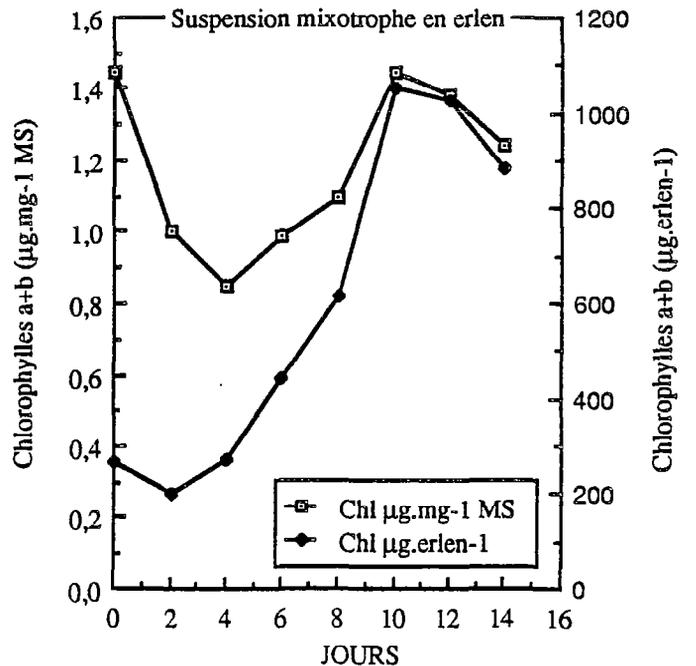
EVOLUTION DE LA CROISSANCE & DU PH

Figure 34 :



EVOLUTION DE LA RESPIRATION & DE LA PHOTOSYNTHESE

Figure 35 :



EVOLUTION DES CHLOROPHYLLES TOTALES

régulièrement pour se stabiliser entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour et finalement décroître, ce qui correspond probablement au début de la lyse cellulaire.

Entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour de culture, la matière fraîche atteint un plateau.

Le maximum de biomasse produite est de 145 g de MF.l⁻¹ de suspensions et de 9,3 g de MS.l⁻¹ de suspensions. La MF est donc multipliée par 4 alors que la MS est seulement multipliée par 2,7.

Le pH du milieu de culture s'acidifie tout au long de la phase de latence et le début de la phase stationnaire (figure 33). Il passe d'une valeur de 5,25 à t_0 à une valeur de 4,25 à t_{+2} . Il s'alcalinise ensuite lentement durant la phase exponentielle et la phase stationnaire pour atteindre la valeur de 5,0.

— Evolution des échanges gazeux et de la teneur en chlorophylles

(a+b):

* Respiration à l'obscurité

L'évolution de l'intensité respiratoire des cellules au cours de la culture est rapportée sur la figure 34.

Dès le premier jour de culture, on observe une augmentation drastique de l'intensité respiratoire. En effet, elle passe d'une valeur de 60 nmoles O₂.min⁻¹.mg⁻¹ MS à 110 nmoles O₂.min⁻¹.mg⁻¹ MS en deux jours. La respiration cellulaire est maximale au 6^{ème} jour de culture (180 nmoles O₂.min⁻¹.mg⁻¹ MS), elle diminue ensuite sensiblement entre le 6^{ème} et le 12^{ème} jour de culture.

La respiration cellulaire augmente à nouveau en pleine phase stationnaire après 12 jours de culture atteignant 200 nmoles O₂.min⁻¹.mg⁻¹ MS.

* Respiration à la lumière

A l'ensemencement, la respiration à la lumière est plus faible que la respiration à l'obscurité (30 nmoles O₂.min⁻¹.mg⁻¹ MS), ce qui traduit une activité photosynthétisante (figure 34). Après deux jours de culture, l'intensité respiratoire est la même à la lumière qu'à l'obscurité. Au 6^{ème} jour, elle diminue régulièrement et se stabilise autour de la valeur

Figure 36 :

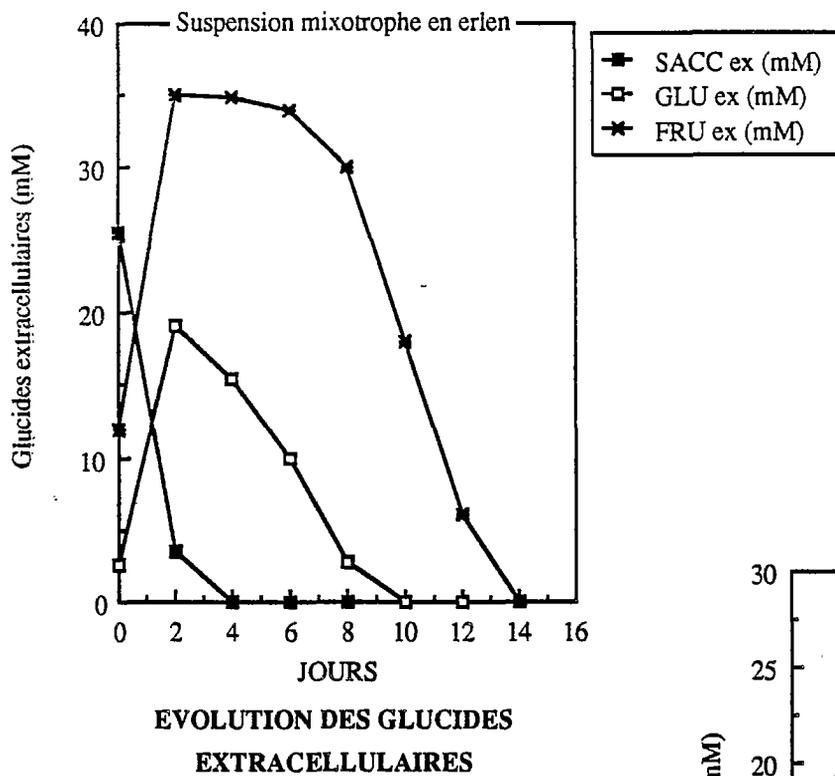


Figure 37 :

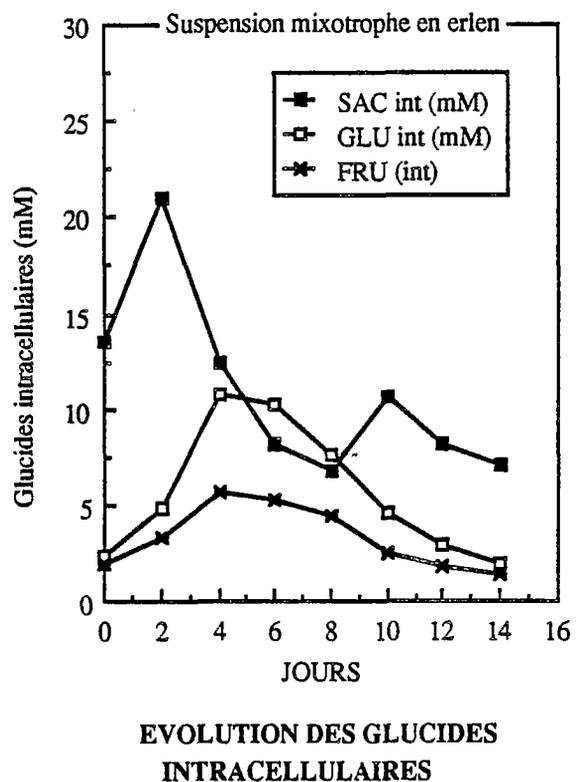
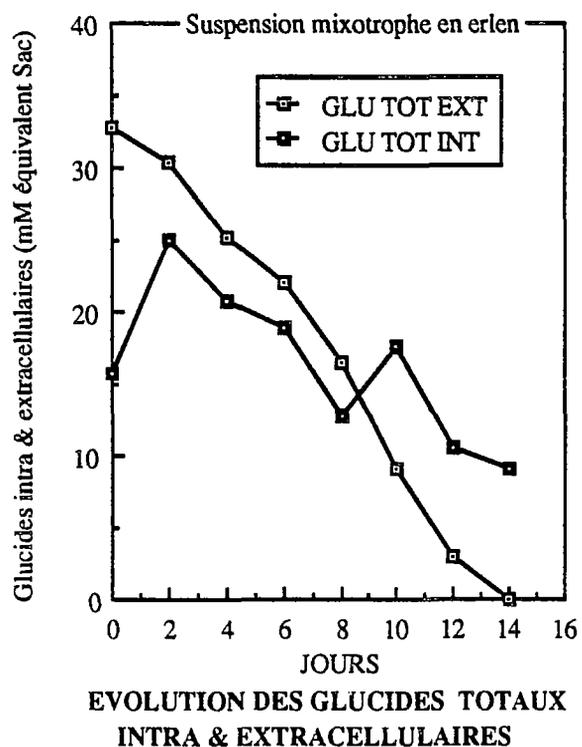


Figure 38 :



de 100 nmoles $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS.

Au cours de cette manipulation nous n'avons pas pu mesurer de photosynthèse nette. Par contre M. F. TROUSLOT, sur cette même souche photomixotrophe a pu mesurer une photosynthèse nette positive au cours d'autres manipulations (TROUSLOT M. F., communication personnelle).

La capacité photosynthétique est de 0,5 lors de l'ensemencement et ne recouvre cette valeur qu'en fin de culture. Cette faible valeur inférieure à 1, ne permet pas de préjuger de la potentialité photoautotrophe de cette culture.

* La teneur en chlorophylles (a+b): (figure 35)

Pendant les quatre premiers jours de culture, correspondant à la phase de latence et le début de la phase exponentielle de croissance, la teneur en chlorophylles (a+b) exprimée en $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS diminue pratiquement de moitié.

La synthèse chlorophyllienne reprend ensuite très activement jusqu'au début de la phase stationnaire. En fin de cycle, la chlorophylle commence à se dégrader, et sa teneur diminue sensiblement ($1,25 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ MS), correspondant au début d'un état senescent. Cette expression de la teneur en pigment reflète plus précisément l'intensité de la chlorophyllogénèse.

Par contre, si l'on considère la concentration en chlorophylles totales par erlen, expression tenant compte de la biomasse et donc de la croissance, une toute autre évolution est mise en évidence. La teneur en chlorophylles est peu modifiée durant les quatre premiers jours de culture puis augmente régulièrement jusqu'au 10^{ème} jour de culture correspondant à la fin de la phase exponentielle. Elle chute ensuite lors de la phase stationnaire de croissance.

— Evolution des nutriments carbonés

* Glucides extracellulaires: (figure 36)

Les résultats montrent une hydrolyse rapide et complète du saccharose lors des quatre premiers jours de culture comme chez les suspensions hétérotrophes.

Le glucose et le fructose formés ont totalement disparu du milieu, respectivement au 10^{ème} et au 14^{ème} jour de culture, le glucose étant utilisé préférentiellement au fructose.

Figure 39 :

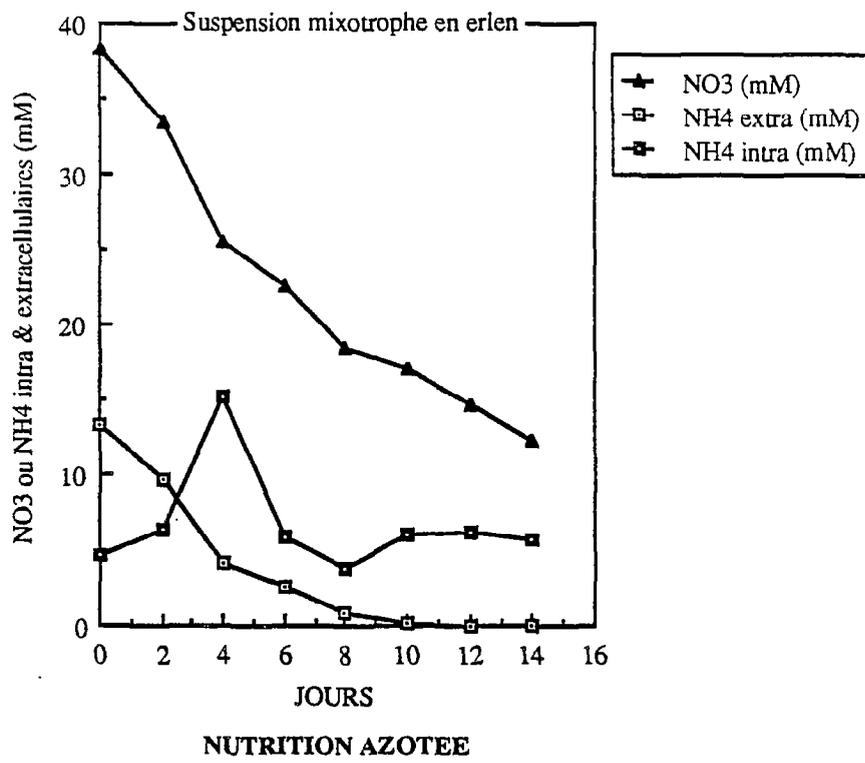
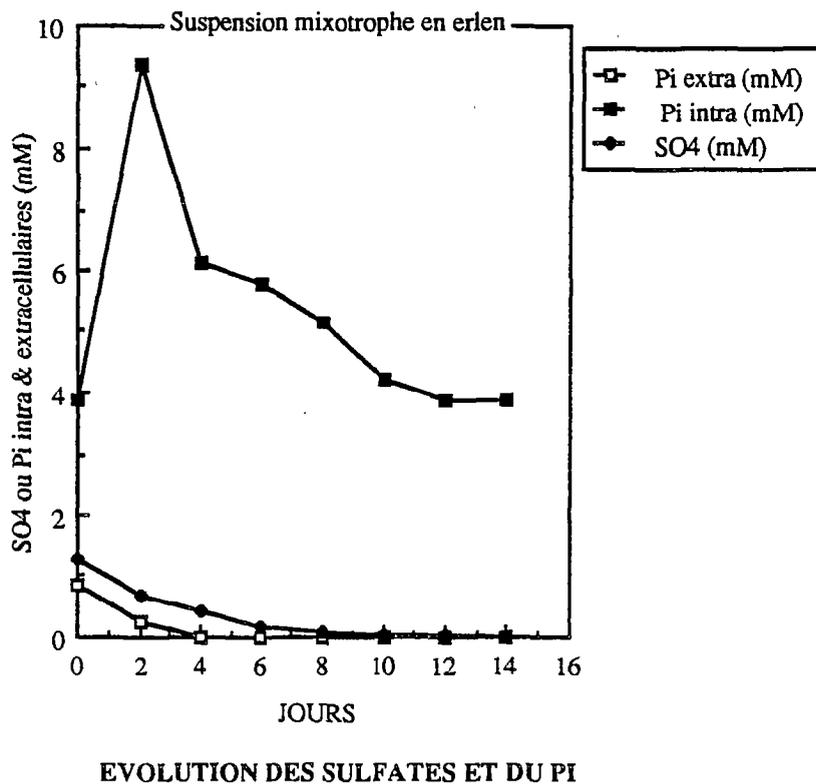


Figure 40 :



* *Glucides intracellulaires : (figure 37)*

Durant les quatre premiers jours de culture (correspondant à l'hydrolyse totale du saccharose dans le milieu) on note une augmentation du pool interne de saccharose (celui-ci doublant pratiquement). Cette teneur diminue ensuite lentement au cours de la culture. Il reste encore 7 mM de saccharose durant la phase stationnaire de croissance.

Le glucose est stocké préférentiellement au fructose. Le glucose et le fructose ne sont pas totalement épuisés en fin de culture, on retrouve en effet environ 2 mM de glucose et de fructose. La teneur résiduelle en glucides (en équivalent saccharose), en fin de cycle, est de 9,5 mM.

L'évolution comparée des glucides totaux intra et extracellulaires (figure 38) permet de mettre en évidence les faits suivants :

* les glucides intracellulaires sont consommés de façon régulière au cours de la culture jusqu'au 14^{ème} jour.

* l'entrée des glucides s'effectue essentiellement durant les deux premiers jours de culture. Ce pool interne est ensuite rapidement métabolisé, il reste 10 mM de glucides totaux (exprimés en équivalent saccharose) lors de l'arrêt de la croissance.

— *Les éléments minéraux :*

* Les ions ammoniums sont assimilés régulièrement au cours de la croissance ; ils ont totalement disparu du milieu de culture au 10^{ème} jour, ce qui coïncide avec l'arrêt de croissance des suspensions cellulaires photomixotrophes (figure 39).

Un dosage intracellulaire des ions ammoniums s'est donc révélé indispensable. On observe alors un pic d'incorporation de l'ammonium au 4^{ème} jour de culture, en pleine phase exponentielle.

Ce pool intracellulaire diminue ensuite progressivement au cours du temps, pour se stabiliser autour de 5 mM au 14^{ème} jour de culture.

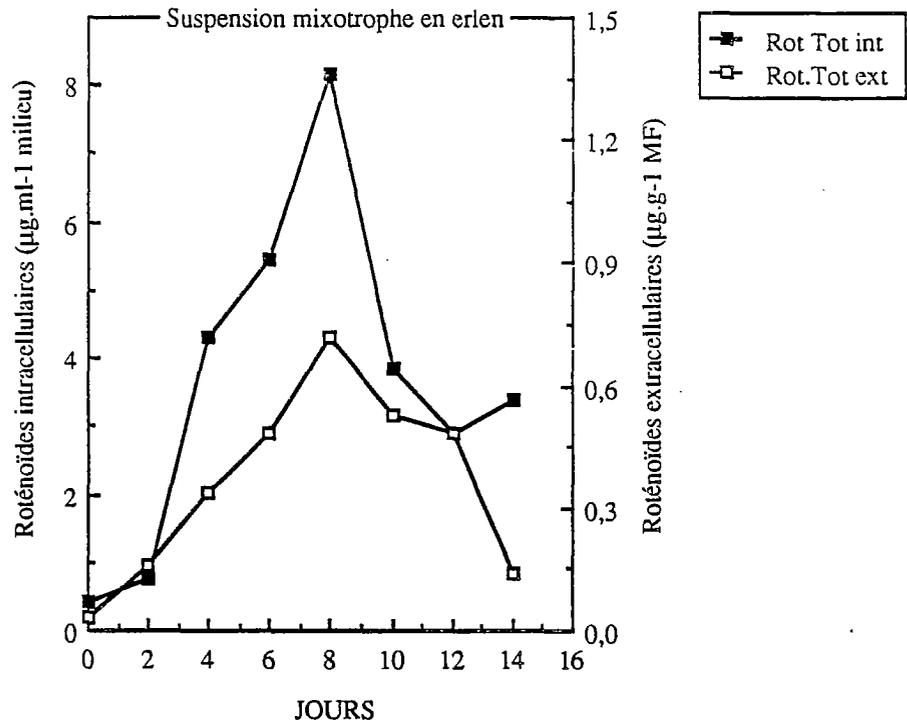
Les ions ammoniums ne paraissent donc pas être limitants pour la croissance.

* Les nitrates ne sont pas totalement assimilés. La teneur résiduelle en nitrates dans le milieu est encore de 12,3 mM en fin de culture (figure 39).

* Les ions sulfates sont progressivement absorbés pendant la phase de croissance. Ils ne sont plus dosables au 10^{ème} jour de culture (figure 40).

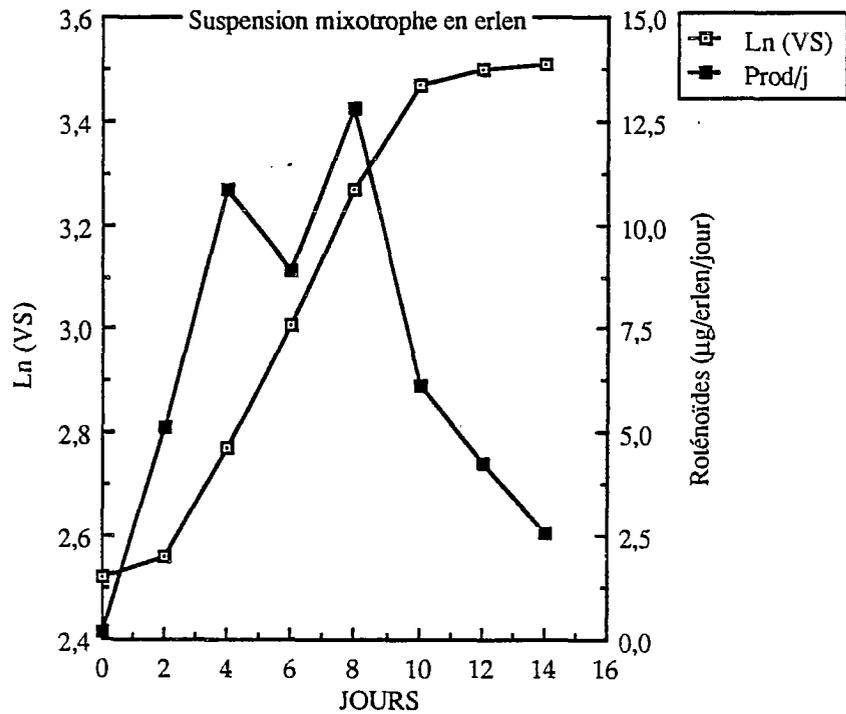
* Par contre, le phosphore inorganique est très vite absorbé, il a totalement disparu

Figure 41 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES

Figure 42 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTIVITE

du milieu au 4^{ème} jour de culture (figure 40).

Le dosage du phosphore inorganique intracellulaire permet de mettre en évidence l'existence d'un pool interne important, avec une teneur moyenne de 4 mM (à l'ensemencement comme en fin de culture) et l'existence d'un pic d'incorporation transitoire important (9,3 mM) en début de culture, coïncidant avec la disparition du Pi du milieu.

— Evolution des roténoïdes : (figure 41)

* Roténoïdes intracellulaires

Les principaux roténoïdes retrouvés dans les cellules sont les suivants : roténone, dégueline, téphrosine (par ordre de concentration décroissante) ce qui diffère des suspensions hétérotrophes.

On observe un maximum de production de roténoïdes lors du 8^{ème} jour de culture, en milieu de phase exponentielle (8,17 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF contre 0,43 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF). Cette accumulation conséquente diminue ensuite très rapidement, et reste relativement stable jusqu'au 14^{ème} jour de culture avec une teneur en roténoïdes totaux de l'ordre de 3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF.

La roténone représente environ 64 % des roténoïdes totaux, et suit le même type de cinétique d'apparition que l'ensemble des roténoïdes au cours de la croissance.

* Roténoïdes extracellulaires

On observe une évolution et une répartition des roténoïdes extracellulaires similaires à celles décrites pour les roténoïdes intracellulaires.

- la courbe de production des roténoïdes extracellulaires suit la croissance
- le maximum d'accumulation de roténoïdes est atteint au 8^{ème} jour de culture (0,72 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ milieu)
- un déclin de la production est observé durant la phase stationnaire.

4) Discussion-Comparaison

a) Croissance et métabolisme

— Croissance :

L'existence d'un temps de latence (2 jours pour les cellules photomixotrophes et 1

jour pour les cellules hétérotrophes), est probablement liée au fait que les cultures ont été ensemencées par des suspensions cellulaires ayant déjà atteint la phase stationnaire.

Le facteur de multiplication de la biomasse est de 3,84 pour la souche hétérotrophe et de 2,7 pour la souche photomixotrophe. Une meilleure croissance est donc obtenue pour la souche hétérotrophe dont le milieu de culture, rappelons-le, est plus riche en saccharose : 58,6 mM contre 44 mM.

Il est également intéressant de constater que le pourcentage en masse sèche (par rapport à la masse fraîche) des cellules hétérotrophes est, dans nos résultats, inférieur à celui des cellules chlorophylliennes (6 à 8 % contre 9 à 11 %). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur des suspensions cellulaires d'*Abrus precatorius* où le pourcentage en matière sèche des cultures hétérotrophes oscille entre 10 et 15 % alors que celui des cultures photomixotrophes est inférieur à 10 % (HARDY-CLARIS, 1988). De même, la teneur en matière sèche pour des suspensions cellulaires d'*Acer pseudoplatanus* cultivées à l'obscurité est de 8 à 12 % (GUERN, 1979 ; JULIEN, 1985).

__pH extracellulaire :

Le pH initial des cultures est acide. Le passage à l'autoclave provoque généralement une acidification de l'ordre de 0,5 unités pH. Pendant le cycle de culture les valeurs du pH varient considérablement car les milieux de culture sont peu tamponnés.

Le pH du milieu de culture, quelque soit la souche, s'acidifie durant la phase de latence et le début de la phase exponentielle, puis s'élève progressivement jusqu'à une valeur supérieure à 5,0 en fin de culture.

D'après la bibliographie (LEGUAY, 1979 ; NEF, 1983 ; JULIEN, 1985) et suivant nos résultats, l'interprétation que l'on peut proposer est la suivante :

- l'acidification du milieu serait consécutive à une augmentation de la pression partielle en CO₂ dans l'atmosphère de l'erlen de culture d'une part, et d'autre part à une consommation plus importante des ions NH₄⁺ que des ions NO₃⁻, aboutissant globalement à une extrusion de protons.

- l'alcalinisation relative du milieu en fin de croissance proviendrait en l'absence d'NH₄⁺ de l'assimilation des nitrates se traduisant par une absorption de protons et une extrusion de OH⁻.

— *Evolution de la teneur en chlorophylles (Suspension mixotrophe)*

Au cours des quatre premiers jours de culture, on observe une croissance active et par contre une chlorophyllogénèse faible. Cet antagonisme a déjà été noté par de nombreux auteurs (DALTON et STREET, 1976 ; NATO *et al.*, 1977).

De plus, lors du repiquage, les cellules sont mises en présence d'une teneur en sucre importante qui limite la chlorophyllogénèse. Ce rôle inhibiteur du saccharose sur la chlorophyllogénèse a déjà été étudié par plusieurs auteurs (KAUL et SABHARWAHL, 1971 ; NEUMANN et RAAFAT, 1973 ; YAMADA et SATO, 1978 et HARDY, 1984).

— *Nutrition carbonée*

Le saccharose est totalement hydrolysé en moins de quatre jours, aussi bien dans les cultures hétérotrophes que dans les cultures photomixotrophes.

Cette hydrolyse du saccharose a été également observée dans des cultures cellulaires de carotte (UEDA *et al.*, 1974 et KANABUS *et al.*, 1986), de canne à sucre (THOM *et al.*, 1981), des tissus de betterave à sucre (ZAMSKI et WYSE, 1985) et d'autres cultures (FOWLER et STEPHAN-SARKISSIAN, 1985). Ces observations impliquent la présence d'une invertase au niveau de la paroi cellulaire ou encore que la cellule sécrète une invertase dans le milieu de culture (AMINO et TAZAWA, 1988).

L'acidification du milieu, en début de culture, pourrait promouvoir cette hydrolyse du saccharose par une invertase dont le pH optimum est généralement acide (COPPING et STREET, 1972).

Alors qu'après hydrolyse du saccharose, une même teneur en glucose et en fructose est disponible dans le milieu, nous avons pu observer quelle que soit la souche, une consommation préférentielle du glucose par rapport au fructose.

Cependant, lors de la disparition totale du glucose, la croissance et la production sont maintenues par la seule présence du fructose. Cette consommation préférentielle du glucose a déjà été obtenue par KATOH *et al.*, (1979), sur des cultures de tabac ; par MERILLON *et al.*, 1983, sur des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* et également par DRAPEAU *et al.*, (1986a), dans des cultures en batch de *Dioscorea deltoidea*.

Le dosage des glucides intracellulaires nous a permis de mettre en évidence la présence d'un pool interne relativement important de saccharose, glucose et fructose dont

la concentration totale en fin de culture est de 9 mM pour la souche photomixotrophe et de 27,5 mM pour la souche hétérotrophe (valeurs exprimées en équivalent saccharose).

La concentration en glucides ne peut donc pas être considérée comme facteur limitant de la croissance dans les suspensions cellulaires hétérotrophes, ni dans les suspensions photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*, à moins qu'il existe une concentration seuil d'utilisation des glucides par rapport au stockage intracellulaire.

Les suspensions hétérotrophes accumulent en moyenne deux à trois fois plus de sucre que les suspensions mixotrophes.

— Eléments minéraux :

Rappel : La concentration en ions du milieu Murashige et Skoog est la suivante :

<i>Pi</i>	1,25 mM
<i>SO₄^{- -}</i>	1,5 mM
<i>NH₄⁺</i>	20,6 mM
<i>NO₃⁻</i>	39,41 mM

- Le phosphore inorganique (*Pi*) est le premier élément à disparaître du milieu de culture : au 3^{ème} jour (pour les cultures hétérotrophes), et au 4^{ème} jour (pour les cultures photomixotrophes). Il n'est donc pas limitant pour la croissance. Ceci est en accord avec les observations faites par MERILLON *et al.*, 1983 sur *Catharanthus roseus* et HENRY *et al.*, 1981 sur *Saponaria ocymoides*.

Ce composé qui régule bon nombre d'activités enzymatiques (SAVANT *et al.*, 1982) peut également inhiber l'accumulation de métabolites secondaires (BALAGUE et WILSON, 1982 ; KNOBLOCH et BERLIN, 1983).

La synthèse de nombreux composés phénoliques *in vitro* est limitée en présence de phosphate. Ainsi, l'accumulation de coumarines dans des cultures cellulaires de tabac (OKAZAKI *et al.*, 1982), d'acide rosmarinique dans des suspensions cellulaires de *Anchusa officinalis* (DE-EKNAMBUL et ELLIS, 1985b) mais aussi d'anthocyanines dans des cultures cellulaires de *Catharanthus roseus* (KNOBLOCH *et al.*, 1982) et de *Vitis* (YAMAKAWA *et al.*, 1983), est inhibée en présence de cet élément.

Par contre, certaines cultures cellulaires, telle que *Coleus blumei*, peuvent voir leur production d'anthraquinones stimulée par de fortes teneurs en phosphate (ZENK *et al.*,

1975).

De ce fait, de nombreux milieux de production mis au point notamment pour la biosynthèse d'alcaloïdes dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* (ZENK *et al.*, 1977), ou encore pour la production de composés phénoliques et d'alcaloïdes sur ce même matériel (KNOBLOCH et BERLIN, 1983), sont dépourvus ou pauvres en phosphates.

Le dosage intracellulaire du Pi dans les deux souches, nous a permis de constater une accumulation de ces ions durant les premiers jours de culture, ce pool diminuant ensuite, le Pi étant rapidement mobilisé pour le fonctionnement du métabolisme sous forme organique. Il reste encore 4 mM de Pi en fin de culture. La concentration de ces ions ne paraît donc pas être limitante pour la croissance.

- En ce qui concerne la nutrition azotée, les ions ammoniums sont consommés préférentiellement aux ions nitrates dont la teneur résiduelle dans le milieu, en fin de culture est encore de 12 mM pour la souche photomixotrophe et de 20 mM pour la souche hétérotrophe. Ceci a déjà été observé par MERILLON *et al.*, (1983) et MAC CARTHY *et al.*, (1980) sur des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*.

Cette consommation préférentielle peut être mise en relation avec le fait que l'incorporation de l'azote par l'organisme végétal sous forme NH_4^+ nécessite moins d'énergie que l'incorporation sous forme NO_3^- (SALSAC *et al.*, 1987).

Il existe une relation étroite entre l'arrêt de la croissance et la disparition des ions ammoniums du milieu de culture.

Cependant la présence de 5 mM de NH_4^+ intracellulaire en fin de culture dans les suspensions cellulaires photomixotrophes, ne nous permet pas de considérer cet élément comme facteur limitant la croissance.

b) Evolution de la production de roténoïdes

roténoïdes intracellulaires :

On observe une évolution assez similaire de la production intracellulaire de roténoïdes chez les cellules hétérotrophes et photomixotrophes au cours de la croissance.

Toutefois, la production de roténoïdes dans la souche chlorophyllienne est réalisée

beaucoup plus tôt, en pleine phase exponentielle.

De plus, on peut noter des différences tant du point de vue qualitatif que quantitatif, sur la production de roténoïdes par des suspensions cellulaires de *Tephrosia vogelii* cultivées dans deux conditions différentes.

* Les souches maintenues à l'obscurité synthétisent l'ensemble des roténoïdes dosés dans les feuilles, avec comme constituant majeur la dégueline.

* Les souches cultivées à la lumière synthétisent également l'ensemble des roténoïdes avec cependant une proportion plus importante de roténone (65 % des roténoïdes totaux).

* La teneur maximale en roténoïdes totaux est de 8,17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF pour les suspensions cultivées à la lumière contre 3,42 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF pour les suspensions maintenues à l'obscurité, soit un peu plus du double.

Ces différences observées au niveau de la production tant du point de vue qualitatif que quantitatif sont dues :

- soit à des caractéristiques inhérentes à chaque souche,
- soit à des conditions environnementales plus favorables à l'expression du métabolisme secondaire dans le cas de la souche photomixotrophe.

Les conditions de culture des deux souches diffèrent seulement sur deux points :

- la teneur en sucres : 44 mM pour la souche mixotrophe et 58,6 mM pour la souche hétérotrophe,
- le facteur lumière.

Le rôle positif de la lumière a déjà été observé durant l'étude de la croissance et de la production de roténoïdes de *Tephrosia vogelii* sur milieu gélosé (cf. paragraphe A).

Il est maintenant reconnu que la production de composés phénoliques *in vitro* est largement influencée à la fois par la qualité et l'intensité de la lumière.

A l'exception d'une lignée cellulaire de carotte qui synthétise des anthocyanines à l'obscurité (OZEKI et KOMAMINE, 1981), la lumière blanche, dans bien des cas, induit ou stimule la formation de dérivés flavone dans des cultures cellulaires de *Citrus* et de *Petroselinum hortense* (BRUNET et IBRAHIM, 1973 ; KREUZALER et HAHLBROCK, 1973) et d'anthocyanines dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* (KNOBLOCH *et al.*, 1982).

La stimulation de la production de composés phénoliques sous l'effet de la lumière, est à relier avec son action au niveau de la régulation des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (HAHLBROCK, 1977) ; cet aspect sera discuté plus amplement dans le chapitre V concernant la PAL.

— *Roténoïdes extracellulaires :*

Les extractions et les dosages effectués sur le milieu de culture nous ont permis de mettre en évidence la présence de roténoïdes extracellulaires, aussi bien dans la souche hétérotrophe que dans la souche photomixotrophe.

Ces roténoïdes extracellulaires, dans la majorité des cas, sont identiques à ceux retrouvés dans les cellules pour la même souche.

Cette présence de roténoïdes dans le milieu de culture est un fait très intéressant, puisque l'on sait qu'un des principaux handicaps de la production de métabolites par voie biotechnologique est l'obligation de devoir "sacrifier" la biomasse lors de l'extraction.

L'accumulation de roténoïdes dans le milieu de culture, quelle que soit la souche, suit l'évolution de la cinétique d'apparition des roténoïdes dans les cellules.

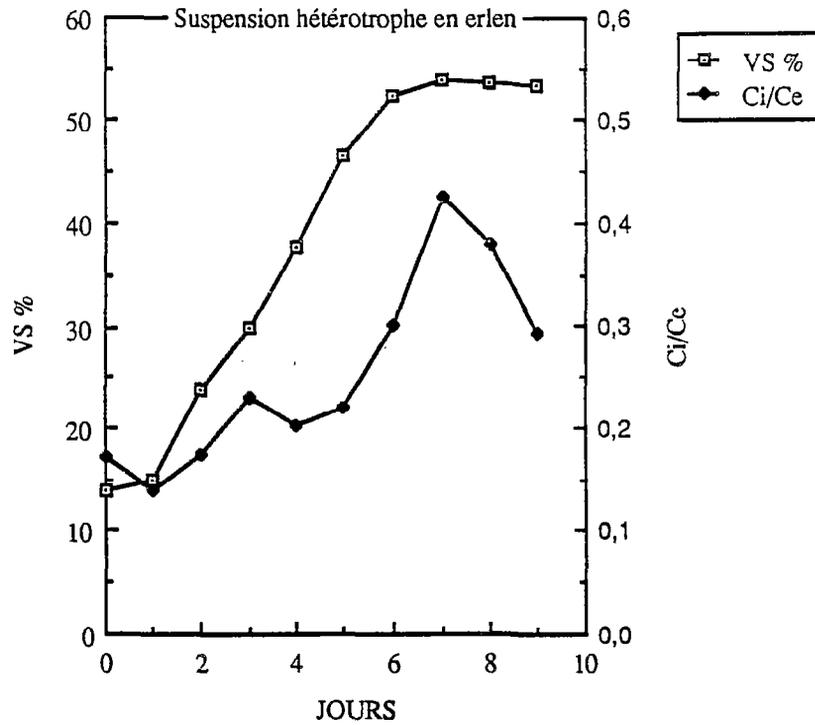
Aussi la lyse probable des cellules ne peut expliquer que partiellement la présence de roténoïdes dans le milieu.

Il y aurait donc des phénomènes de diffusion ou d'excrétion de roténoïdes des cellules vers le milieu de culture.

L'excrétion des métabolites secondaires *in vitro* est sujet à controverse depuis plusieurs années. La présence de métabolites dans le milieu de culture a d'abord été réfutée (SCOTT *et al.*, 1979) ou encore attribuée à la lyse cellulaire (HINZ et ZENK, 1981). Cependant une étude comparée de l'évolution de la mortalité cellulaire et de l'excrétion de métabolites secondaires a montré dans bien des cas que l'excrétion des composés est réellement un processus physiologique contribuant à la dynamique globale de ces métabolites (GUERN *et al.*, 1987).

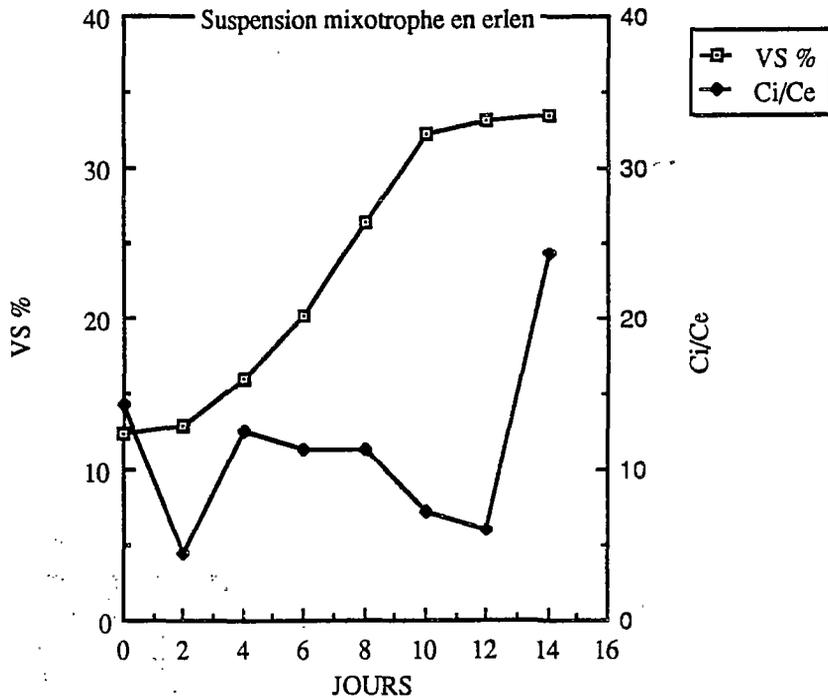
De plus certaines études montrent que les lignées cellulaires diffèrent dans leurs capacités à excréter les métabolites secondaires. C'est notamment le cas des cultures de *Catharanthus roseus* (PETIARD et COURTOIS, 1983) et des suspensions cellulaires de *Cinchona ledgeriana* où le pourcentage de métabolites excrétés peut varier de 10 à 99 % de la production totale en fonction de la variété considérée (ANDERSON *et al.*, 1982).

Figure 43 :



**EVOLUTION DES RAPPORTS DE CONCENTRATIONS
INTRA ET EXTRACELLULAIRES DE ROTENOIDES**

Figure 44 :



**EVOLUTION DES RAPPORTS DE CONCENTRATIONS
INTRA ET EXTRACELLULAIRES DE ROTENOIDES**

L'état des connaissances actuelles sur les mécanismes d'excrétion des métabolites secondaires par les cellules végétales est plutôt mince. Le terme lui-même d'excrétion est impropre puisqu'il implique l'existence d'un processus actif. Une des principales raisons de cette méprise est le manque d'étude quantitative. La simple mesure des métabolites cellulaires et de ceux retrouvés dans le milieu de culture n'apportent pas suffisamment d'information. Le rapport des concentrations intra et extracellulaires en métabolites secondaires est plus significatif. Ainsi dans les cultures cellulaires végétales de *Tephrosia vogelii*, l'accumulation de roténoïdes intracellulaires est plus importante dans les suspensions mixotrophes que dans les suspensions hétérotrophes (figures 43, 44).

Suivant le type de métabolites considérés différents modèles d'excrétion peuvent être envisagés. Ainsi, dans le cas de certains alcaloïdes apolaires, une simple diffusion des formes neutres d'alcaloïdes pourrait expliquer la distribution des alcaloïdes entre les différents compartiments (RENAUDIN et GUERN, 1982 ; NEUMANN *et al.*, 1983). Cette répartition des alcaloïdes entre cellules et milieu semble dépendre de la forme ionique de l'alcaloïde considéré et du gradient du pH existant entre le milieu intérieur et le milieu extérieur (NEF *et al.*, 1986). A l'opposé, l'existence de vésicules intracellulaires qui fusionnent avec le plasmalemme et déchargent leur contenu à l'extérieur de la cellule (phénomène d'exocytose) a été décrit dans certains cas (GUERN *et al.*, 1987).

Dans le cas de *Tephrosia vogelii*, il ne nous est pas possible dans l'état actuel des recherches de proposer un processus spécifique d'excrétion des roténoïdes.

Cependant l'influence de l'évolution du pH de la culture sur la répartition des roténoïdes entre cellules et milieu devrait nous apprendre beaucoup à ce sujet.

Aussi serait-il intéressant de cultiver des suspensions cellulaires sur des milieux de culture tamponnés, à des pH différents, et d'étudier la cinétique d'apparition des roténoïdes dans les cellules et leur répartition entre cellules et milieu. Ce type d'expérimentation a déjà été réalisé par NEF *et al.*, (1986) sur des cultures cellulaires de *Catharanthus roseus*. Il est toutefois important de noter à ce propos que les roténoïdes ne sont pas des molécules chargées, contrairement aux alcaloïdes.

Une teneur plus importante de roténoïdes dans le milieu est retrouvée chez les cultures hétérotrophes (maximum 1,42 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ milieu) que chez les cultures photomixotrophes (maximum 0,72 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ milieu), à l'inverse de l'accumulation intracellulaire.

Ce résultat intéressant est peut-être à relier avec le fait que les roténoïdes, rappelons le, sont des composés sensibles à la lumière, une possible dégradation de ceux-ci n'est donc pas à négliger. Afin de vérifier cette hypothèse, la souche hétérotrophe sera cultivée dans un premier temps à l'obscurité puis à la lumière. Les résultats de cette expérimentation seront donnés dans le paragraphe C.

— Production totale de roténoïdes :

Du point de vue du bilan de la production totale de roténoïdes par une souche β hétérotrophe et une souche photomixotrophe, nous pouvons conclure que l'accumulation de roténoïdes s'effectue simultanément à la croissance. Ainsi, le maximum de production est obtenu durant la phase exponentielle ou encore en début de la phase stationnaire.

Ce mode de production a déjà été décrit, notamment dans les suspensions cellulaires de *Phytolacca americana* accumulant des bétacyanines (SAKUTA *et al.*, 1986), et chez de nombreuses *Solanaceae* synthétisant des alcaloïdes du type tropane (TABATA *et al.*, 1971b), dans des cultures cellulaires de *Morinda citrifolia* (ZENK *et al.*, 1975) et de *Galium mollugo* (WILSON et BALAGUE, 1985) produisant des anthraquinones .

La production totale de roténoïdes (cellules + milieu) calculée par erlens, est de 106,14 $\mu\text{g/erlen}$ chez la souche photomixotrophe au 8^{ème} jour de culture, et de 145 $\mu\text{g/erlen}$ dans la souche hétérotrophe au 7^{ème} jour de culture. Ensuite, dans les deux cas, cette production totale diminue, ce qui est peut-être à mettre sur le compte d'un "catabolisme roténoïdique". Cette expression de la production totale reflète assez mal l'évolution quantitative réelle des roténoïdes dans chaque souche, puisque la biomasse finale des suspensions hétérotrophes est pratiquement le double des suspensions mixotrophes. Cependant elle rend compte de l'évolution qualitative de la teneur en roténoïdes totaux (intra et extracellulaires) au cours de la croissance des deux souches.

La productivité calculée par jour suit le même type d'évolution (figures 31 et 42).

C) CULTURE EN BIOREACTEUR

L'objectif de cette étude est de suivre les cinétiques de croissance et de production de roténoïdes dans un environnement gazeux contrôlé, (air enrichi ou non en CO_2) dont le débit est ajusté à 10 V.V.H. (Volume de gaz par volume de culture et par heure).

Le type de réacteur utilisé est celui décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

1) Matériel végétal

* Suspensions cellulaires hétérotrophes : Souche β maintenue à l'obscurité, cultivée sur le milieu donné dans le chapitre I additionné de 20 g.l^{-1} ($58,6 \text{ mM}$) de saccharose, ayant subi 47 repiquages.

* Suspensions cellulaires photomixotrophes : Souche β cultivée à la lumière depuis 16 repiquages sur le milieu donné dans le chapitre I additionné de 15 g.l^{-1} (44 mM) de saccharose.

2) Protocole

* Suspensions hétérotrophes :

Le bioréacteur estensemencé avec une suspension initiale âgée de 7 jours (en fin de phase exponentielle). L'ensemble du milieu conditionné est conservé. On ajoute dans la fiole d'ensemencement du milieu neuf de telle sorte que la densité cellulaire initiale soit voisine de 12 %. On a alors environ 1/3 de suspension pour 2/3 de milieu neuf.

Aucun renouvellement de milieu n'est effectué durant un cycle de culture de 9 jours.

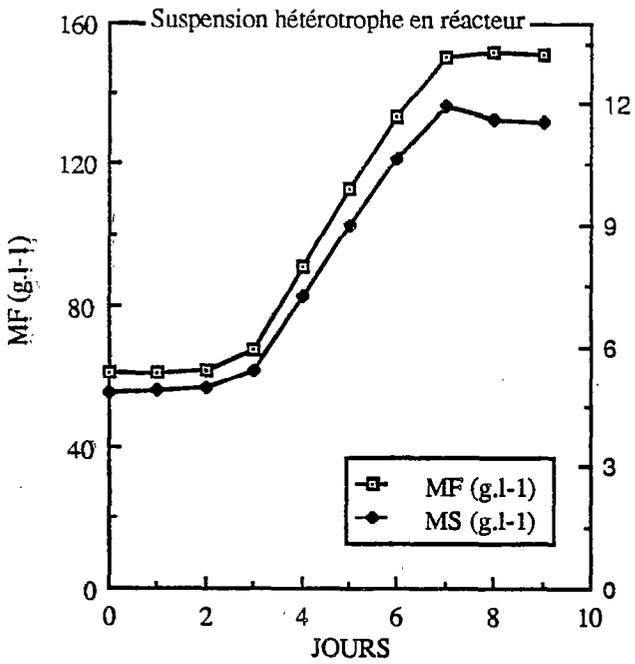
Un premier cycle de culture est effectué à l'obscurité dans les conditions standards de culture définies dans le chapitre Matériel et Méthodes. Ensuite, un deuxième cycle de culture est réalisé à la lumière après réalimentation avec le même milieu de culture, afin d'étudier l'impact de la lumière sur la croissance de cette souche β hétérotrophe, en relation avec la production de roténoïdes.

Cela nous permet également d'étudier le rôle de la lumière sur l'accumulation de roténoïdes dans le milieu de culture.

Grace aux deux modes de prélèvement mis au point au Laboratoire et décrit dans le chapitre I, les paramètres suivant ont été suivis tous les jours :

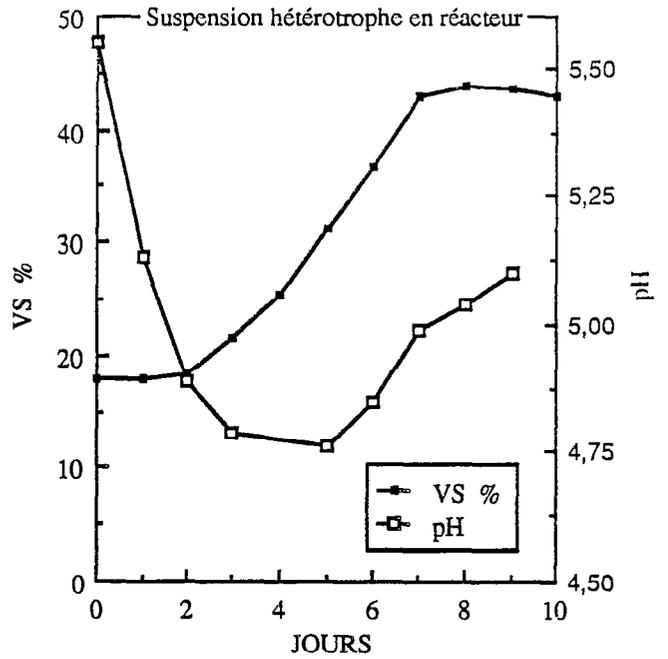
- le pH ;
- le volume sédimenté ;
- la MF sur une aliquote ;
- la MS sur une aliquote ;

Figure 45 :



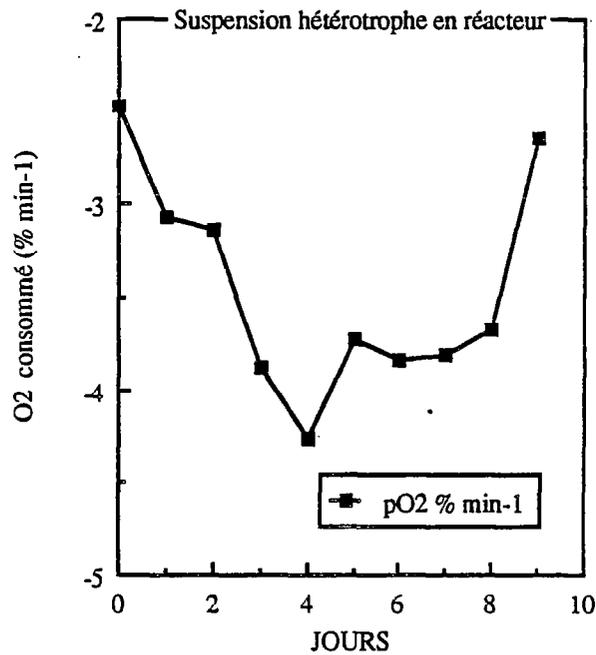
EVOLUTION DE LA BIOMASSE A L'OBSCURITE

Figure 46 :



EVOLUTION DE LA CROISSANCE & DU PH A L'OBSCURITE

Figure 47 :



EVOLUTION DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE A L'OBSCURITE

- la respiration ;
- les glucides intra et extracellulaires ;
- l'ammonium et le phosphore inorganique intra et extracellulaires ;
- les nitrates et les sulfates extracellulaires ;
- les roténoïdes totaux intra et extracellulaires ;
- la roténone intra et extracellulaires.

* Suspensions photomixotrophes :

Le bioréacteur estensemencé avec une suspension cellulaire initiale âgée de 14 jours par l'intermédiaire d'une fiole d'ensemencement. L'ensemble du milieu conditionné est conservé. On ajoute alors du milieu neuf de telle sorte que la densité cellulaire initiale soit voisine de 11 %.

Des prélèvements sont réalisés tous les deux jours et les paramètres suivis sont identiques à ceux étudiés pour la souche hétérotrophe avec de plus :

- la photosynthèse
- le dosage des chlorophylles

Remarque : contrairement aux études réalisées en Erlenmeyer, les mesures de respiration et de photosynthèse, n'ont pas été effectuées à l'électrode de Clark mais directement dans le bioréacteur grâce à une sonde ampérométrique immergée dans le milieu de culture. Le volume de milieu variant en cours du cycle de croissance ainsi que l'atmosphère au dessus de la culture, les résultats seront exprimés en % d'O₂ consommé ou dégagé par minute. Cette méthode de mesure nous permet de suivre régulièrement et qualitativement la teneur en O₂ du milieu in situ en s'affranchissant des problèmes de la prise de prélèvement et du stress possible des cellules lors de leur passage dans la cuve de mesure.

3) Résultats

a) Souche hétérotrophe

Cette manipulation a été répétée trois fois en l'espace de plusieurs mois.

Figure 48 :

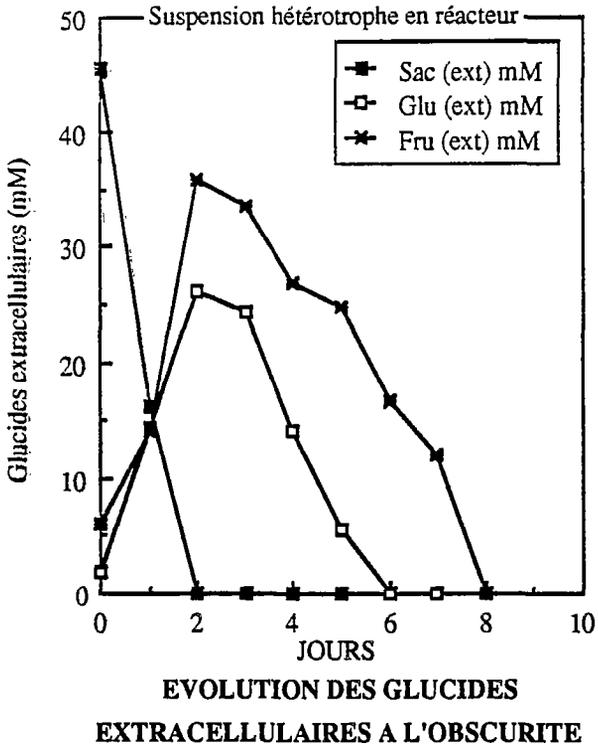


Figure 49 :

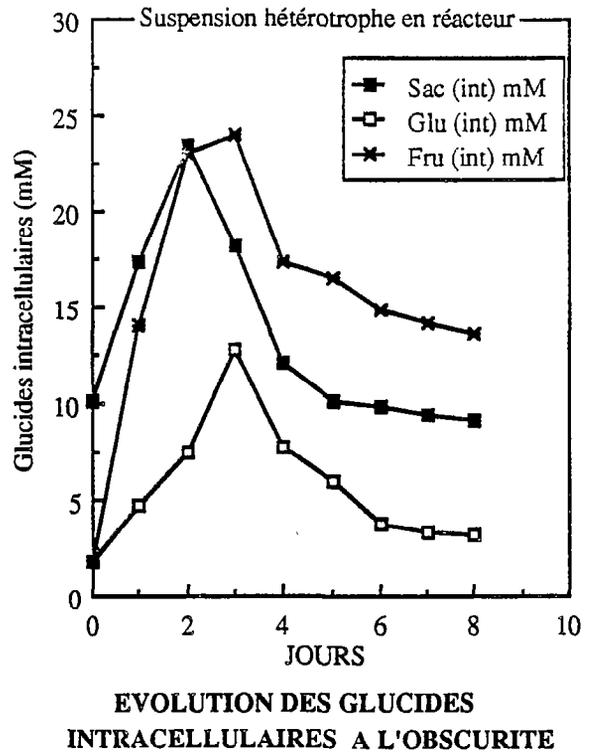
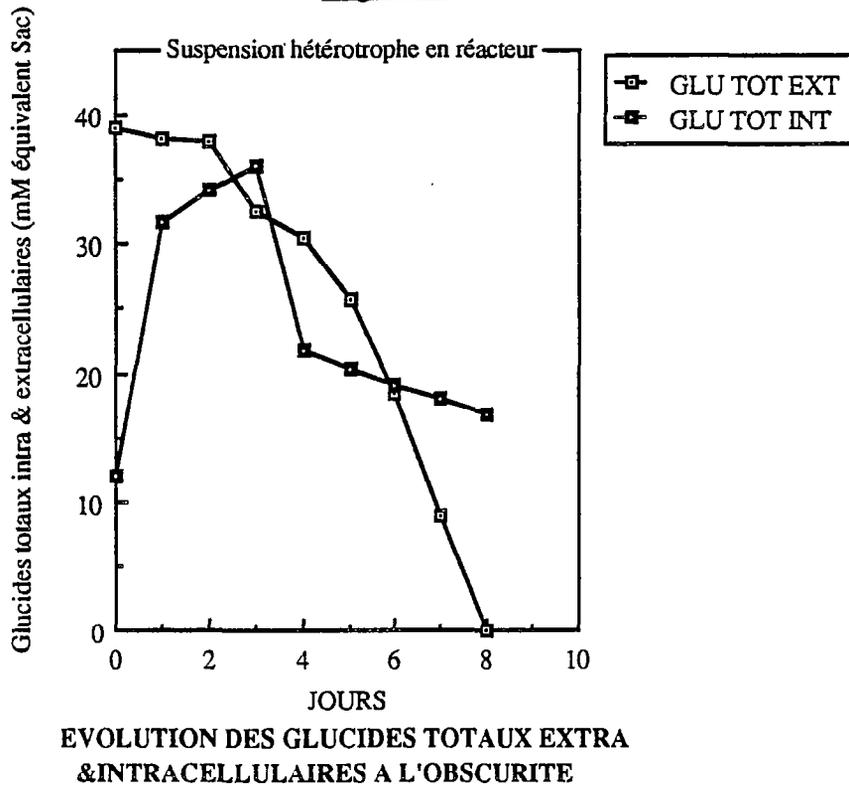


Figure 50 :



a1) Premier cycle à l'obscurité

— *Evolution de la croissance*

Les courbes obtenues montrent que l'évolution de la biomasse peut se subdiviser en trois phases :

- une phase de latence de 2 jours
- une phase exponentielle de croissance de 5 jours (figure 45) qui se traduit en coordonnées semi-logarithmiques par une droite d'équation :

$$Y = 0,174 X + 2,55 \quad (\rho = 0,999) \quad \text{le temps de doublement } T_d = 61,2 \text{ heures}$$

- une phase stationnaire de 2 jours

Le maximum de biomasse est obtenu en fin de phase exponentielle au 7^{ème} jour de culture : MF = 151 g.l⁻¹ de suspension (contre 60,6 g.l⁻¹ à l'ensemencement)

et MS = 7,04 g.l⁻¹ de suspension (contre 3,09 g.l⁻¹ à l'ensemencement).

La masse fraîche a donc été multipliée par 2,5 en 9 jours et la masse sèche par 2,28.

— *pH extracellulaire : (figure 46)*

Une acidification du milieu de culture est observée durant la phase de latence : le pH passe d'une valeur de 5,7 à t_0 à une valeur de 4,8 à t_3 . Il demeure stable durant la phase exponentielle puis s'alcalinise légèrement lors du passage à la phase stationnaire (pH 5,1).

— *Evolution des échanges gazeux : (figure 47)*

Pendant les deux premiers jours de la culture correspondant à la phase de latence la respiration n'est pas très intense.

Cette respiration s'intensifie durant la phase exponentielle jusqu'au 4^{ème} jour de culture, puis diminue pour se stabiliser entre t_5 et t_8 . En fin de phase exponentielle la respiration diminue encore et finalement retrouve une valeur identique à celle de l'ensemencement.

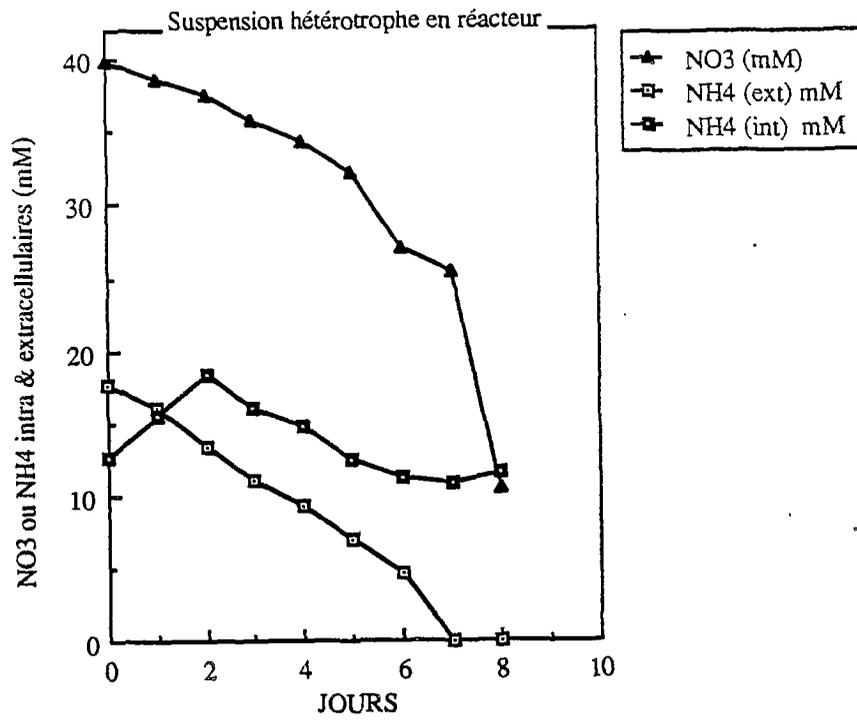
— *Nutrition carbonée*

* Glucides extracellulaires : (figure 48)

Le saccharose est totalement hydrolysé en deux jours.

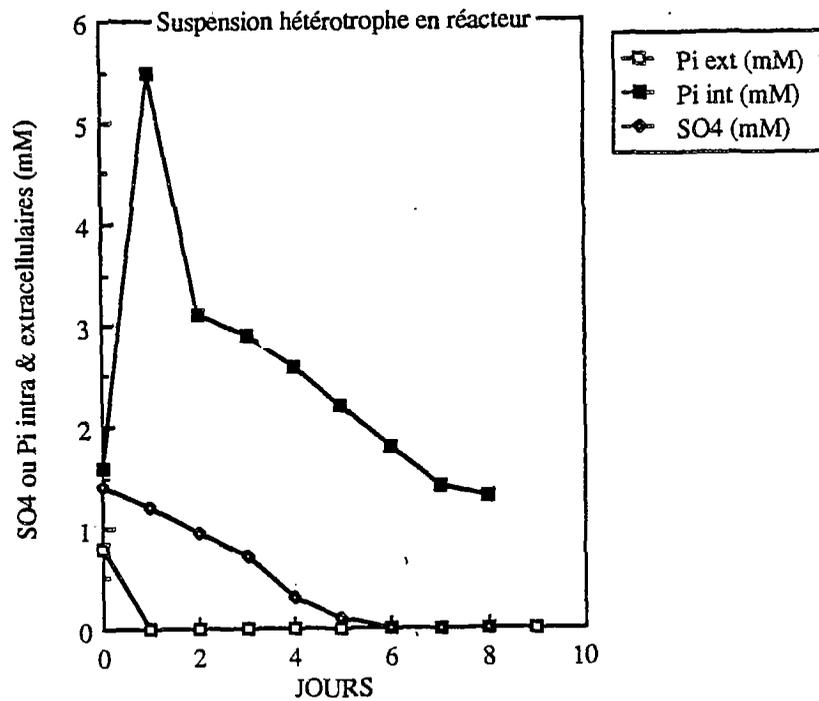
Le glucose et le fructose ont disparu complètement du milieu respectivement au 6^{ème} et 8^{ème} jour de culture.

Figure 51 :



NUTRITION AZOTEE A L'OBSCURITE

Figure 52 :

EVOLUTION DES IONS SULFATES ET DU PI
A L'OBSCURITE

On observe toutefois que le glucose est consommé préférentiellement au fructose, le fructose étant assimilé plus rapidement lors de la disparition totale du glucose dans le milieu.

On ne note aucune corrélation apparente entre épuisement en glucides du milieu et arrêt de la croissance. En effet, le fructose est encore assimilé entre le 7^{ème} et le 8^{ème} jour alors que la croissance est arrêtée.

** Glucides intracellulaires : (figure 49)*

Durant les premiers jours de croissance, on observe une importante accumulation de saccharose, dont le maximum se situe à t_2 à 24 mM. Ce pool interne de saccharose est ensuite très rapidement métabolisé durant la phase exponentielle de la croissance. Il se stabilise autour du 5^{ème} jour de culture à une valeur de 9 mM.

Le glucose et le fructose sont accumulés dans les cellules pendant les premiers jours de culture avec un pic détectable à t_3 : 24 mM de fructose et 12,5 mM de glucose.

Le glucose est ensuite métabolisé plus rapidement que le fructose.

A partir du 6^{ème} jour de culture les concentrations en glucides ne varient plus. La teneur résiduelle en sucres du milieu lors de l'arrêt de croissance est de 17,5 mM, contre 12 mM (en équivalent sachharose) lors de l'ensemencement. La suspension hétérotrophe a donc accumulé un stock de glucides (et notamment de fructose) directement assimilable pendant ce cycle.

L'évolution de la teneur en glucides totaux intra et extracellulaires illustré par la figure 50 montre tout d'abord :

- * une disparition des glucides du milieu nettement accélérée après 5 jours de culture
- * une accumulation transitoire des sucres durant les trois premiers jours du cycle de croissance.

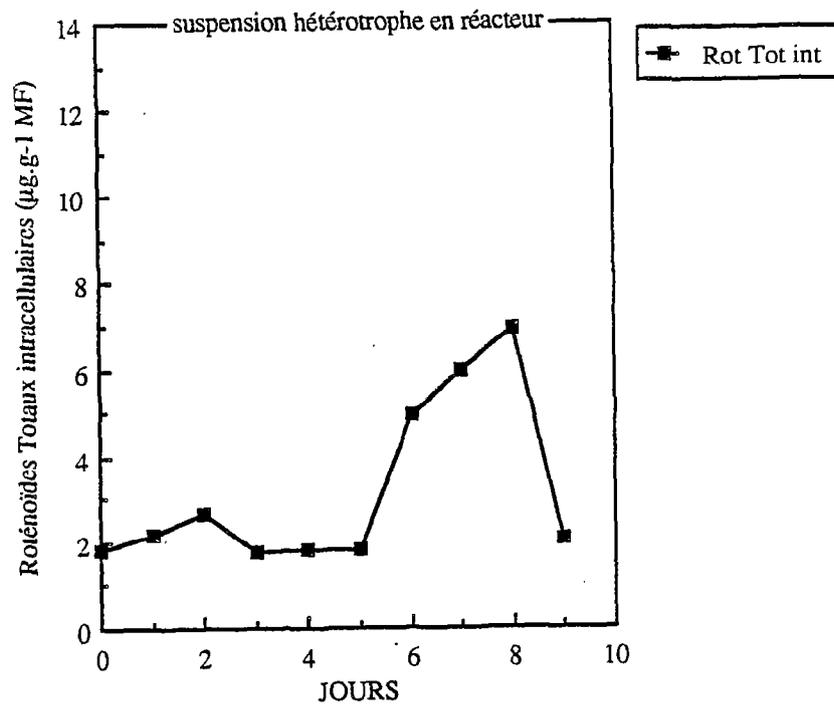
— Eléments minéraux :

* Les ions ammoniums sont assimilés de façon linéaire durant la croissance. Ils ne sont plus dosables lors de prélèvements effectués au 7^{ème} jour de culture (figure 51).

Il existe une étroite relation entre la disparition totale d'ammonium du milieu de culture et l'arrêt de la croissance.

Le dosage intracellulaire des ions ammoniums, nous a permis de mettre en évidence

Figure 53 :



EVOLUTION DES ROTENOIDES INTRACELLULAIRES
A L'OBSCURITE

la présence d'un pool interne important. Le maximum d'incorporation est obtenu au temps t_2 (18,4 mM). Ces ions ammoniums intracellulaires sont peu à peu métabolisés et on ne note plus aucune variation après le 6^{ème} jour de culture où la concentration en ammonium est encore de 11,5 mM.

* Les nitrates ne sont pas totalement assimilés durant le cycle de croissance, leur teneur résiduelle est encore de 10,5 mM en fin de culture (figure 51).

* Les ions phosphates sont les premiers éléments à disparaître du milieu de culture, en effet, ils ne sont plus dosables dès le 1^{er} jour de croissance (figure 52).

Le dosage du phosphore inorganique intracellulaire a montré la présence d'une teneur en ions voisine de 1,6 mM lors de l'ensemencement. Cette concentration est maximale dans les cellules au moment du premier prélèvement (1^{er} jour). La quantité absorbée présente alors environ 52 % de la quantité présente initialement dans le milieu. La concentration diminue ensuite très rapidement et atteint un minimum (1,3 mM) lors de l'arrêt de la croissance.

* Les ions sulfates sont rapidement consommés avec une accélération perceptible de cette assimilation à partir du 3^{ème} jour de culture (figure 52). Ils ont totalement disparu du milieu au 6^{ème} jour.

— Evolution de la production de roténoïdes : (figure 53)

* Roténoïdes intracellulaires :

La production de roténoïdes intracellulaires suit la croissance ; une teneur maximale en roténoïdes est obtenue au 8^{ème} jour de culture, en fin de phase exponentielle (6,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF contre 1,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF à l'ensemencement). La concentration en roténoïdes intracellulaires est donc pratiquement multipliée par quatre au cours de la culture.

La teneur en roténone des cellules est très faible (environ 1 à 5 % des roténoïdes totaux) aussi n'exprimerons nous la production qu'en fonction des roténoïdes totaux.

* Roténoïdes extracellulaires :

Au cours des repiquages et également lors du passage en bioréacteur, des teneurs de plus en plus faibles en roténoïdes ont été décelées dans le milieu de culture.

Durant ces manipulations qui ont été répétées plusieurs fois, les roténoïdes n'ont été décelé qu'à l'état de traces dans le milieu de culture. Aucune évolution de ces composés au cours de la culture, ne pourra donc être donnée.

Figure 54 :

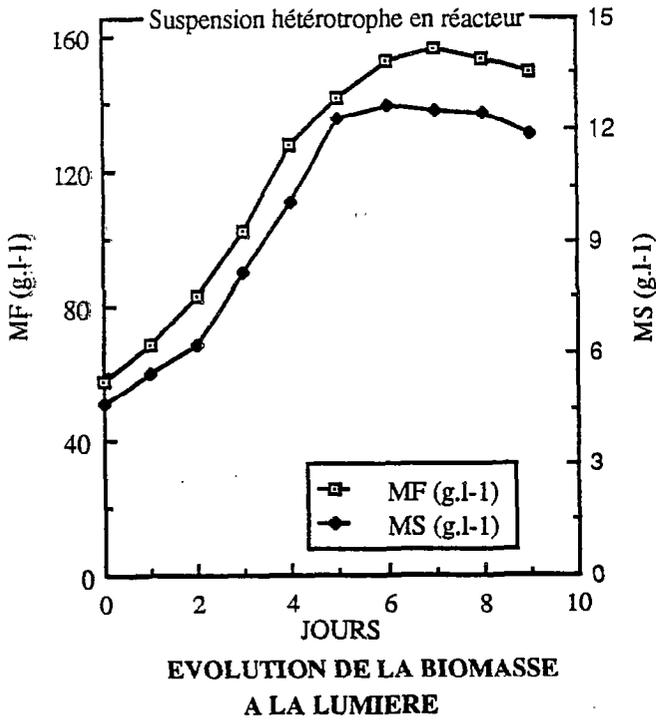


Figure 55 :

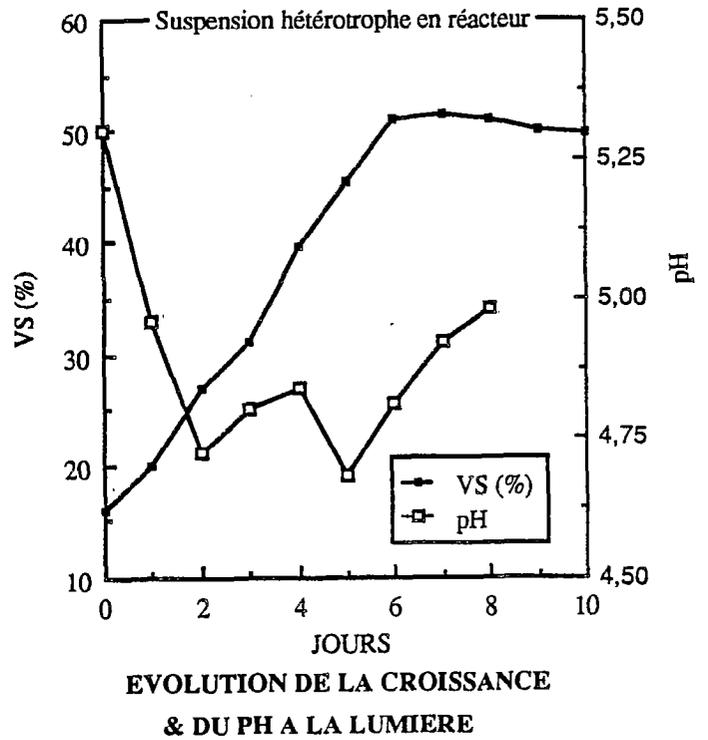
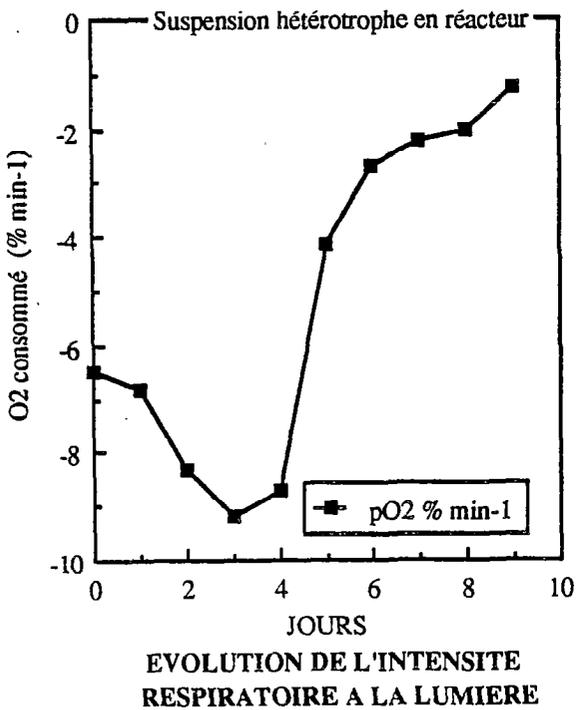


Figure 56 :



De même, aucune conclusion ne pourra être formulée en ce qui concerne l'étude des phénomènes d'excrétion et/ou de diffusion des roténoïdes dans le milieu, en relation avec le facteur lumière.

a₂) Deuxième cycle à la lumière

— Evolution de la croissance : (figure 54)

Dans les conditions de culture retenues, la croissance de la souche β hétérotrophe cultivée en bioréacteur à la lumière, est caractérisée par :

- une phase de latence très brève d'un jour (à peine perceptible),
- une phase exponentielle de croissance de 6 jours,
- une phase stationnaire de croissance de 3 jours.

La phase exponentielle de croissance se traduit en coordonnées semi-logarithmique par une droite d'équation : $Y = 0,196 X + 2,553$ (avec $\rho = 0,999$) . Le temps de doublement de la population cellulaire (Td) est ici de 61,3 heures.

Le maximum de biomasse produite en fin de croissance exponentielle est atteint au 7^{ème} jour de culture :

masse fraîche = 156 g.l⁻¹ de suspensions

masse sèche = 6,18 g. l⁻¹ de suspensions

La masse fraîche est multipliée par 2,71 en une semaine et la masse sèche par 1,88.

— pH extracellulaire : (figure 55)

Le pH du milieu de culture s'acidifie d'une façon intense entre t_0 et t_2 ; sa valeur passe de 5,3 à 4,7.

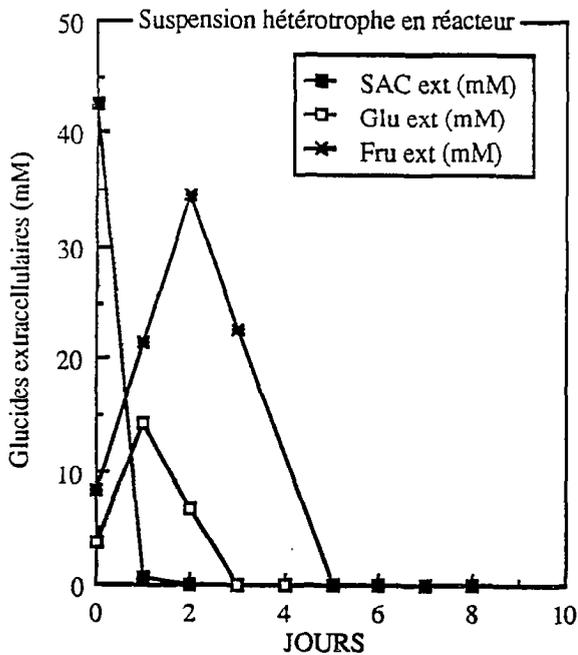
Il est ensuite relativement stable jusqu'au 5^{ème} jour de culture puis s'alcalinise progressivement. En fin de culture sa valeur est de 4,99.

— Evolution de la respiration

Des mesures de respiration ont été effectuées dans un premier temps à la lumière puis à l'obscurité.

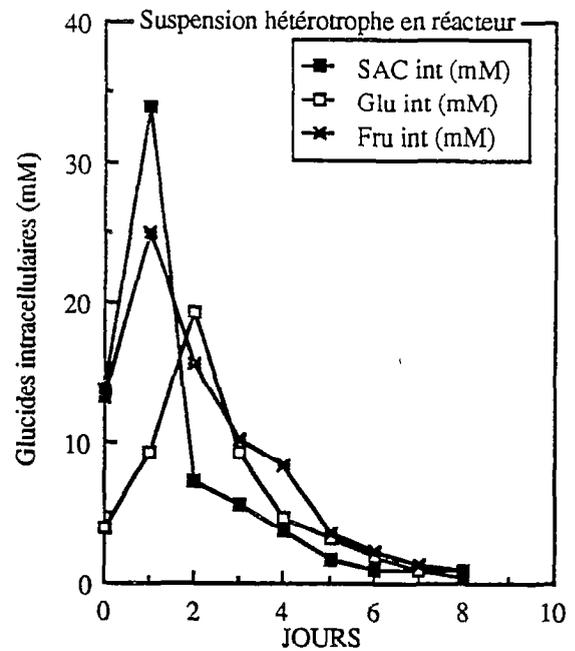
Aucune différence significative n'ayant été observée entre ces deux évolutions de l'intensité respiratoire, seules les valeurs obtenues à la lumière ont été reportées sur la

Figure 57 :



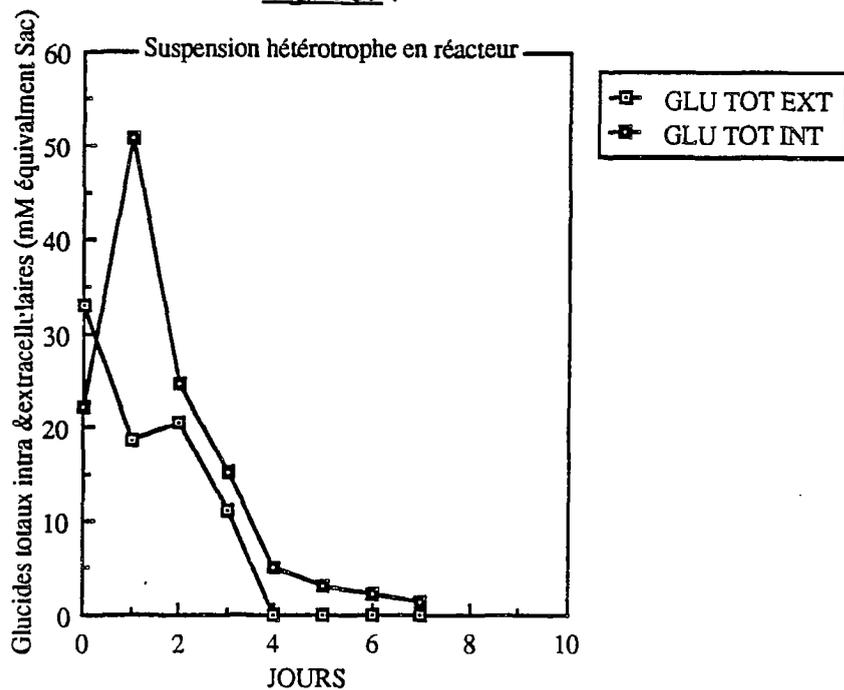
EVOLUTION DES GLUCIDES
EXTRACELLULAIRES A LA LUMIERE

Figure 58 :



EVOLUTION DES GLUCIDES
INTRACELLULAIRES A LA LUMIERE

Figure 59 :



EVOLUTION DES GLUCIDES TOTAUX INTRA
& EXTRACELLULAIRES A LA LUMIERE

figure 56.

On observe une respiration déjà très intense dès l'addition du milieu et qui augmente encore durant les quatre premiers jours de la culture.

Cette intensité respiratoire diminue ensuite très fortement et se stabilise finalement en fin de culture autour d'une valeur plus faible que lors de l'ensemencement.

— Nutrition carbonnée

* Glucides extracellulaires : (figure 57)

Le saccharose est hydrolysé très rapidement. Il n'est plus dosable dès le 1^{er} jour de culture.

Le glucose et le fructose, produits de l'hydrolyse du saccharose, sont à leur tour très rapidement assimilés (beaucoup plus rapidement qu'à l'obscurité). Ils disparaissent du milieu respectivement au 3^{ème} et au 5^{ème} jour de culture, en pleine phase exponentielle.

* Glucides intracellulaires : (figure 58)

Il existe un pool interne très important de glucides.

Un pic d'incorporation de saccharose (33,8 mM) est observé très tôt lors de la culture (le premier jour). Cette accumulation n'est que transitoire, puisque dès le 2^{ème} jour de culture cette concentration baisse de façon drastique (6 mM) pour n'être plus que de 0,4 mM en fin de phase exponentielle.

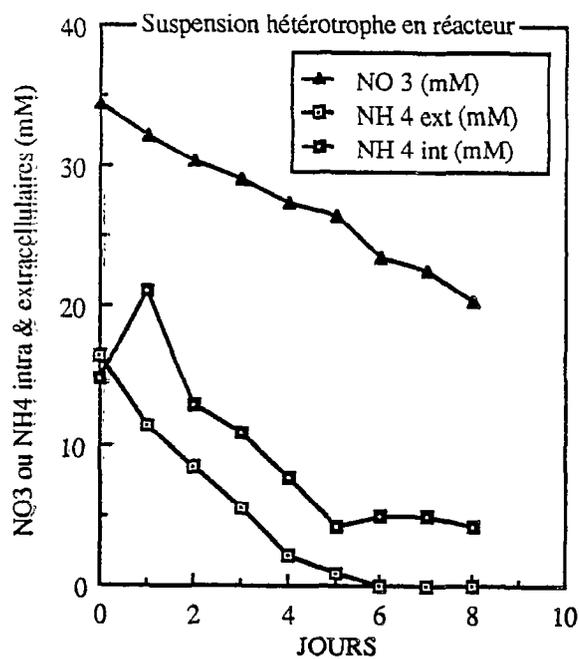
Le fructose est accumulé dans les cellules durant le premier jour de culture, il est ensuite progressivement métabolisé. Sa teneur résiduelle intracellulaire en fin de culture est de 0,94 mM.

Un pic d'apparition du glucose est perceptible au 2^{ème} jour de culture (19,2 mM de glucose contre 3,8 mM à l'ensemencement). Le glucose est ensuite très rapidement utilisé ; il reste seulement 0,88 mM de glucose en fin de phase stationnaire.

La concentration en glucides, exprimée en équivalent saccharose, lors de l'arrêt de la croissance est de 1,34 mM contre 20,75 mM à l'ensemencement. Au cours du cycle de culture à la lumière, les suspensions hétérotrophes ont utilisé une grande partie de leur réserve en glucides.

Les glucides intracellulaires sont très peu utilisés après le 4^{ème} jour de culture.

Figure 60 :



NUTRITION AZOTEE A LA LUMIERE

Figure 61 :

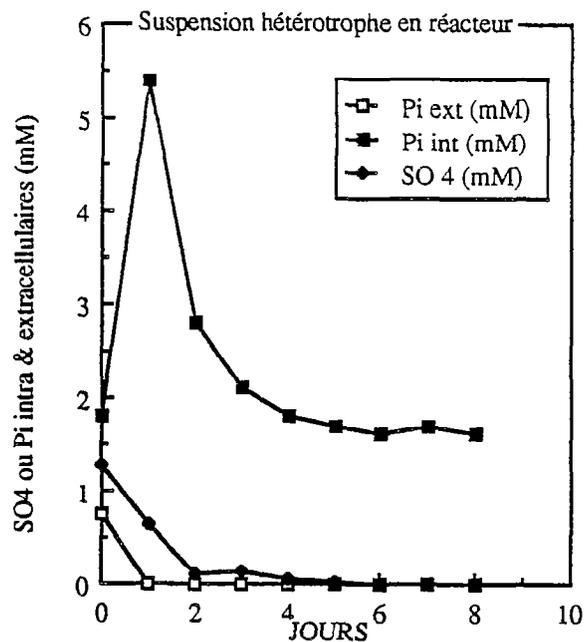
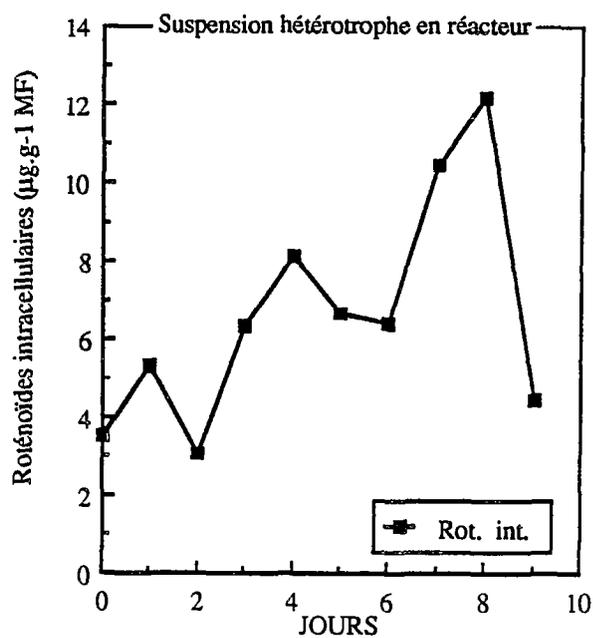
EVOLUTION DES SULFATES ET DU PI
A LA LUMIERE

Figure 62 :

EVOLUTION DES ROTENOIDES INTRACELLULAIRES
A LA LUMIERE

— *Eléments minéraux*

* Les ions ammoniums sont assimilés régulièrement au cours de la croissance (figure 60). Ils ne sont plus dosables après le 6^{ème} jour de culture. Cela coïncide avec l'arrêt de la croissance.

Lors du dosage intracellulaire des ions ammoniums, nous avons pu observer une accumulation transitoire de ces ions, au 1^{er} jour de culture (21,2 mM contre 14,8 mM à l'ensemencement). Cet élément est ensuite rapidement métabolisé jusqu'au 5^{ème} jour de culture. Sa concentration est alors stable (4,2 mM) jusqu'en fin de phase stationnaire.

* Les ions nitrates ne sont pas totalement consommés. La teneur résiduelle de cet élément dans le milieu en fin de culture est encore de 20,4 mM soit un peu plus de la moitié de sa valeur à l'ensemencement (figure 60).

On ne note pas de consommation accélérée de nitrates lors de la disparition des ions ammoniums dans le milieu de culture.

* Les ions sulfates sont absorbés très rapidement durant les deux premiers jours de culture (leurs teneurs passent de 1,25 mM à 0,25 mM en deux jours). La concentration en sulfates se stabilise ensuite. Ces éléments ne sont plus dosables dans le milieu au 6^{ème} jour de culture (figure 61).

* Le phosphore inorganique est le premier élément à disparaître du milieu (dès le premier jour de culture) (figure 61).

Le dosage intracellulaire de cet élément nous a permis de mettre en évidence la présence d'un pool interne.

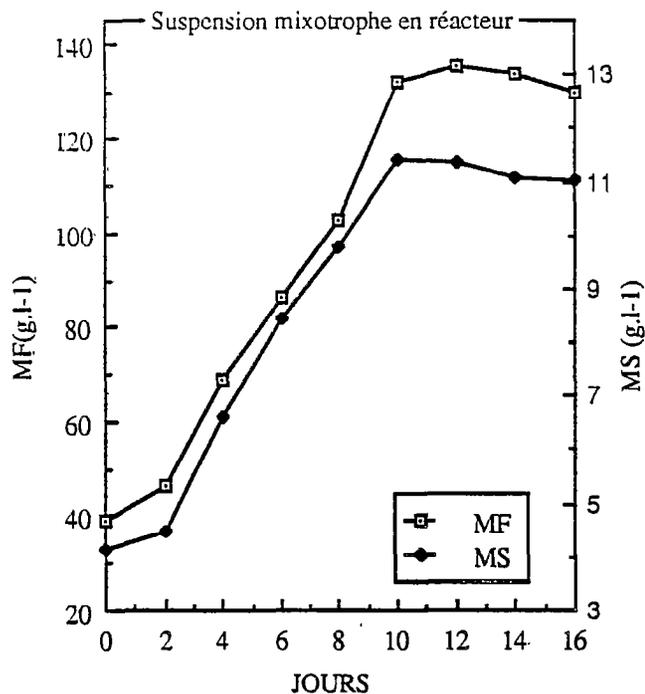
Une absorption maximale de Pi (5,4 mM contre 1,8 mM à l'ensemencement) est observée alors que celui-ci n'est déjà plus dosable dans le milieu de culture. Ce pool interne diminue rapidement pour n'être plus que de 1,6 mM en fin de phase exponentielle.

— *Evolution des roténoïdes : (figure 62)*

* *Roténoïdes intracellulaires :*

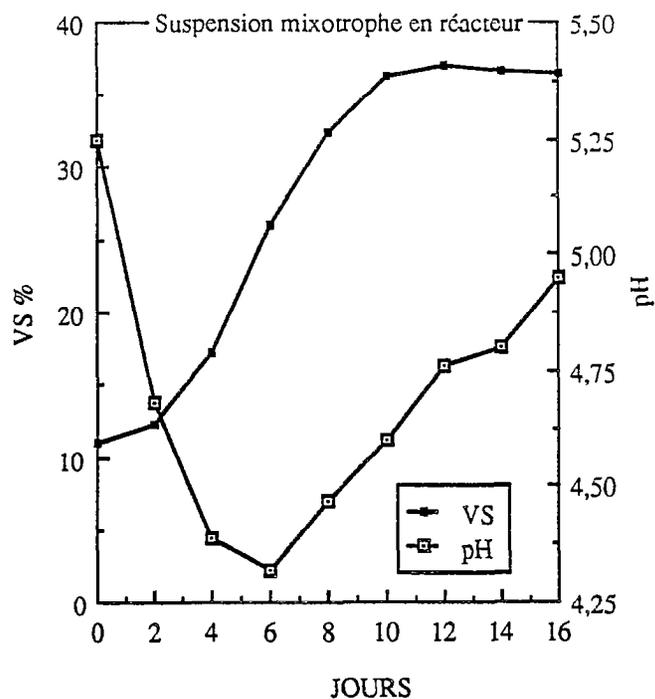
on observe au cours de la culture, une augmentation progressive de la teneur en roténoïdes intracellulaires. Un pic important de production (12,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF) est obtenu en fin de phase exponentielle. Cette concentration en roténoïdes chute ensuite très rapidement et atteint lors de la phase stationnaire une valeur proche de celle à l'ensemencement (4,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF).

Figure 63 :



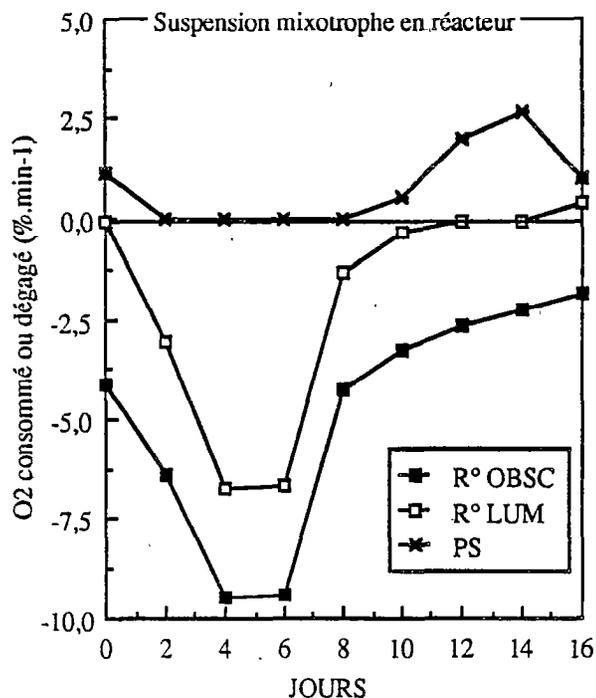
EVOLUTION DE LA BIOMASSE

Figure 64 :



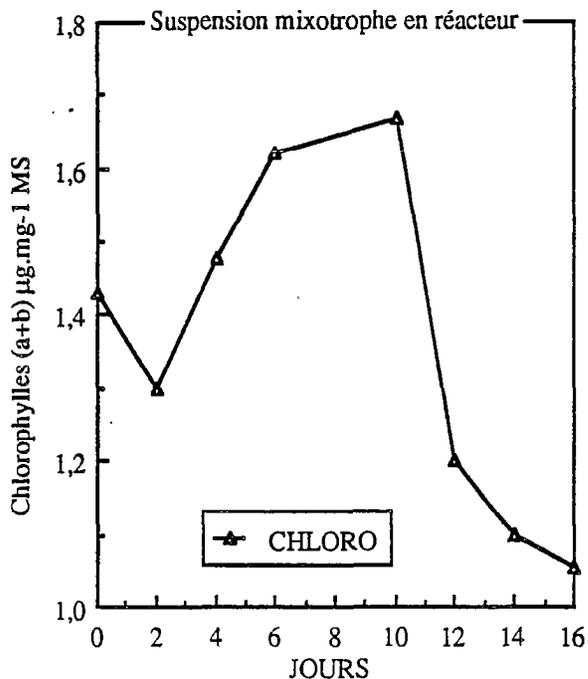
EVOLUTION DE LA CROISSANCE & DU PH

Figure 65 :



EVOLUTION DE LA RESPIRATION ET DE LA PHOTOSYNTHESE

Figure 66 :



EVOLUTION DES CHLOROPHYLLES TOTALES

* Roténoïdes extracellulaires :

De même que dans le cycle précédent effectué à l'obscurité, on ne note aucune quantité dosable de roténoïdes dans le milieu tout au long du cycle de culture à la lumière.

b) Souche photomixotrophe

— Evolution de la croissance

D'après les figures 63 et 34, la croissance de la souche β photomixotrophe peut se subdiviser en :

- une phase de latence de 2 jours très peu perceptible
- une phase exponentielle de croissance de 8 jours
- une phase stationnaire de 6 jours.

La phase exponentielle de croissance se traduit en coordonnée semi-logarithmique par une droite d'équation :

$$Y = 0,1655 X + 2,1965 \quad (r = 0,99) . \text{ Le temps de doublement } T_d = 52,7.$$

Durant la phase de latence, le poids de matière sèche reste constant. Ensuite, la matière sèche augmente régulièrement pour se stabiliser entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour de culture.

Entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour, la masse fraîche atteint également un plateau.

Le maximum de biomasse produite est de 135,68 g de MF.l⁻¹ de suspensions contre 39,39 g à l'ensemencement, et de 11,43 g de MS.l⁻¹ de suspensions contre 4,16 g à t_0 . La MF est donc multipliée par 3,44 alors que la MS est seulement multipliée par 2,75.

La population finale a été multipliée par un facteur de 3,3.

— pH extracellulaire : (figure 64)

Une importante acidification du milieu (d'une unité pH) est observée durant la phase de latence et le début de la phase exponentielle, jusqu'au 6^{ème} jour de culture.

Le milieu s'alcalinise ensuite peu à peu durant la phase exponentielle et se stabilise autour de 4,9 en fin de croissance.

Figure 67 :

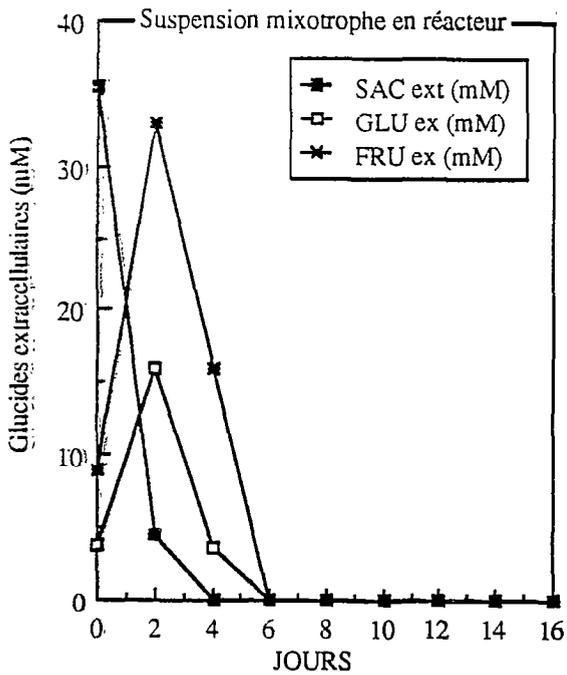
EVOLUTION DES GLUCIDES
EXTRACELLULAIRES

Figure 68 :

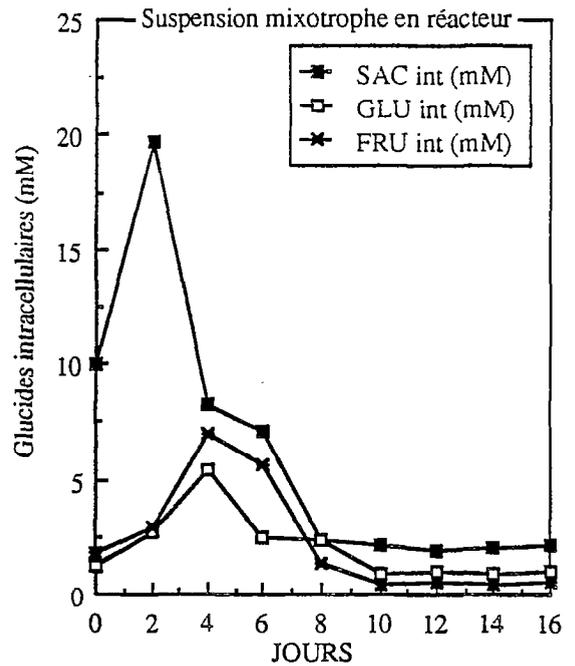
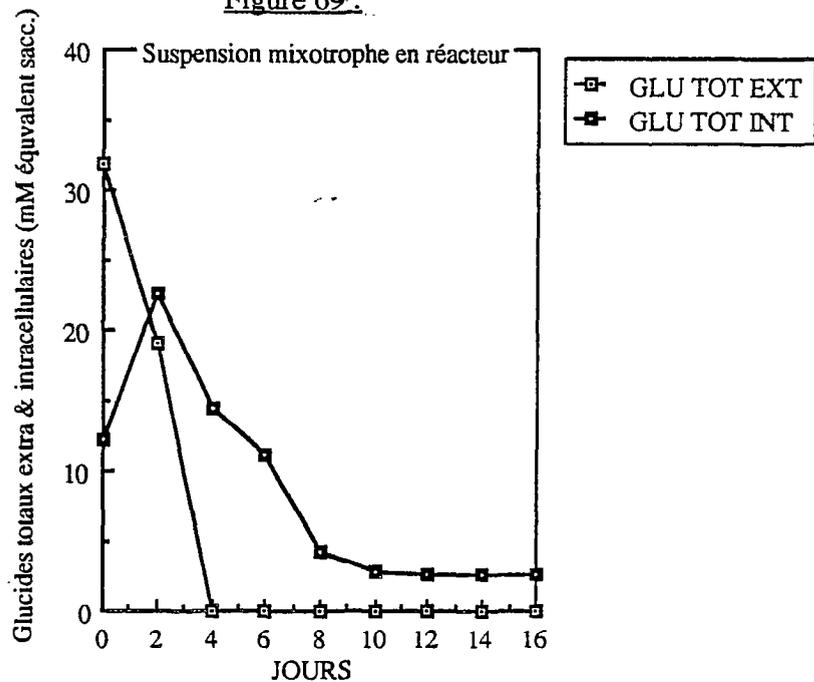
EVOLUTION DES GLUCIDES
INTRACELLULAIRES

Figure 69 :

EVOLUTION DES GLUCIDES TOTAUX INTRA
& EXTRACELLULAIRES

— *Evolution de la respiration et de la photosynthèse*

* *Evolution de la respiration :*

L'évolution de la respiration à l'obscurité durant le cycle de culture est donnée dans la figure 65.

L'intensité respiratoire est très importante durant les quatre premiers jours de la culture. Elle se stabilise entre les jours 4 et 6 puis diminue rapidement jusqu'au jour 8 lors de l'apparition de la photosynthèse. Elle reste alors assez stable et de faible amplitude jusqu'à la fin de la croissance.

* *Evolution de la photosynthèse :*

Lors de l'ensemencement, la suspension cellulaire photomixotrophe β était photosynthétisante. Cette capacité à photosynthétiser est perdue transitoirement par la suspension durant la phase exponentielle de croissance entre les jours 2 et 8.

A partir du 8^{ème} jour de croissance (correspondant à la disparition totale des glucides dans le milieu de culture) la photosynthèse s'exprime à nouveau. Elle atteindra un maximum lors du 14^{ème} jour de culture.

— *Evolution de la teneur en chlorophylles (a+b) (figure 66)*

La teneur en chlorophylles (a+b) diminue légèrement durant la phase de latence.

La synthèse chlorophyllienne augmente ensuite progressivement durant la phase exponentielle jusqu'au 6^{ème} jour et se stabilise jusqu'au 10^{ème} jour autour d'une valeur de 1,67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de chlorophylles contre une teneur de 1,43 à t_0 .

Cette concentration diminue ensuite sensiblement durant la phase stationnaire.

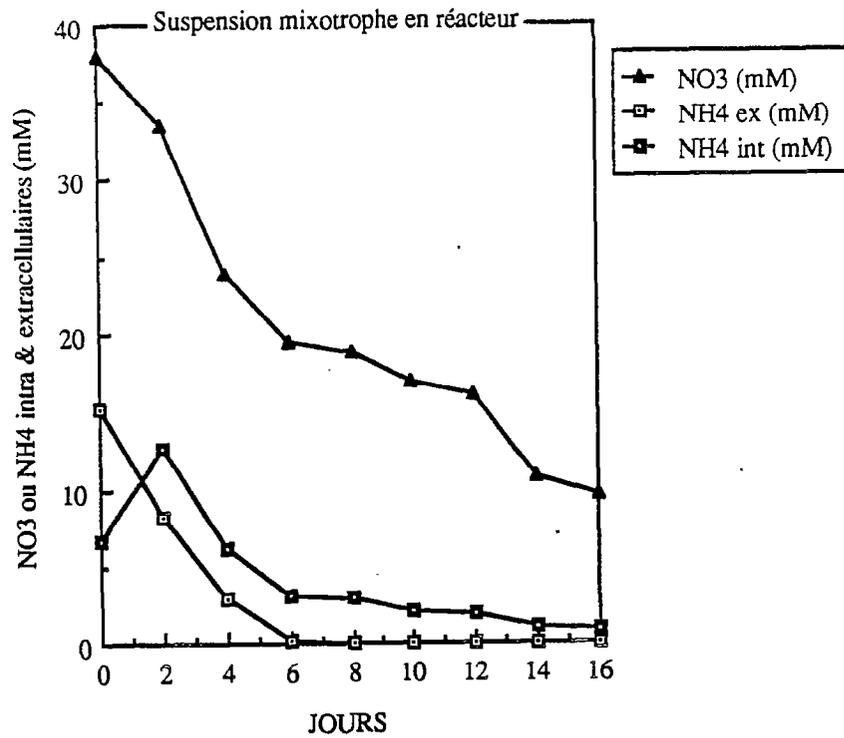
— *Nutrition carbonée*

* *Glucides extracellulaires :*

Les résultats donnés dans la figure 67, permettent de mettre en évidence une hydrolyse rapide et complète du saccharose lors des quatre premiers jours de culture (avec une efficacité beaucoup plus importante durant les deux premiers jours).

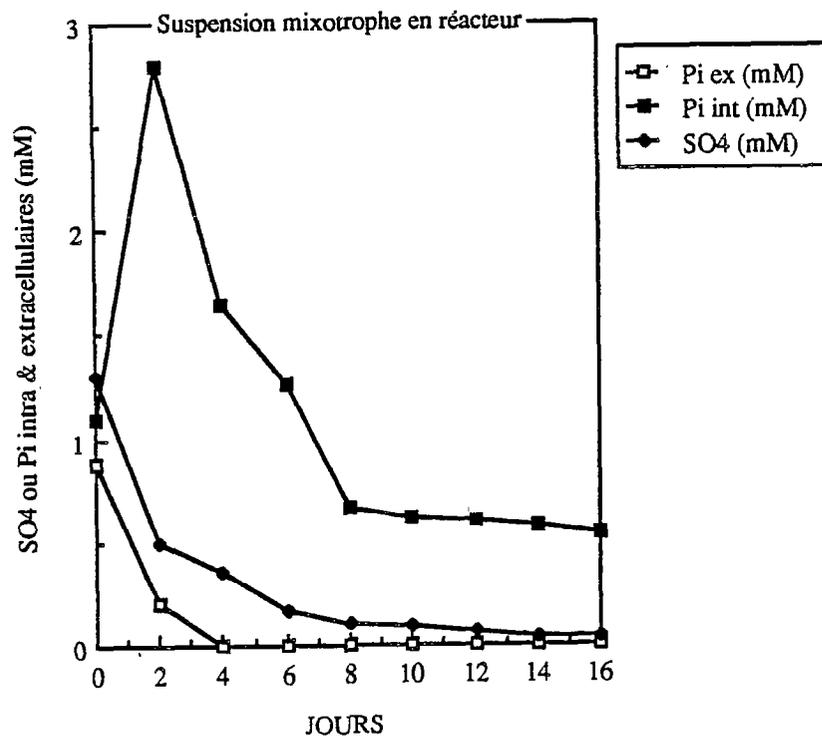
Le glucose et le fructose formés ont totalement disparu du milieu au 6^{ème} jour de culture. Le glucose semble disparaître plus rapidement que le fructose.

Figure 70 :



NUTRITION AZOTEE

Figure 71 :



EVOLUTION DU PI & DES SULFATES

* *Glucides intracellulaires : (figure 68)*

Durant les deux premiers jours de culture (correspondant à l'hydrolyse quasi totale du saccharose dans le milieu), on note une forte augmentation du pool interne de saccharose qui est alors multiplié par deux. Cette teneur diminue ensuite considérablement jusqu'au 8^{ème} jour de culture. La concentration interne en saccharose se stabilise ensuite aux environs de 2 mM jusqu'en fin de culture.

Le glucose et le fructose sont accumulés de façon similaire, leurs concentrations intracellulaires étant maximales lors du 4^{ème} jour de culture (glucose : 5,43 mM et fructose 6,99 mM). Le glucose et le fructose ne sont plus consommés à partir du 10^{ème} jour.

La teneur en glucides totaux lors de l'arrêt de croissance est de 3,75 mM en équivalent saccharose contre 12,5 mM à l'ensemencement. La suspension mixotrophe a donc utilisé une part importante de ses réserves en sucres.

L'évolution des glucides totaux est donnée sur la figure 69.

— *Eléments minéraux :*

* Les ions ammoniums sont assimilés régulièrement au cours de la croissance ; ils ont totalement disparu du milieu de culture au 6^{ème} jour, bien avant l'arrêt de croissance des suspensions cellulaires photomixotrophes (figure 70).

Un dosage intracellulaire des ions ammoniums s'est donc révélé indispensable. On observe alors un pic d'accumulation de l'ammonium au 2^{ème} jour de culture, lors de la phase de latence. Ce pool intracellulaire diminue ensuite progressivement au cours du temps, pour se stabiliser autour d'1 mM au 14^{ème} jour de culture. On peut noter cependant que ce pool interne évolue peu entre le 6^{ème} et le 16^{ème} jour de culture.

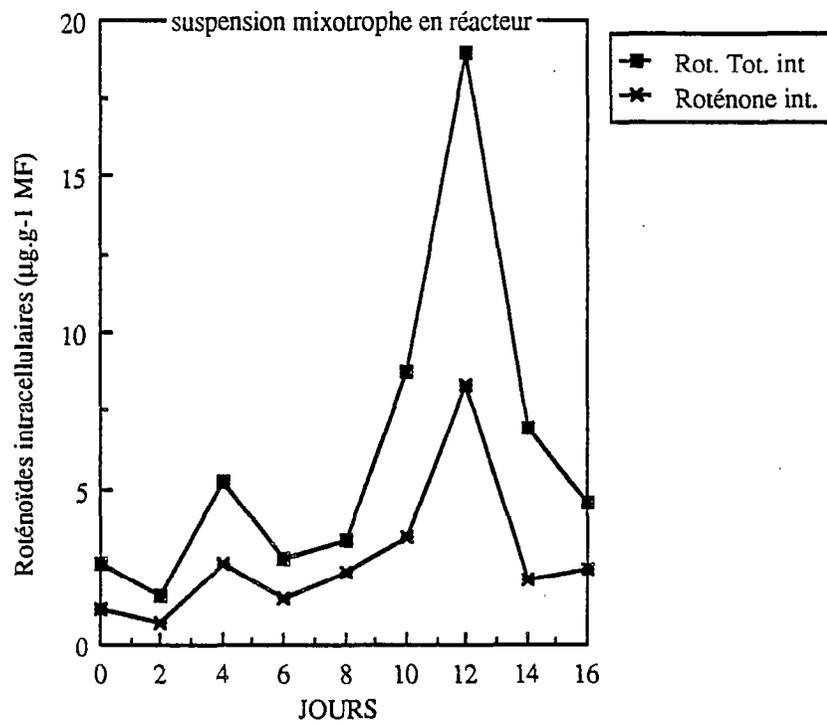
* Les nitrates ne sont pas totalement assimilés, la teneur résiduelle en nitrates dans le milieu est encore de 10 mM, en fin de culture (figure 70). On observe également qu'après une incorporation rapide des ions nitrates durant les 6 premiers jours de la culture, celle-ci est ralentie jusqu'à la fin de la culture.

* Les ions sulfates sont progressivement utilisés pendant la phase de croissance (figure 71). Ils n'évoluent plus après le 8^{ème} jour de culture. En fin de culture, la teneur en sulfates du milieu n'est pratiquement plus dosable.

* Par contre, le phosphore inorganique est très vite absorbé, il a totalement disparu du milieu au 4^{ème} jour de culture (figure 71).

Lors du dosage du phosphore inorganique intracellulaire, on observe un pool interne

Figure 72:



EVOLUTION DES ROTENOIDES INTRACELLULAIRES

de cet élément avec un pic d'accumulation de forte amplitude au 2^{ème} jour de culture (2,48 mM contre 1,1 mM à l'ensemencement). En fin de culture cette concentration en Pi reste constante et se stabilise autour de 7,5 mM.

— *Evolution des roténoïdes : (figure 72)*

* Roténoïdes intracellulaires

Durant les premier jours de culture la concentration en roténoïdes augmentent très lentement. Un pic de production de forte amplitude est observée à partir du 10^{ème} jour de culture soit en fin de phase exponentielle-début de la phase stationnaire (18,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF contre 2,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF à l'ensemencement).

L'accumulation de roténoïdes au 12^{ème} jour de culture n'est que transitoire, elle diminue rapidement. La concentration est de 4,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF lors de la phase stationnaire de croissance.

La roténone présente une cinétique d'apparition similaire à celle des roténoïdes. Elle représente environ 45 % des roténoïdes totaux.

Roténoïdes extracellulaires

Au cours des repiquages et également lors du passage en bioréacteur, des teneurs de plus en plus faibles en roténoïdes ont été dosées dans le milieu de culture.

Durant ces manipulations qui ont été répétées plusieurs fois, les roténoïdes extracellulaires n'ayant été décelés qu'à l'état de traces, aucune évolution de ces composés ne sera donnée.

4) Comparaison-Discussion

a) Croissance et métabolisme

— *Croissance :*

L'existence d'un temps de latence de 2 jours pour la souche β hétérotrophe, cultivée à l'obscurité, et la souche β photomixotrophe, est probablement liée au fait que les bioréacteurs ont été ensemencés avec des suspensions ayant atteint la phase stationnaire.

Un temps de latence identique avait été observé lors de la culture de ces mêmes souches en erlenmeyer.

Par contre, on ne note pratiquement pas de phase de latence dans le cas de la souche

β hétérotrophe cultivée à la lumière. Cela est peut être à relier à un effet positif de la lumière sur la croissance.

Le facteur de multiplication de la biomasse est de 2,43 pour la souche hétérotrophe maintenue à l'obscurité contre 3,2 lors du passage à la lumière.

Ce premier facteur de multiplication de la biomasse à l'obscurité est faible puisque nous avons obtenu un facteur de 3,84 pour cette même souche cultivée en erlenmeyer. Le facteur 3,2 obtenu lors du passage à la lumière n'est peut être donc pas dû à l'action directe de la lumière mais plutôt à une meilleure adaptation de cette souche aux conditions de culture en bioréacteur aéré et agité.

Le facteur de multiplication de la population cellulaire dans le cas de la souche photomixotrophe est de 3,32. Il était de 2,7 lors de la culture de cette même souche en erlenmeyer.

Cette différence au niveau du facteur de multiplication de la biomasse, entre la culture en erlenmeyer et la culture en bioréacteur, en milieu non renouvelé, est peut être à mettre sur le compte d'une aération renouvelée dans le cas des cultures en réacteur.

En effet, il est bien établi, que la croissance des cultures cellulaires peut être affectée par de faibles teneurs en O_2 (VERMA et MARCUS, 1974 ; PAREILLEUX et VINAS, 1983 ; KATO *et al.*, 1975).

Cependant, une trop forte aération peut également inhiber la croissance ou léser les cellules (HEGARTY *et al.*, 1986).

— pH extracellulaire :

Pendant le cycle de culture des deux souches hétérotrophe et photomixotrophe, cultivées en erlenmeyer et en bioréacteur, les valeurs du pH varient de manière équivalente. On note tout d'abord une acidification du milieu de culture durant la phase de latence et le début de la phase exponentielle, puis une lente alcalinisation. Les valeurs du pH se stabilisent en fin de culture autour de 5,0-5,2. Ces variations ont été généralement reliées à l'absorption des ions NH_4^+ et NO_3^- , différée dans le temps.

— Echanges gazeux :

Il est très difficile, voire impossible, de comparer les valeurs obtenues en erlenmeyer

et en bioréacteur car les méthodes utilisées pour les mesures des échanges gazeux sont totalement différentes ainsi que l'expression des résultats, on se contente donc d'une comparaison qualitative des évolutions.

D'une façon générale, la respiration est maximale pendant la phase de multiplication cellulaire intense, puis diminue lorsque la croissance se ralentit, dans les deux souches.

Durant la croissance de la souche β hétérotrophe en réacteur, on observe une respiration beaucoup plus intense lors du passage à la lumière, en début de la phase exponentielle, par rapport à la culture à l'obscurité. Ensuite cette respiration à la lumière devient très faible ce qui peut-être mis en relation avec un début de verdissement de la culture cellulaire. Son évolution globale est plutôt proche de l'évolution d'une souche mixotrophe que d'une souche hétérotrophe cultivée à l'obscurité.

— *La photosynthèse (suspension photomixotrophe)*

La photosynthèse s'annule en même temps que la chlorophyllogénèse pendant les premiers jours de culture. La photosynthèse et la chlorophyllogénèse réapparaissent ensuite progressivement (lorsque la teneur en glucides du milieu est suffisamment faible) et sont maximales pendant la phase stationnaire.

— *Nutrition carbonée*

La présence des produits de l'hydrolyse du saccharose dans le milieu de culture peut être attribuée à l'existence d'une invertase pariétale déjà observée dans de nombreuses cultures cellulaires (UEDA *et al.*, 1974 ; KANABUS *et al.*, 1986 ; THOM *et al.*, 1981 ; ZAMSKI et WYSE, 1985 ; FOWLER et STEPHAN-SARKISSIAN, 1985).

L'hydrolyse totale du saccharose dans les suspensions cellulaires de *Tephrosia vogelii*, quelle que soit la souche considérée, est réalisée en moins de quatre jours.

Durant le cycle de culture des suspensions hétérotrophes et photomixotrophes (cultivées à la lumière ou à l'obscurité), nous avons pu observer une consommation préférentielle du glucose par rapport au fructose. Ces résultats concordent avec les observations faites par MERILLON *et al.*, (1983) sur les suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*, par DRAPEAU *et al.*, (1986a) sur des cultures en batch de *Dioscorea deltoidea* et également par KATO *et al.*, (1979), sur des cultures de tabac.

Il est intéressant de remarquer toutefois, qu'au cours de la croissance de la souche

photomixotrophe en bioréacteur, on ne note aucune différence dans l'assimilation dans le temps des deux monomères, produits de l'hydrolyse du saccharose. Mais si l'on considère l'intensité du phénomène, le glucose disparaît plus rapidement que le fructose.

Le dosage des glucides intracellulaires, nous a permis de mettre en évidence l'existence de différences importantes de comportement, suivant la souche considérée mais aussi en fonction des conditions de culture utilisées.

Ainsi, les suspensions cellulaires hétérotrophes cultivées en bioréacteur à l'obscurité ont accumulé des glucides durant le cycle de croissance. Par contre ces mêmes suspensions cultivées à la lumière ont utilisé 1/3 de leur réserve après 10 jours de culture.

Le facteur lumière semble jouer un rôle prépondérant sur la croissance et l'assimilation des glucides de suspensions hétérotrophes. Le rendement en masse sèche du saccharose de la souche hétérotrophe est toujours supérieur à la lumière.

Il faut noter cependant que ces différences de comportement entre les deux cultures consécutives, effectuées d'une part à l'obscurité d'autre part à la lumière, sont peut-être à mettre sur le compte d'une meilleure adaptation de la souche (lors du deuxième passage) aux conditions de culture dans un bioréacteur.

Quoique dans certains cas, la concentration en glucides intracellulaires ne soit pas très élevée en fin de culture, il ne nous a pas été possible de faire des recouplements entre arrêt de la croissance et faible teneur en sucres, et cela quelle que soit la souche considérée. Il est tout à fait probable qu'il existe un seuil minimal de mobilisation et d'utilisation des glucides, auquel cas ce paramètre pourrait jouer le rôle de facteur limitant de la croissance.

Des conditions de culture différentes (erlenmeyer-bioréacteur) induisent apparemment des comportements différents vis à vis de la vitesse de consommation des sucres. Dans tous les cas celle-ci est exacerbée en bioréacteur.

— Eléments minéraux :

* Le phosphore inorganique est un élément nutritionnel majeur pour les cellules végétales, impliqué au niveau du métabolisme des acides nucléiques et du métabolisme énergétique en tant que constituant de l'UDP, ADP, ATP...

Le phosphore inorganique est le premier élément à disparaître du milieu de culture, dès le premier jour pour les suspensions hétérotrophes et dès le 4^{ème} jour pour les suspensions mixotrophes. Il n'est donc pas limitant pour la croissance.

Ceci est en accord avec les observations faites sur ces mêmes souches cultivées en erlenmeyer mais également sur les suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* (MERILLON *et al.*, 1983) et sur des cultures de *Saponaria ocymoides* (HENRY *et al.*, 1981).

Le dosage intracellulaire du phosphore inorganique, nous a permis de noter une accumulation transitoire de ces ions durant les premiers jours de culture. Ce pool diminue très rapidement et atteint un minimum en fin de culture de 0,15 mM pour les suspensions hétérotrophes (quelles que soient les conditions de culture) et de 0,5 mM pour les suspensions photomixotrophes. Le Pi est en fait rapidement mobilisé pour le métabolisme et incorporé dans des structures organiques.

* Du point de vue de la nutrition azotée, les ions ammoniums sont consommés préférentiellement aux ions nitrates quelles que soient la souche et les conditions de culture considérées. Des observations identiques avaient été réalisées sur ces mêmes souches cultivées en erlenmeyer ; mais également par MAC CARTHY *et al.*, (1980) et MERILLON *et al.*, (1983), sur des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*.

La teneur résiduelle en nitrates en fin de culture est encore de 10,5 mM pour les suspensions cellulaires hétérotrophes, cultivées à l'obscurité et de 20,4 mM pour celles cultivées à la lumière et de 10 mM pour les suspensions cellulaires photomixotrophes. Cette différence au niveau de la disparition des nitrates du milieu de culture est peut être à mettre sur le compte d'une meilleure adaptation de la souche hétérotrophe lors du 2^{ème} passage en bioréacteur à la lumière.

Il existe une étroite relation entre la disparition totale des ions ammoniums du milieu de culture et l'arrêt de la croissance. Cependant la présence d'un pool intracellulaire de ces ions, 11,5 mM pour la souche hétérotrophe cultivée à l'obscurité et 4,2 mM lors de la culture de cette même souche à la lumière, ne permet pas de conclure au rôle possible de cet élément comme facteur limitant de la croissance. Mais peut-être existe -t-il un seuil de stockage minimum ?

Par contre, la faible teneur en ammonium obtenue en fin de culture par la souche photomixotrophe (0,9 mM) est peut être trop faible pour assurer une croissance normale de la suspension. Il serait intéressant de tester dans ce cas un système d'alimentation en continu.

b) Evolution de la production de roténoïdes :

* Roténoïdes intracellulaires

Un seul pic important d'accumulation de roténoïdes est observé durant le cycle de croissance des suspensions cellulaires hétérotrophes cultivées à la fois à la lumière et à l'obscurité et également pour la souche photomixotrophe.

Dans la souche hétérotrophe, l'accumulation de roténoïdes est exacerbée à la lumière. En effet le maximum de production obtenu au 6^{ème} jour de culture est de 12,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF à la lumière contre 6,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF à l'obscurité, soit le double. Ces mêmes concentrations en roténoïdes rapportées à la masse sèche évoluent dans le même sens.

De même, la production maximale de roténoïdes dans les suspensions cellulaires mixotrophes est de 18,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF soit le triple de la production de la souche hétérotrophe à l'obscurité.

Cette stimulation de l'accumulation de roténoïdes à la lumière a déjà été observée et discutée dans le paragraphe traitant de l'évolution de la croissance et de la production de roténoïdes en erlenmeyer.

Ces résultats obtenus ici confortent l'idée que le facteur lumière est indispensable pour l'expression optimale de la production de roténoïdes.

Cependant, il est intéressant de remarquer à ce propos que l'accumulation de roténoïdes à la lumière dans les suspensions hétérotrophes diffère de celle observée dans les suspensions photomixotrophes.

Ainsi, le seul facteur lumière ne permet pas de restaurer l'accumulation de roténoïdes obtenue dans la souche chlorophyllienne. Les cultures successives à l'obscurité ont peut-être engendré des modifications irréversibles à l'échelle cellulaire et subcellulaire, notamment au niveau des chloroplastes. Or, d'après la littérature, il semblerait que certaines étapes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes soient réalisées au niveau des chloroplastes (ALIBERT *et al.*, 1977 ; HANSON et HAVIR, 1981).

Des observations, en microscopie électronique à la fois sur des suspensions hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*, s'avèrent donc nécessaires, afin de vérifier l'efficacité potentielle de ces organites.

* Roténoïdes extracellulaires

Le dosage des roténoïdes extracellulaires a été hélas très décevant, et cela quelles que

soient la souche considérée et les conditions de culture : lumière/obscurité. En effet, leur présence dans le milieu de culture s'est avérée trop faible pour réaliser un dosage par HPLC représentatif. Aucune conclusion ne pourra donc être donnée quant aux conditions de culture (lumière/obscurité) favorisant la présence de ces composés dans le milieu de culture.

D) CONCLUSIONS

Au cours de cette étude, nous avons pu dans un premier temps, caractériser la croissance en relation avec la production de roténoïdes, de cals chlorophylliens et hétérotrophes de *Tephrosia vogelii*.

Ces premiers résultats nous ont permis de montrer que les cinétiques de croissance et le taux de multiplication des cals hétérotrophes ou chlorophylliens sont similaires. La croissance ne semble pas significativement modifiée par la présence ou l'absence du facteur lumière. Les courbes de croissance obtenues montrent, après une phase exponentielle, l'apparition d'une phase ralentie attribuable à une déficience nutritionnelle qui permet de définir la périodicité des repiquages pour chaque souche (toutes les trois semaines). Dans les deux cas, la biosynthèse de roténoïdes est maximale pendant la phase exponentielle de croissance ; mais les cals chlorophylliens synthétisent des teneurs beaucoup plus importantes de roténoïdes (dont 75 % de roténone) que les cals hétérotrophes chez lesquels la roténone est minoritaire (15 % des roténoïdes totaux).

Ceci est un préliminaire indispensable à la suite de notre étude, ces cals servant d'inoculum pour les suspensions cellulaires, matériel plus homogène pour effectuer des études physiologiques.

Les principaux résultats portant sur la caractérisation des suspensions cellulaires hétérotrophes ou photomixotrophes cultivées en fiole d'Erlenmeyer ou en bioréacteur sont résumés dans le tableau VII. Ils permettent de mettre en évidence les faits suivants :

— Les suspensions cellulaires hétérotrophes ont une croissance et un métabolisme très intense. La vitesse de disparition des éléments nutritifs du milieu est environ deux fois plus rapide dans la souche hétérotrophe que dans la souche photomixotrophe cultivée en Erlenmeyer.

— Le saccharose du milieu est totalement hydrolysé et le glucose est consommé

TABLEAU : VII

ETUDE COMPARATIVE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES
HETEROTROPHES ET PHOTOMIXOTROPHE DE *TEPHROSIA VOGELII*
EN ERLLENMEYER ET EN BIOREACTEUR

	Suspension mixotrophe en erlen	Suspension hétérotrophe en erlen	Suspension mixotrophe en bioréacteur	Suspension hétérotrophe en bioréacteur OBSC. LUM.	
Durée de la phase de latence (jours)	2	1	2	2	1
Facteur de multiplication de la biomasse	2,69	3,84	3,36	2,4	3,2
Productivité en biomasse g.MS.j ⁻¹ l ⁻¹	0,5	1,1	0,6	1,01	1,34
Td (heures)	56	65	52,7	61,1	61,3
Chloro (a+b) (µg.g ⁻¹ MS)	1,4	1,7	-	-	-
NH ₄ ⁺ * (µmole.j ⁻¹ .g ⁻¹ MS)	195	335	393	272	342,5
NO ₃ ⁻ * (µmole.j ⁻¹ .g ⁻¹ MS)	124,2	303	258	259	224,3
SO ₄ ⁻ * (µmole.j ⁻¹ .g ⁻¹ MS)	18,4	22,2	13,4	40,3	33
Rendement de conversion du saccharose (%)	39	46	48,5	36	40
Roténone int (µg.g ⁻¹ MF)	5,2	0,024	7,5	-	-
Roténoïdes totaux intracellulaires Max. (µg.g ⁻¹ MF)	8	3,42	19	7	12
Période de production Maximale (jour)	8ème	7ème	12ème	7-8ème	7-8ème
Roténoïdes totaux extracellulaires Max. µg.ml ⁻¹ milieu	0,75	1,42	0	0	0
Période de production Maximale (jour)	8ème	7ème	-	-	-

* Les valeurs données dans ce tableau correspondent à une vitesse de consommation des éléments minéraux calculées selon la formule suivante :

$$v = \frac{\Delta E}{\Delta J \times \Delta MS}$$

préférentiellement au fructose dans les deux souches et quelles que soient les conditions de culture.

__ les ions ammoniums sont consommés préférentiellement aux ions nitrates dans les deux souches et les deux types de culture.

__ Il ne nous a pas été possible de déterminer le facteur limitant la croissance. Il apparaît toutefois clairement, que la disparition totale des ions ammoniums du milieu correspond dans bien des cas, à l'arrêt de la croissance. Le pool interne d'ammonium mis en évidence dans les cellules en fin de culture est peut être trop faible pour assurer une croissance.

__ Dans le cas de la souche photomixotrophe, la croissance semble être un peu améliorée lors du passage en bioréacteur. Le métabolisme primaire semble plus actif, les vitesses de consommation des éléments minéraux en témoignent, ainsi que l'assimilation plus rapide des glucides. Ces améliorations au niveau du métabolisme primaire sont certainement liées au mode d'agitation et d'aération, l'apport d'O₂ en bioréacteur étant bien supérieur à celui dont pouvait bénéficier les cellules en Erlenmeyer.

Pour la souche hétérotrophe, le passage en bioréacteur n'a pas entraîné de modifications positives sur la croissance, au contraire. Il semblerait que les cellules se soient mal adaptées à ces nouvelles conditions de culture. Lors du 2^{ème} cycle, la croissance et le métabolisme se sont révélés plus intenses, ceci étant dû, soit au facteur lumière, soit à une meilleure adaptation aux conditions de culture en bioréacteur.

__ Les cinétiques de production de roténoïdes intracellulaires sont similaires dans les deux types de suspensions cultivées en Erlenmeyer ou en bioréacteur (maximum en milieu ou fin de phase exponentielle) ; cependant la souche photomixotrophe en synthétise deux fois plus, essentiellement (65 %) sous forme de roténone, alors que la souche hétérotrophe synthétise surtout de la dégueline. Par ailleurs, la synthèse des roténoïdes (dégueline majoritaire) est activée à la lumière chez les suspensions hétérotrophes cultivées en bioréacteur.

__ Le passage de la culture en Erlenmeyer (atmosphère confinée) à la culture en bioréacteur aéré se traduit par une amélioration de la production ; cependant, contrairement au mode de culture en erlen, aucun des roténoïdes synthétisé n'est retrouvé dans le milieu de culture en réacteur. Cette absence de roténoïdes extracellulaires a en fait été observée au cours des repiquages et ne semble pas être rattachée au passage en bioréacteur. Elle pourrait par contre être corrélée aux modifications structurales des suspensions intervenant

au cours des repiquages : les cultures cellulaires initiées depuis peu de temps s'organisent souvent sous forme d'agrégats.

CHAPITRE IV :

ESSAIS D'OPTIMISATION DE LA
PRODUCTION DE ROTENOÏDES PAR
DES SUSPENSIONS CELLULAIRES
DE TEPHROSIA VOGELII

CHAPITRE IV : ESSAIS D'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES PAR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE *TEPHROSIA VOGELII*

A) INTRODUCTION

L'utilisation industrielle des cellules cultivées *in vitro* pour la production de métabolites secondaires est actuellement peu développée, car les substances recherchées sont la plupart du temps présentes en trop faible quantité.

Seulement quelques procédés industriels ont été mis en place et sont encore actuellement en exploitation. Le plus bel exemple est celui de la production de shikonine mais également de dérivés de la shikonine, par des suspensions cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon*, au Japon (FUJITA *et al.*, 1983). Ces composés sont utilisés comme colorants, cosmétiques et également en pharmacie.

De ce fait, les conditions d'optimisation de la biosynthèse de métabolites secondaires *in vitro*, ont été largement étudiées ces dernières années.

D'importantes recherches ont été effectuées pour définir les conditions optimales de cultures favorisant l'expression du métabolisme secondaire :

- _ source carbonée (BALAGUE et WILSON, 1982 ; KNOBLOCH et BERLIN, 1980 ; MIZUKAMI *et al.*, 1977 ; OZEKI et KOMAMINE, 1985)

- _ source azotée (YAMAKAWA *et al.*, 1983 ; TAL et GOLDBERG, 1982 ; FUJITA *et al.*, 1981a)

- _ phosphates (BALAGUE et WILSON, 1982 ; KNOBLOCH et BERLIN, 1983)

- _ hormones de croissance (TABATA *et al.*, 1982 ; MATSUMOTO *et al.*, 1973 ; OZEKI et KOMAMINE, 1986)

- _ lumière (BRUNET et IBRAHIM, 1973 ; KREUZALER et HAHLBROCK, 1973 ; KNOBLOCH *et al.*, 1982 ; SUZUKI *et al.*, 1981) ...

Il est clair que des conditions qui sont optimales pour la croissance ne le sont pas toujours pour la production de métabolites secondaires.

En effet, il existe souvent un antagonisme entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire.

Aussi ces dernières années, se sont développées des cultures en deux stades pour la production de métabolites secondaires : un premier milieu stimulant la croissance et un deuxième milieu favorisant l'expression du métabolisme secondaire (FUJITA *et al.*, 1981a, b ; ZENK *et al.*, 1977).

De nombreux efforts ont été également réalisés afin d'élucider les voies de biosynthèse des métabolites secondaires ainsi que leur mode de régulation (IBRAHIM, 1987 ; KUTNEY *et al.*, 1985 ; FAHN *et al.*, 1985).

A ce propos, la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est l'une des voies les plus étudiées ces dernières années, par le biais de suspensions cellulaires de *Phaseolus vulgaris* prises comme modèle, synthétisant des phytoalexines isoflavonoïdes (DIXON et BOLWELL, 1986).

Un facteur essentiel (qui a été également beaucoup étudié), pouvant stimuler la production de métabolites secondaires, est l'ajout de précurseurs biosynthétiques (ZENK *et al.*, 1977).

L'emploi d'éliciteurs (procédé relativement nouveau) offre une nouvelle approche pour une obtention rapide de métabolites secondaires.

Son application possible sur le plan industriel et commercial, dans l'induction de métabolites secondaires, d'importance économique, a été discutée par DICOSMO et TALLEVI, 1985.

Nous nous sommes proposés, pour notre part, de faire des essais d'optimisation de la production de roténoïdes par deux approches différentes et éventuellement complémentaires :

- incorporation de précurseurs : en l'occurrence la L-Phénylalanine
- effet de différents stress par ajout d'éliciteurs au milieu de culture ou par modifications des conditions de culture (ajout de NaCl, ajout d'éliciteurs pathogènes, ajout d'éthrel, modifications du pH du milieu de culture).

B) INCORPORATION DE PRECURSEURS

MARGNA (1977), à la suite d'expériences faites sur la régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes, suggère que l'accumulation de flavonoïdes et d'autres dérivés polyphénoliques n'est pas un processus contrôlé seulement par la teneur en enzyme. Elle serait surtout directement dépendante de la quantité disponible en L-phénylalanine.

1) Matériel utilisé

Des essais d'incorporation de L-phénylalanine ont d'abord été effectués sur des cals

hétérotrophes et photomixotrophes, afin de mettre au point ultérieurement un protocole de manipulation sur les suspensions cellulaires. Les différents résultats obtenus nous ont permis de transposer ces techniques sur les suspensions cellulaires, matériel plus homogène et plus adapté pour la production de métabolites secondaires (protocole donné dans le chapitre Matériel et Méthodes).

* Suspensions cellulaires hétérotrophes : souche cultivée à l'obscurité, ayant subi 39 repiquages sur le milieu décrit dans le chapitre "Matériels et Méthodes".

* Suspensions cellulaires photomixotrophes : souche β , cultivée à la lumière, ayant subi 10 repiquages.

Les erlens sont utilisés 24 heures après l'incorporation de phénylalanine dans les suspensions hétérotrophes et 48 heures après dans les suspensions mixotrophes. Les paramètres suivants sont analysés :

- pH extracellulaire ;
- masse fraîche ;
- roténoïdes intracellulaires ;
- roténoïdes extracellulaires ;

2) Résultats

Remarque :

La L-phénylalanine apportée à la concentration de 10 mM est létale pour les cultures (cals et suspensions) et cela quelles que soient la souche considérée et les conditions de culture utilisées (lumière ou obscurité).

Cette observation avait déjà été faite par THORPE et al., (1971) sur des cals de Citrus paradisi, et par MIZUKAMI et al., (1977) sur des cals de Lithospermum erythrorhizon

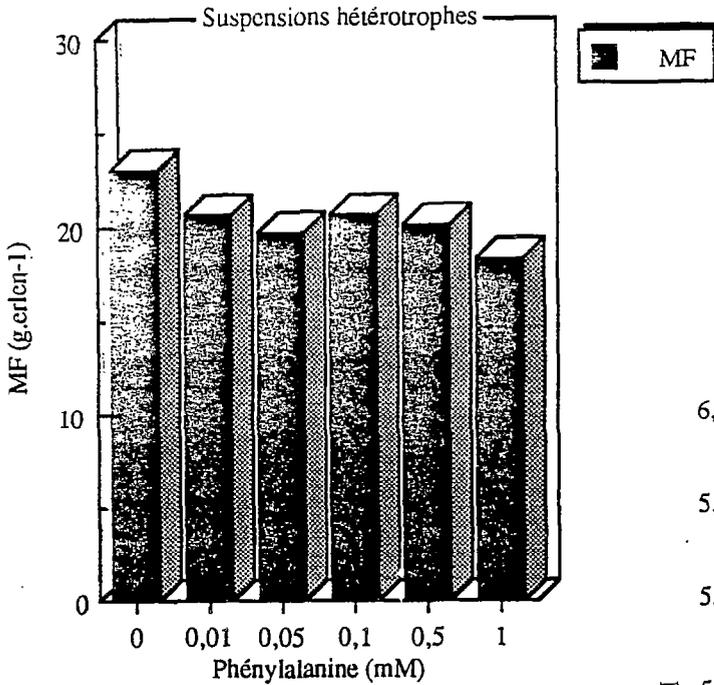
a) Souche hétérotrophe :

Les résultats présentés dans ce paragraphe correspondent à 3 répétitions.

— Evolution de la masse fraîche (figure 73)

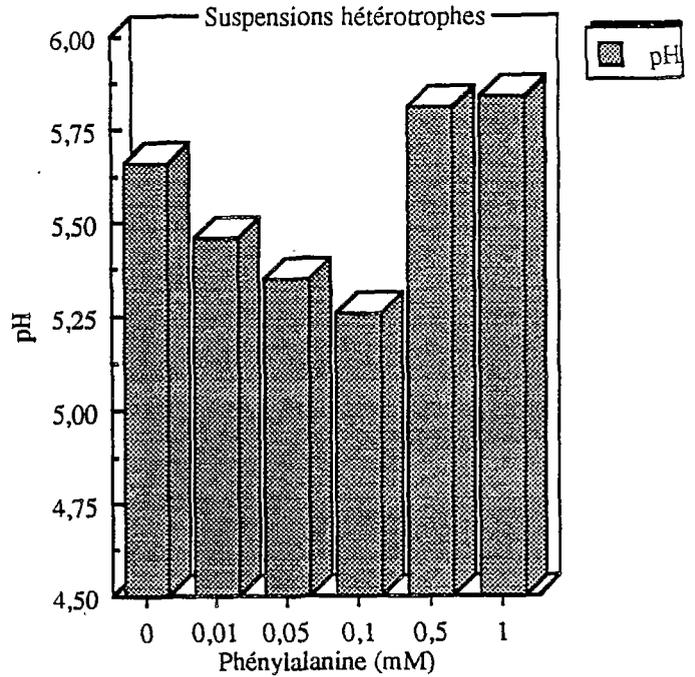
On observe, sur la croissance, un effet plutôt négatif de l'ajout de L-phénylalanine dans le milieu de culture (tout de même pas très significatif). Les valeurs de la masse fraîche sont inversement proportionnelles à la concentration en L-phénylalanine dans le

Figure 73 :



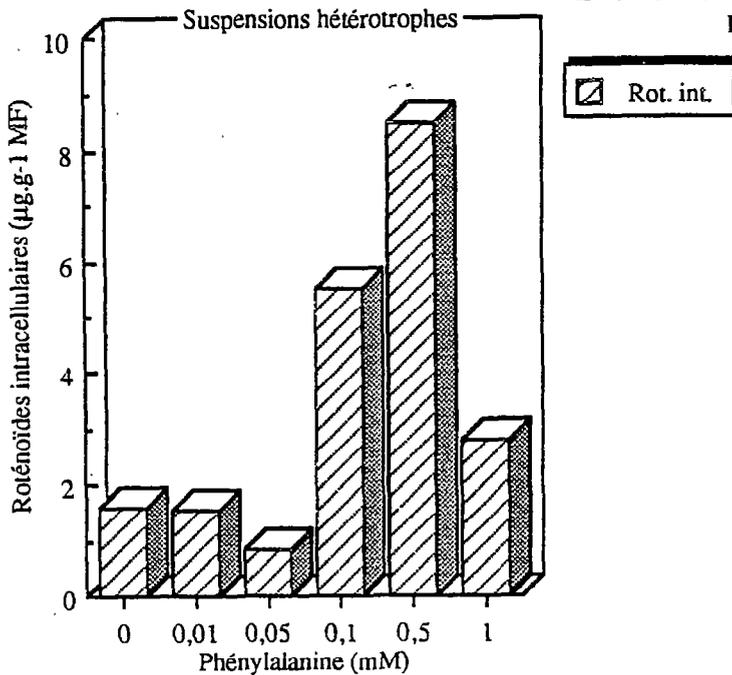
EVOLUTION DE LA BIOMASSE 24 H APRES L'INCORPORATION DE PHENYLALANINE

Figure 74 :



EVOLUTION DU PH 24 H APRES INCORPORATION DE PHENYLALANINE

Figure 75 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES 24 H APRES L'INCORPORATION DE PHENYLALANINE

milieu. Ainsi le maximum de croissance est obtenu par le témoin (23,1 g/erlen) et le minimum en présence de L-phénylalanine à la concentration de 1 mM (18,3 g/erlen).

— *Evolution du pH extracellulaire* (figure 74)

On note une légère acidification du milieu de culture en présence de faible concentration en L-phénylalanine (0,01 mM, 0,05 mM et 0,1 mM). Le maximum de variation obtenu est de 0,4 unité pH (5,26 pour 0,1 mM contre 5,66 pour le témoin).

Par contre, de fortes concentrations en L-phénylalanine (0,5 mM et 1 mM) entraînent plutôt une alcalinisation du milieu de culture (pH de 5,84). Il est cependant difficile de se prononcer quant à la signification de ces variations.

— *Evolution de la production de roténoïdes* (figure 75)

Les teneurs en roténonnes sont tellement faibles que nous n'exprimerons les résultats qu'en fonction des roténoïdes totaux.

On observe un effet fortement positif de l'apport de L-phénylalanine au milieu de culture aux concentrations de 0,5 mM et 0,1 mM. Cet effet est beaucoup plus marqué à 0,5 mM où la production de roténoïdes totaux est multipliée par 5,38 au lieu de 3,5 à 0,1 mM par rapport au témoin.

On peut également noter qu'à la concentration de 1 mM un effet légèrement positif est observé : la teneur en roténoïdes totaux est multipliée par 1,8.

b) Souche photomixotrophe

— *Evolution de la masse fraîche* : (figure 76)

Contrairement à la souche β hétérotrophe, on observe un effet plutôt positif sur la croissance de l'ajout de L-phénylalanine au milieu de culture.

En effet, la masse fraîche est de 13 g/erlen en présence de 0,5 mM et de 12,1 g/erlen en présence de 1 mM de L-phénylalanine contre 8 g/erlen dans le témoin.

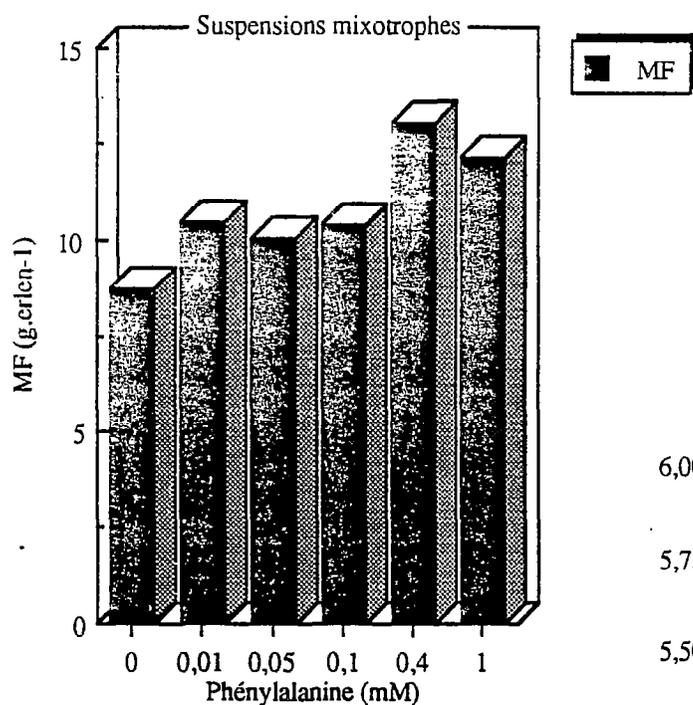
— *Evolution du pH extracellulaire* : (figure 77)

Le pH du milieu de culture des suspensions photomixotrophes est très peu modifié en présence des différentes concentrations en L-phénylalanine.

— *Evolution de la production de roténoïdes* : (figure 78)

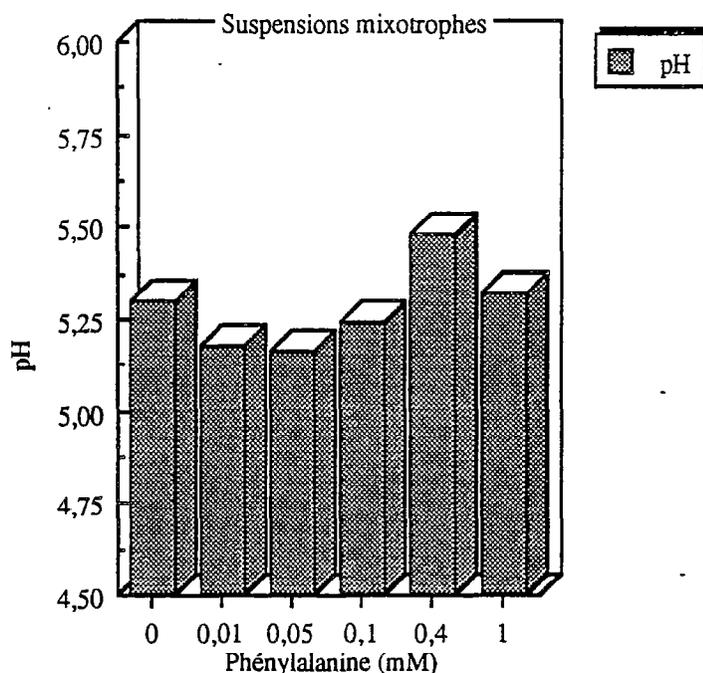
Un effet positif de l'ajout de L-phénylalanine dans le milieu de culture sur la

Figure 76 :



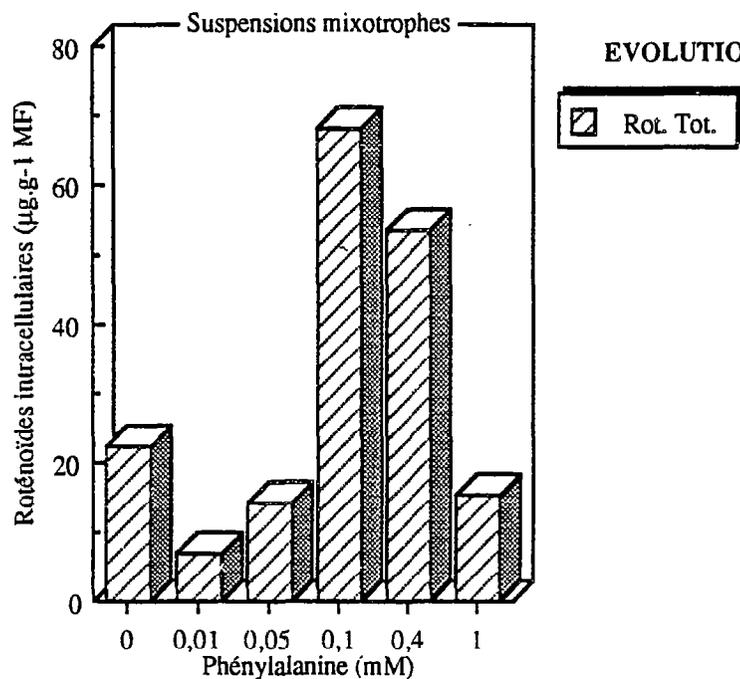
EVOLUTION DE LA BIOMASSE 48 H APRES L'INCORPORATION DE PHENYLALANINE

Figure 77 :



EVOLUTION DU PH 48 H APRES L'INCORPORATION DE PHENYLALANINE

Figure 78 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES 48 H APRES INCORPORATION DE PHENYLALANINE

production de roténoïdes est obtenu à la concentration de 0,1 mM et 0,5 mM.

L'accumulation de roténoïdes est alors multipliée par 3 par rapport au témoin à 0,1 mM et par 2,4 à 0,5 mM.

La teneur en roténone représente seulement 12 % des roténoïdes totaux et suit les mêmes variations que les roténoïdes totaux, en fonction de la concentration en L-phénylalanine du milieu.

3) Comparaison-Discussion

* On note des modifications au niveau du pH extracellulaire tout à fait différentes en fonction de la souche considérée.

Ainsi, la souche β photomixotrophe ne présente aucune variation significative du pH du milieu de culture quelle que soit la concentration en L-phénylalanine.

Par contre, la souche β hétérotrophe semble être un peu plus affectée par l'ajout de ce précurseur. A faible concentration en phénylalanine on note une légère acidification du milieu de culture et à forte concentration on observe, au contraire, une certaine alcalinisation. Les milieux de culture *in vitro* sont des milieux très peu tamponnés, ce qui pourrait permettre d'expliquer en partie les fortes variations de pH lors de l'ajout d'un composé tel que la L-phénylalanine.

Cependant cela n'explique pas les différences de comportement des deux souches. Il semblerait qu'il y ait alors des raisons d'ordre physiologique.

* L'évolution de la masse fraîche en présence de différentes concentrations en précurseur dépend également de la souche considérée.

Ainsi, dans la souche hétérotrophe on observe un effet plutôt négatif de l'apport de L-phénylalanine sur la croissance.

Par contre l'ajout de précurseur dans des cultures photomixotrophes semble stimuler le métabolisme primaire.

On peut considérer que l'apport de L-phénylalanine exacerbe un antagonisme entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire. En effet ce précurseur se trouve à la charnière entre ces deux voies de biosynthèse. Suivant les conditions du milieu, la L-phénylalanine serait plutôt incorporée pour la synthèse des protéines ou plutôt assimilée *via* la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

* Quelle que soit la souche considérée, on observe un effet positif de l'apport de

L-phénylalanine à la concentration de 0,1 mM et de 0,5 mM, sur la production de roténoïdes intracellulaires.

Cette observation est en accord avec les résultats de MIZUKAMI *et al.* (1977) qui notent une stimulation de la production de shikonine en présence de L-phénylalanine dans des cultures de *Lithospermum erythrorhizon*.

De même, RAZZAQUE et ELLIS, (1977) et ZENK *et al.* (1977) ont rapporté que la L-Phénylalanine, administrée à des cultures cellulaires de *Coleus blumei*, est transformée en acide rosmarinique.

Cet effet positif de l'incorporation de la L-phénylalanine, observé ici sur la production de roténoïdes à la fois dans les cultures hétérotrophes et photomixotrophes, confirme l'idée de MARGNA (1977) de l'importance du pool interne en substrat sur la régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

On note cependant une accumulation en roténoïdes totaux toujours beaucoup plus importante chez les cultures photomixotrophes que chez les cultures hétérotrophes, et cela quelles que soient les concentrations de phénylalanine exogènes. D'autres facteurs limitants que la concentration en substrat, interviennent au niveau de la régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, dont notamment le facteur lumière *via* la PAL. Des mesures d'activité spécifique de la PAL sur notre matériel végétal cultivé *in vitro* apparaissent donc nécessaires (cf. Chapitre V).

C) EFFETS DES STRESS

Un grand nombre d'espèces végétales accumulent, en réponse à une attaque par un agent pathogène, des métabolites secondaires définis comme étant des phytoalexines (KUC, 1972 ; PAXTON, 1981) qui constituent un facteur de défense important pour la plante (DARVILL et ALBERSHEIM, 1984).

Lors de l'étude de l'induction de l'accumulation de phytoalexines, il s'est avéré que les composés issus du pathogène avaient les mêmes effets que le pathogène lui-même. Le nom d'éliciteur a alors été donné à ces composés (KEEN *et al.*, 1972).

Les stress physiques et chimiques, comme les irradiations UV, les fortes ou basses températures, les fortes concentrations en sels, éthylène, fongicides, antibiotiques, métaux lourds, ... peuvent également induire l'accumulation de métabolites. Ce sont donc des agents stressants, appelés encore éliciteurs abiotiques (YOSHIKAWA, 1978 ; MOESTA et GRISEBACH, 1981 ; TIETJEN et MATERN, 1983 ; TIETJEN *et al.*, 1983 ; DAVIS *et al.*, 1986).

Dans le but de stimuler la production de roténoïdes, et également, d'essayer de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation des composés synthétisés à la suite de stress, nous avons effectué plusieurs traitements sur nos cultures:

__ stress d'origine biotique : - éliciteurs pathogènes

__ stress d'origine abiotique : - modification du pH du milieu de culture
- fortes concentrations en sels
- éthrel (générateur d'éthylène)

1) Stress d'origine biotique

a) éliciteurs pathogènes

__ *Matériel végétal utilisé*

* Suspensions cellulaires hétérotrophes : souche β cultivée à l'obscurité, ayant subi 44 repiquages sur le milieu décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

* Suspensions cellulaires photomixotrophes : souche β , cultivée à la lumière, ayant subi 11 repiquages.

__ *Protocole*

Les éliciteurs pathogènes sont préparés suivant le protocole donné dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

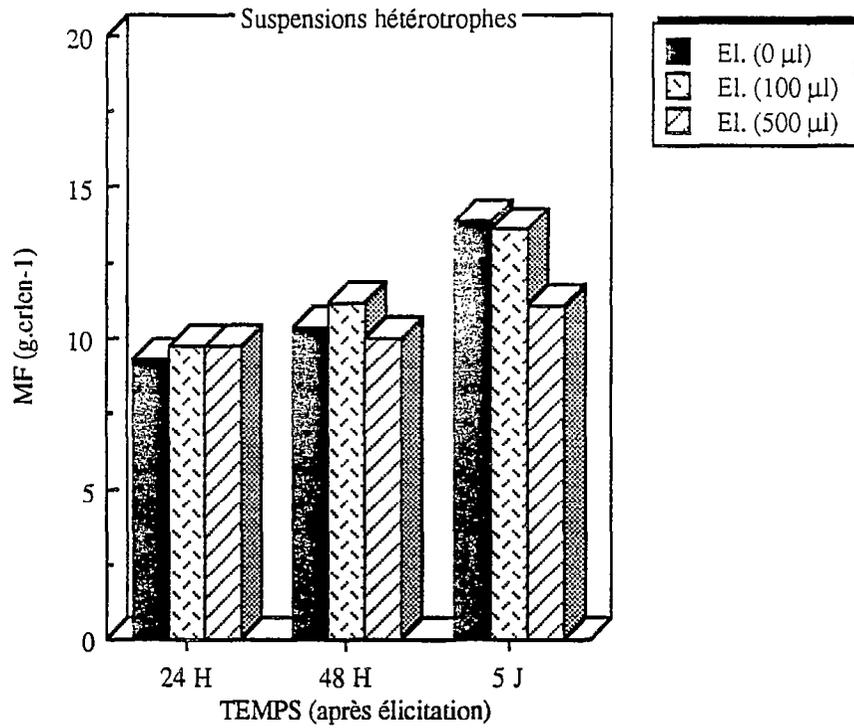
Les éliciteurs isolés au Laboratoire ont tout d'abord été testés sur un large éventail de matériel, afin de déterminer l'éliciteur le plus prometteur pour des études plus fines sur les mécanismes de stimulation et de régulation de la production de roténoïdes.

Des cals et des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes ont été cultivés en présence de quatre éliciteurs différents : 123A, 123B, 127A et 127B (cf "Matériel et Méthodes"). 100 μ l de solution mère diluée de moitié ont été ajoutés au milieu de culture avant l'autoclavage.

Les Erlenmeyers sont utilisés à des temps différents correspondant au maximum de production de la culture considérée.

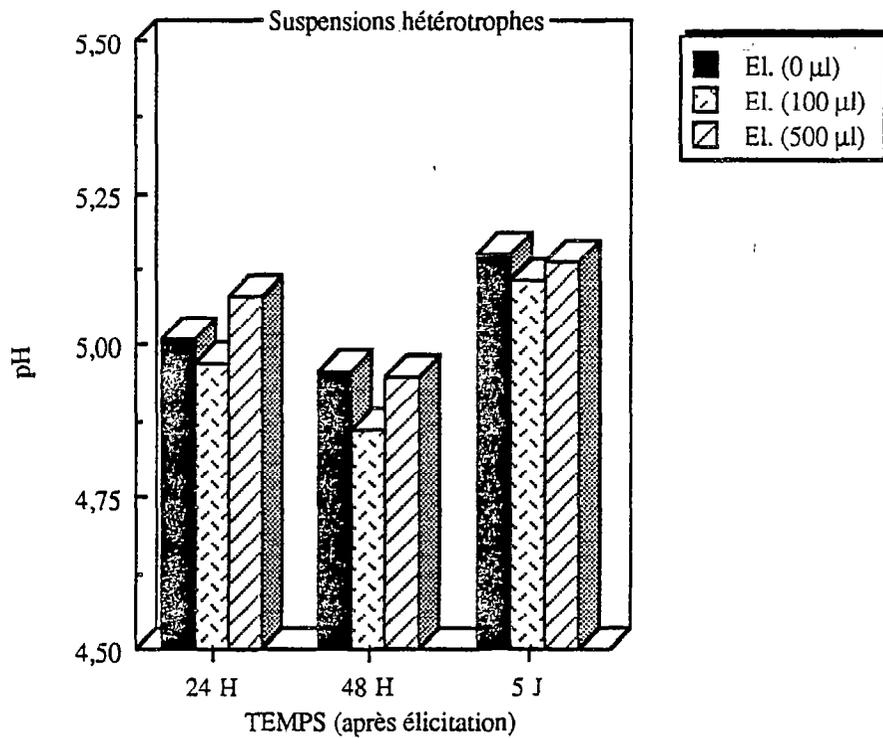
les résultats obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Figure 79 :



**EVOLUTION DE LA BIOMASSE APRES ELICITATION
DANS DES SUSPENSIONS HETEROTROPHES**

Figure 80 :



**EVOLUTION DU PH APRES ELICITATION
DANS DES SUSPENSIONS HETEROTROPHES**

Production de roténoïdes	Eliciteurs			
	123A	123B	127A	127B
Cals hétérotrophes	+	+	-	-
Cals photomixotrophes	0	-	0	+
Suspensions hétérotrophes	-	-	-	
Suspensions photomixotrophes	+	++	-	-

Légende :
 + : effet stimulateur
 0 : aucun effet
 - : effet inhibiteur

Après examen des résultats portés dans ce tableau, l'éliciteur 123B a été retenu car il est apparemment un des plus intéressants. L'ensemble des manipulations qui vont suivre seront donc effectuées en présence de cet éliciteur.

Les Erlenmeyers sont utilisés 24 heures, 48 heures puis 5 jours après l'élicitation.

Les paramètres suivants sont analysés :

- pH extracellulaire ;
- masse fraîche ;
- roténoïdes intracellulaires ;
- roténoïdes extracellulaires.

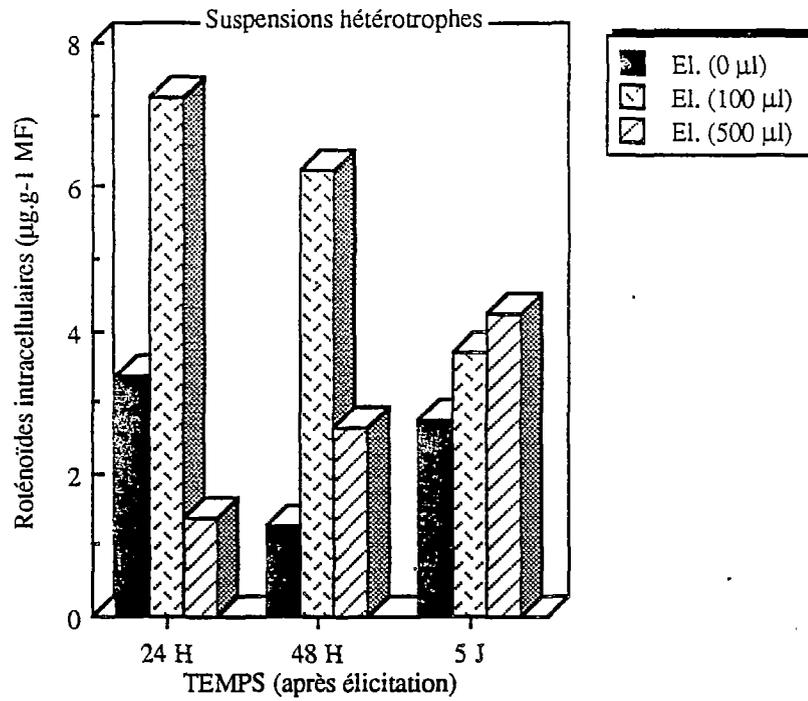
— Résultats

*SOUCHE HÉTÉROTROPHE

** Evolution de la masse fraîche : (figure 79)

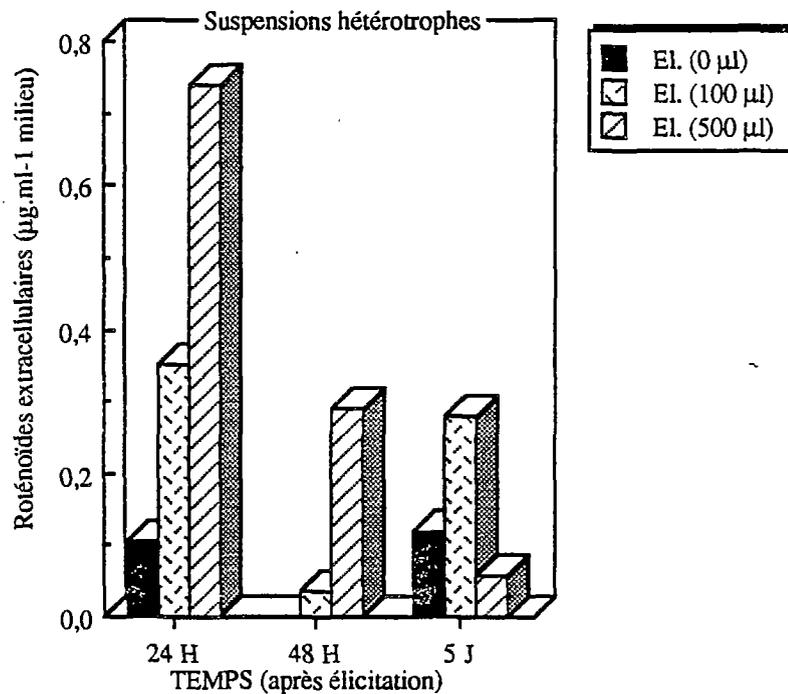
La présence d'éliciteur dans le milieu de culture après l'élicitation, n'entraîne pas de modification significative au niveau de la masse fraîche. Seule une légère inhibition peut être observée aux fortes concentrations au temps 5 jours.

Figure 81 :



**EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES
INTRACELLULAIRES APRES ELICITATION**

Figure 82 :



**EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES
EXTRACELLULAIRES DANS DES SUSPENSIONS HETEROTROPHES**

**** Evolution du pH extracellulaire**

L'évolution du pH extracellulaire 24 heures, 48 heures et 5 jours après l'élicitation, est donnée dans la figure 80.

Aucune modification significative au niveau du pH extracellulaire n'est observable au cours du temps.

**** Evolution de la production totale de roténoïdes : (figures 81, 82 et 83)**

On observe un effet stimulateur de l'apport d'éliciteur 123 B sur la production totale de roténoïdes (exprimée en µg/erlen) aux deux concentrations testées et cela 24 heures, 48 heures et 5 jours après le traitement.

Cet effet est plus particulièrement marqué 24 heures et 48 heures après l'élicitation à la concentration intermédiaire de 100 µl (la production est multipliée par 2,5 et 7 respectivement).

La stimulation de la production de roténoïdes en présence d'éliciteur est détectable à la fois au niveau des concentrations intracellulaires et extracellulaires, excepté 24 heures après le traitement en présence de 500 µl de solution 123 B où la teneur en roténoïdes intracellulaires est largement diminuée.

Si l'on considère la répartition intra et extracellulaire de ces composés, on note, 24 heures après l'apport de 500 µl d'éliciteur, une très forte proportion de roténoïdes dans le milieu de culture (environ 80 % des roténoïdes totaux). Cette importante concentration en roténoïdes extracellulaires a tendance à diminuer au cours du temps (50% 48 heures après le traitement et 10 % 5 jours après).

Par contre, lors de l'apport de 100 µl d'éliciteur, on note une répartition des roténoïdes complètement inversée. Les roténoïdes extracellulaires ne représentent jamais plus de 30 % des roténoïdes totaux.

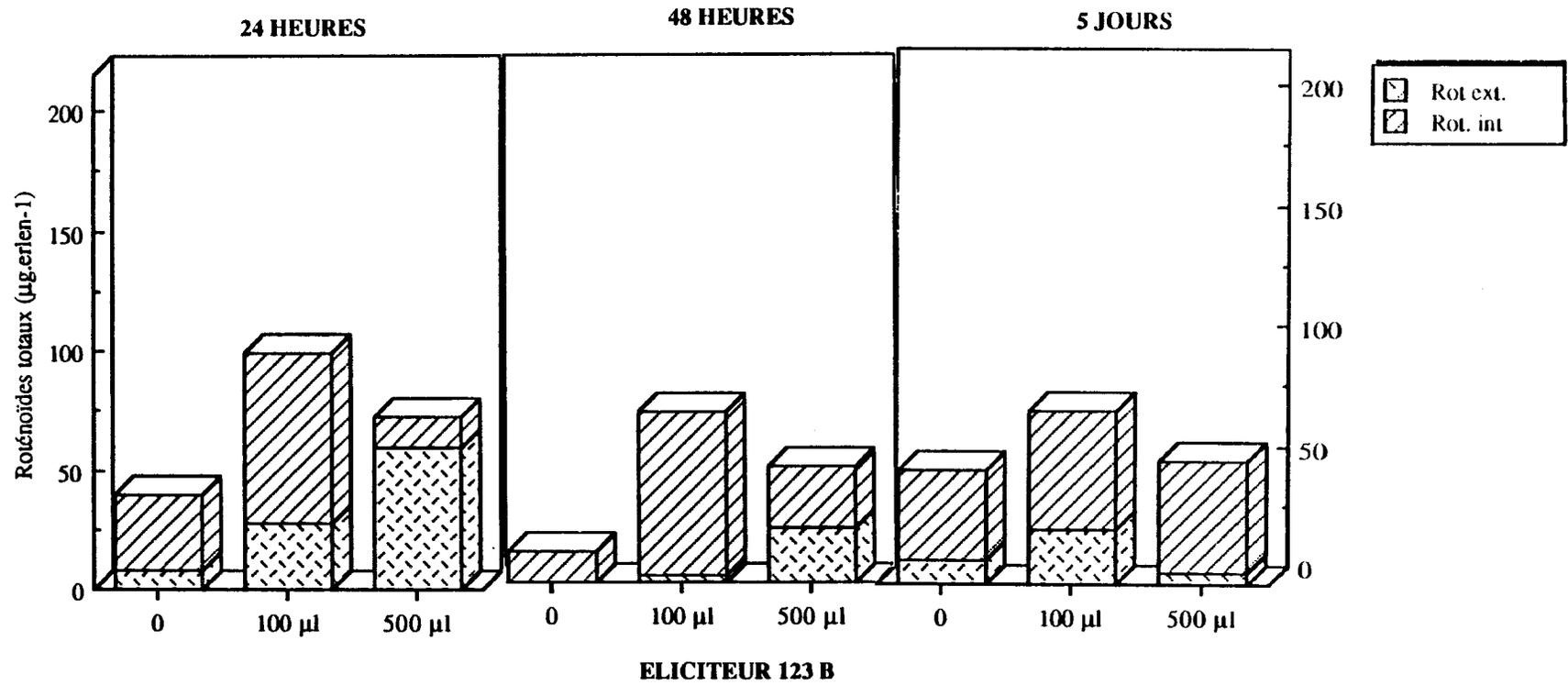
***SOUUCHE PHOTOMIXOTROPHE**

**** Evolution de la masse fraîche : (figure 84)**

La présence d'éliciteur dans le milieu de culture à deux concentrations différentes (100 et 500 µl), 24 heures après l'élicitation, n'entraîne pas de modification au niveau de la masse fraîche.

A faible concentration en éliciteur (100 µl), l'évolution de la croissance n'est pas affectée par rapport au témoin et cela 48 heures et 5 jours après l'élicitation.

Figure 83 :



**EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES PAR ERLLEN DANS LES
SUSPENSIONS HETEROTROPHES APRES ELICITATION**

On observe par contre un effet légèrement négatif sur la croissance, 48 heures après l'ajout de 500 µl d'éliciteur 123 B.

**** Evolution du pH extracellulaire**

L'évolution du pH extracellulaire 24 heures, 48 heures et 5 jours après l'élicitation, est donnée dans la figure 85.

On note seulement une légère alcalinisation du milieu de culture 24 heures après l'ajout de 500 µl d'éliciteur (5,31 contre 5,18).

**** Evolution de la production totale de roténoïdes : (figures 86, 87 et 88)**

La présence d'éliciteur dans le milieu de culture à la concentration de 100 et 500 µl stimule la production globale de roténoïdes 24 heures, 48 heures et 5 jours après le traitement. Cette stimulation de la production est plus marquée 48 heures après l'élicitation (x 2,5).

La teneur en roténoïdes extracellulaires est augmentée quels que soient la concentration en éliciteur et le temps considéré après le traitement, excepté 24 heures après l'apport de 500 µl de solution 123 B.

De même les teneurs en roténoïdes intracellulaires sont stimulées en présence d'éliciteur (de manière parfois un peu moins spectaculaire), excepté 5 jours après traitement en présence de 500 µl de solution 123 B.

La proportion de roténoïdes extracellulaires par rapport aux roténoïdes intracellulaires atteint parfois 70 % mais est souvent plus proche de 50 %, en présence de 100 et 500 µl d'éliciteur.

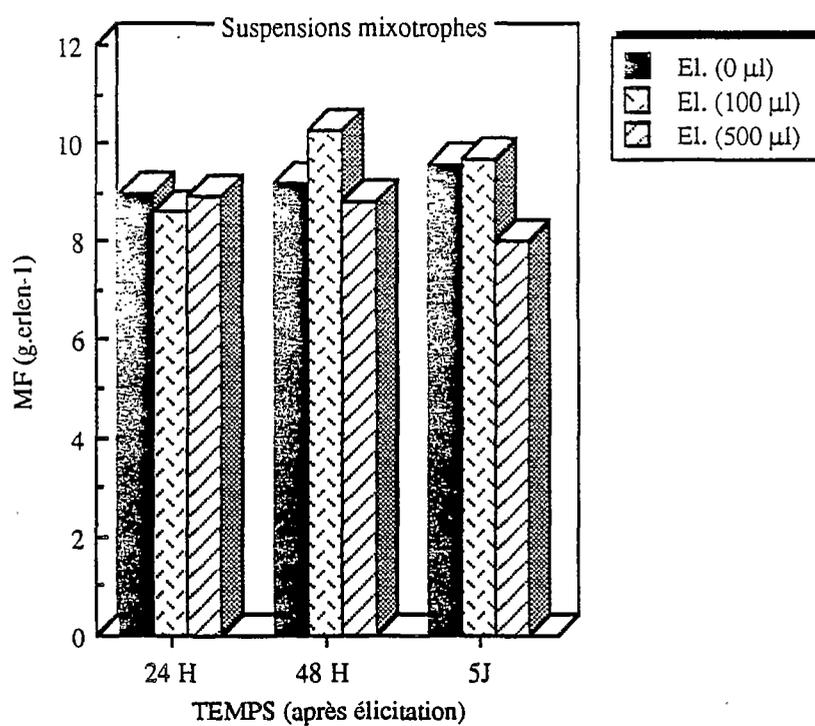
— Comparaison-Discussion

* On ne note pas de modifications importantes au niveau du pH extracellulaire 24 heures, 48 heures et 5 jours après l'ajout de différentes concentrations en éliciteur (100 et 500 µl) et cela quelle que soit la souche considérée.

Seule une légère alcalinisation du milieu de culture est observée 24 heures après l'ajout de 500 µl d'éliciteur 123 B.

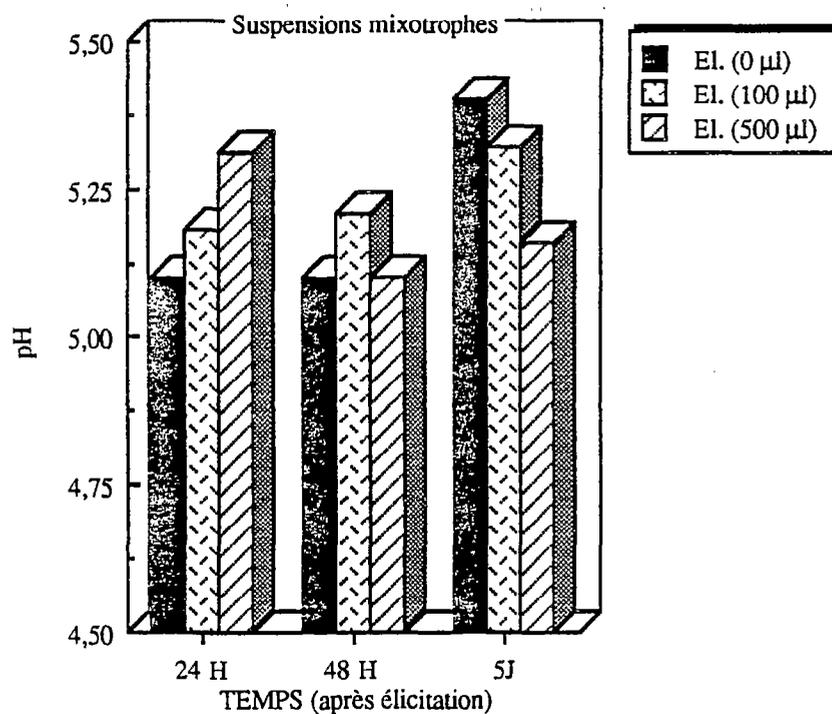
* L'apport de faibles concentrations en éliciteur (100 µl) n'a apparemment aucun effet sur l'évolution de la masse fraîche 24 heures, 48 heures et 5 jours après le traitement, quelle que soit la souche considérée.

Figure 84 :



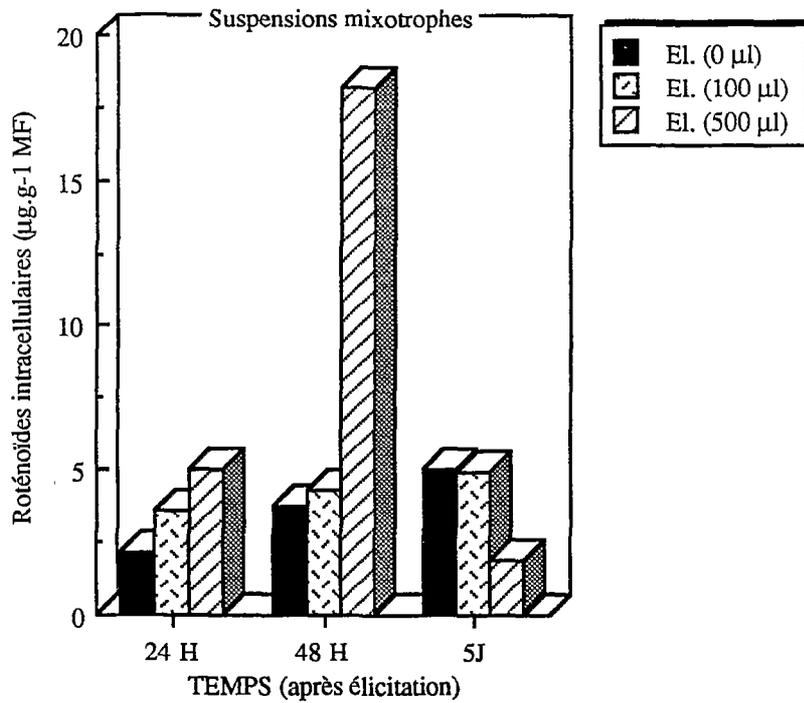
**EVOLUTION DE LA BIOMASSE APRES ELICITATION
DANS DES SUSPENSIONS MIXOTROPHES**

Figure 85 :



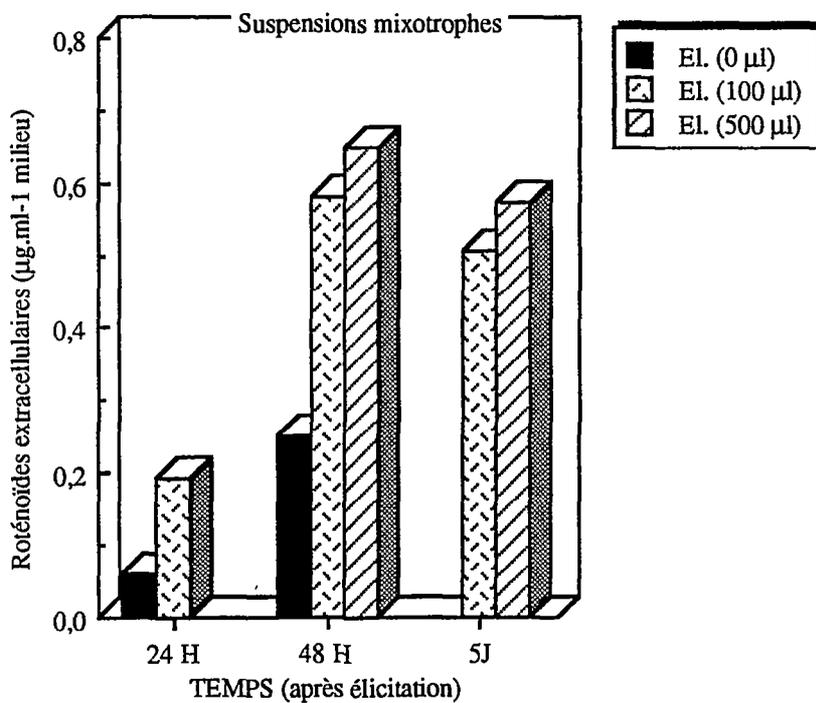
**EVOLUTION DU PH APRES ELICITATION DANS DES
SUSPENSIONS MIXOTROPHES**

Figure 86 :



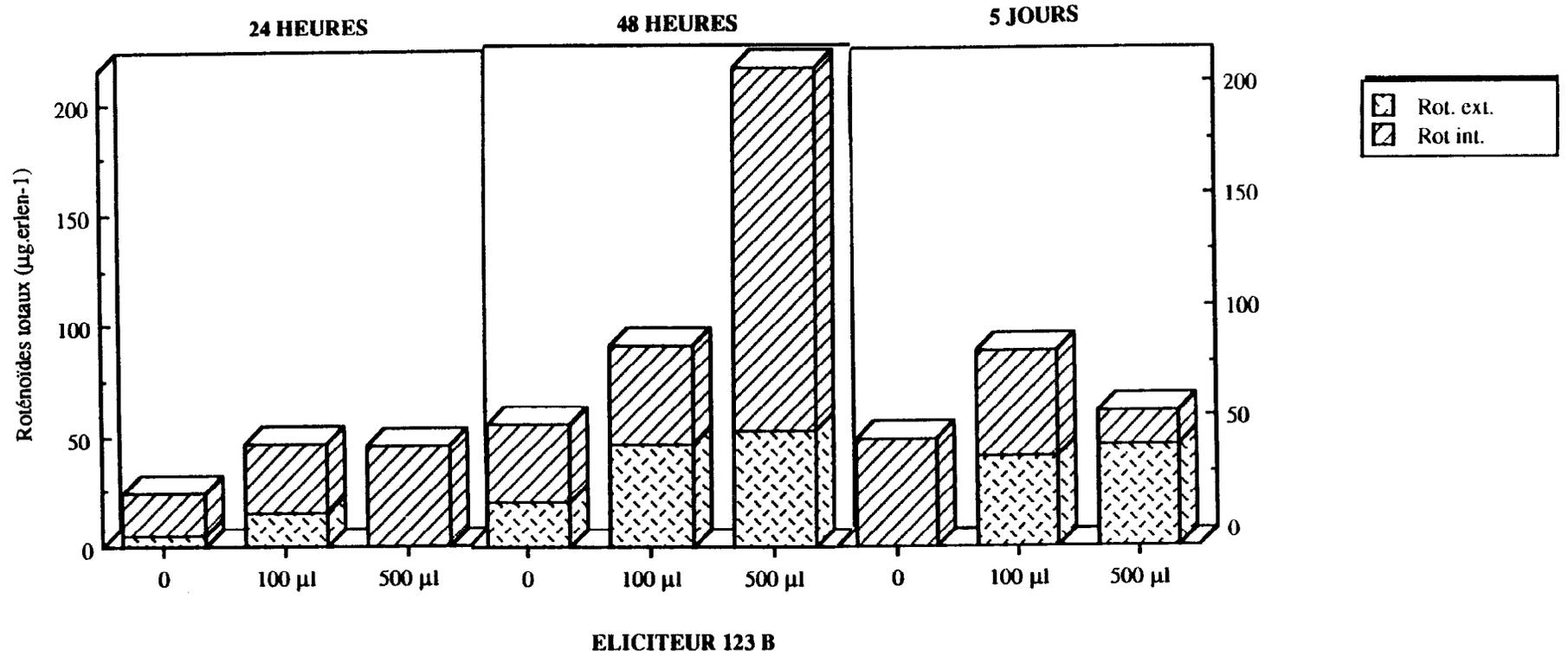
**EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES
INTRACELLULAIRES DANS LES SUSPENSIONS MIXOTROPES**

Figure 87 :



**EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES
EXTRACELLULAIRES DANS DES SUSPENSIONS MIXOTROPES**

Figure 88 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES PAR ERLÉN DANS LES
SUSPENSIONS PHOTOMIXOTROPHES APRES ELICITATION

Par contre, la présence de 500 µl d'éliciteur a un effet légèrement inhibiteur sur l'évolution de la biomasse, 48 heures ou 5 jours après l'élicitation.

Il est important de noter également que l'ajout d'éliciteur à forte dose (500 µl) entraîne des modifications au niveau de l'aspect des cultures hétérotrophes et photomixotrophes, qui ont alors tendance à brunir 48 heures après l'élicitation.

* La production globale de roténoïdes dans la souche hétérotrophe et photomixotrophe de *Tephrosia vogelii* est stimulée en présence des deux concentrations en éliciteur testées. Dans les deux cas cette stimulation est maximale 48 heures après le traitement.

Cette accumulation de roténoïdes, induite en présence d'un éliciteur isolé à partir de plantes malades de *Catharanthus roseus* et non de *Tephrosia vogelii*, peut paraître paradoxale. En fait, il a été démontré, par EILERT (1987), qu'un même éliciteur pouvait stimuler l'accumulation de métabolites secondaires chez différentes cultures cellulaires. De nombreux exemples pris dans la littérature et rassemblés dans le tableau III (chapitre I) illustrent cette observation.

Dans la plupart des cas, l'accumulation de métabolites secondaires débute quelques heures après l'élicitation, et se trouve précédée d'une augmentation de l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse. Les teneurs maximales sont atteintes 12 heures à 5 jours après, et généralement suivies par un déclin rapide (EILERT, 1987).

Lors du traitement de suspensions cellulaires de *Vigna angularis* par des éliciteurs isolés de *Phytophthora megasperma*, une augmentation de la teneur en isoflavone est détectable 6 heures après l'élicitation, et le maximum d'accumulation est obtenu 33 heures après (HATTORI et OHTA, 1985).

L'élicitation, réalisée en fin de phase exponentielle aussi bien pour les suspensions hétérotrophes (6^{ème} jour) que pour les suspensions photomixotrophes (12^{ème} jour), a eu un effet très positif sur la production de roténoïdes.

En fait, le stade de croissance durant lequel est effectuée l'élicitation joue un rôle prépondérant sur la réponse obtenue.

En effet, dans la plupart des cas, les suspensions cellulaires répondent de façon optimale à l'élicitation en fin de phase exponentielle (KOMBRINK et HAHLBROCK, 1985 ; EILERT *et al.*, 1986a ; EBEL *et al.*, 1976) ou encore parfois en tout début de phase stationnaire (KUROSAKI *et al.*, 1985).

Il semblerait que l'élicitation induit dans certain cas un arrêt temporaire ou permanent

de la croissance cellulaire, favorable à l'expression du métabolisme secondaire (EBEL *et al.*, 1976 ; KOMBRINK et HAHLBROCK, 1985).

De fortes teneurs en roténoïdes sont retrouvées dans le milieu de culture après élicitation quelles que soient la souche considérée et la concentration en éliciteur. Cette excrétion et/ou ce relargage de roténoïdes dans le milieu de culture est maximal 24 heures après le traitement dans la souche hétérotrophe et 48 heures après dans la souche photomixotrophe. La répartition des roténoïdes extracellulaires par rapport aux roténoïdes intracellulaires atteint dans certain cas 80 %.

Les fortes concentrations en éliciteur (500 µl) semblent promouvoir fortement ce phénomène de relargage.

La présence des produits de l'élicitation dans le milieu de culture est un fait qui a déjà été observé chez de nombreuses cultures cellulaires.

Ainsi, dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* (EILERT *et al.*, 1986a), et de *Papaver somniferum* (EILERT *et al.*, 1985), environ 10 à 20 % des métabolites synthétisés sont retrouvés dans le milieu de culture.

Cette forte teneur en métabolites secondaires dans le milieu peut s'expliquer par :

- l'existence d'un relargage des composés synthétisés dû à l'éclatement des cellules ;
- la possibilité d'une excrétion des métabolites produits.

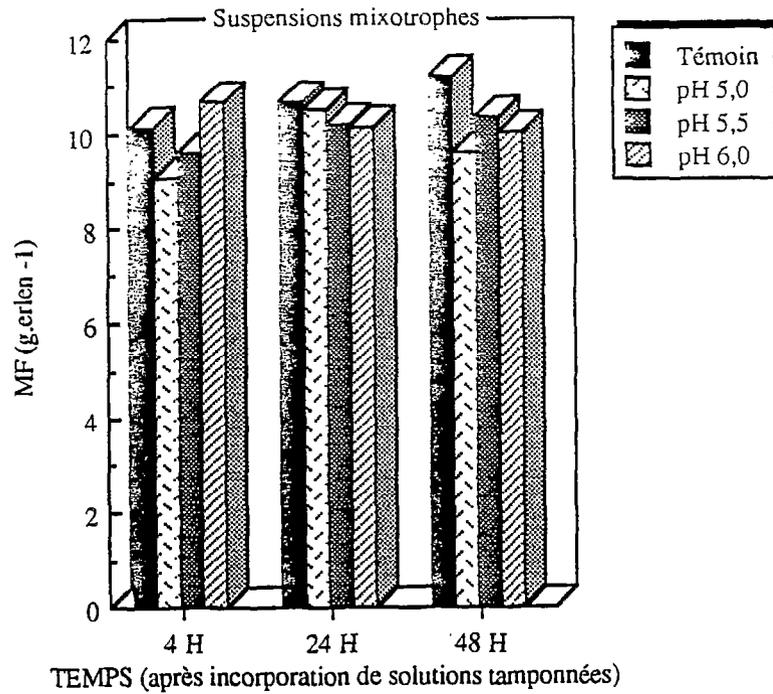
Il a été démontré par EILERT et CONSTABEL (1985) que des cellules de *Papaver somniferum* mises en présence d'homogénat de *Botrytis*, ne présentaient que très peu de différences avec le témoin. Les cellules n'ont pas subi de lyse, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre.

Par contre, des modifications de perméabilité membranaire dues à l'action d'éliciteurs fongiques ont été décrites récemment par DARVILL et ALBERSHEIM (1984) et par YOUNG *et al.* (1982) sur des cultures cellulaires de *Phaseolus vulgaris* et de *Glycine max.*

L'élicitation n'entraînant donc pas apparemment de lyse cellulaire et favorisant l'excrétion ou la diffusion des métabolites secondaires synthétisés, il est alors possible d'extraire les métabolites du milieu de culture sans sacrifier les cellules et ainsi pouvoir recommencer d'autres cycles de production.

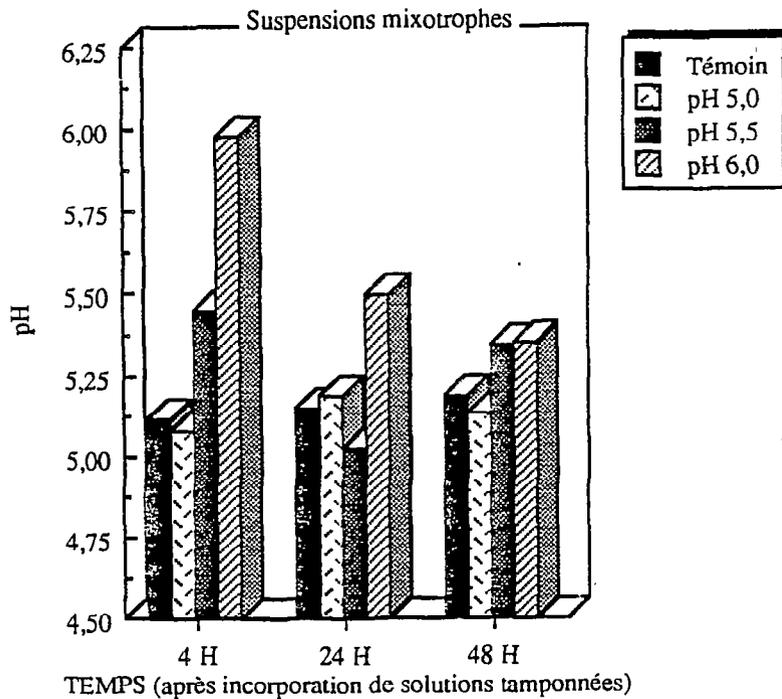
Cette nouvelle technique d'optimisation de la production paraît donc être très prometteuse, le traitement renouvelé des cellules permettant une production semi-continue.

Figure 89 :



**EVOLUTION DE LA BIOMASSE LORS DE STRESS PH
DANS LES SUSPENSIONS MIXOTROPHES**

Figure 90 :



**EVOLUTION DU PH LORS D'UN STRESS PH
DANS DES SUSPENSIONS MIXOTROPHES**

Cela a été réalisé avec succès par FUNK *et al.* (1987) sur des cultures cellulaires de soja synthétisant de la glycéolline.

* Cette expression de la production globale en roténoïdes tenant compte de la biomasse ne nous permet pas d'avoir une bonne comparaison des teneurs obtenues dans la souche hétérotrophe et dans la souche photomixotrophe (la MF des suspensions hétérotrophes étant le double de celle des suspensions mixotrophes). Les résultats exprimés par unité de biomasse et ml de milieu présentés sur les figures (81, 82) et (86, 87) permettent de mettre en évidence une teneur toujours plus forte de roténoïdes intracellulaires dans les suspensions mixotrophes. Les concentrations en roténoïdes extracellulaires sont pratiquement similaires dans les deux souches.

2) Stress d'origine abiotique

a) Modification du pH du milieu de culture

— Matériel végétal utilisé

* Suspensions cellulaires photomixotrophes : souche β , cultivée à la lumière, ayant subi 10 repiquages.

Les Erlenmeyers sont utilisés 4 heures, 24 heures puis 48 heures après l'ajout des solutions tampons.

Les paramètres suivis sont :

- le pH extracellulaire ;
- la masse fraîche ;
- les roténoïdes intracellulaires ;
- les roténoïdes extracellulaires.

— Résultats

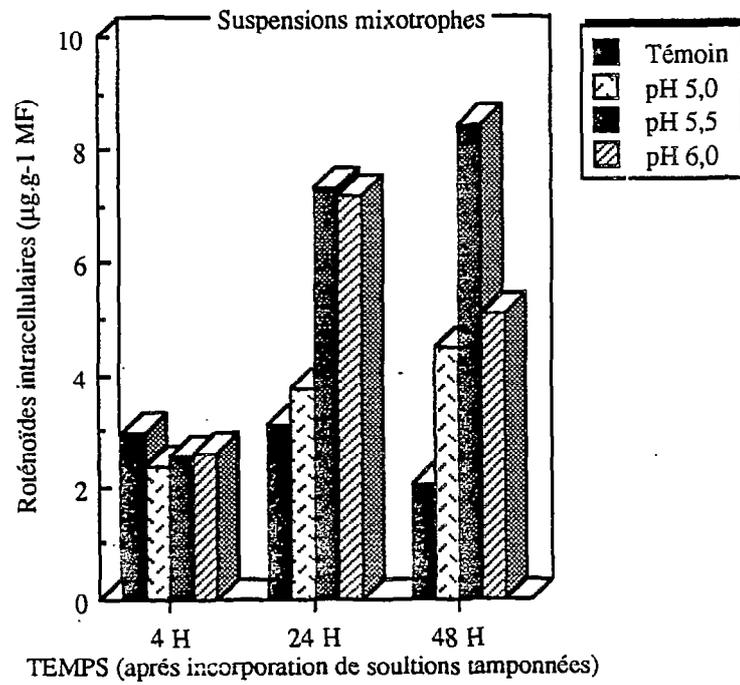
**** Evolution de la masse fraîche : (figure 89)**

On ne note pas de modifications significatives dans l'évolution de la masse fraîche 24 heures et 48 heures après l'ajout de solutions tamponnées de pH différents.

**** Evolution du pH extracellulaire : (figure 90)**

Quatre heures après l'ajout des solutions tampons dans le milieu de culture, on note des valeurs de pH sensiblement équivalentes à celles attendues en théorie (5,08 pour pH 5

Figure 91 :



**EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOÏDES APRES UN STRESS PH
AU 12ème JOUR DE CULTURE**

5,42 pour pH 5,5 ; 5,98 pour pH 6).

Les écarts existant au départ entre les pH des différents essais tendent à s'estomper 24 heures et à s'homogénéiser 48 heures après l'ajout des solutions tampons.

En effet 48 heures après, les valeurs de pH obtenues pour l'essai pH 5,5 est de 5,34 et pour l'essai pH 6 de 5,35 contre 5,19 pour le témoin.

**** Evolution de la production de roténoïdes intracellulaires :**
(figure 91)

Quatre heures après l'ajout des solutions tamponnées de pH différents, les faibles différences observées quant à la teneur en roténoïdes intracellulaires semblent plutôt imputables à des erreurs de manipulation lors de l'extraction et du dosage de ces composés ou encore du domaine de la variabilité du matériel végétal.

Par contre, des différences plus marquées sont détectables entre les essais, 24 heures et 48 heures après le traitement.

En effet l'accumulation de roténoïdes intracellulaires est stimulée 24 heures après l'ajout d'une solution tampon à pH 5,5 (x 2,3 par rapport au témoin) et à pH 6 (x 2,26).

Cette stimulation est encore plus manifeste 48 heures après, aussi bien à pH 5 qu'à pH 5,5 et pH 6 où la production de métabolites est multipliée respectivement par 2,19 ; 4,12 et 2,5.

**** Evolution de la production de roténoïdes extracellulaires**

La présence de roténoïdes dans le milieu de culture n'ayant été détectée qu'à l'état de traces, aucun résultat ne pourra être présenté.

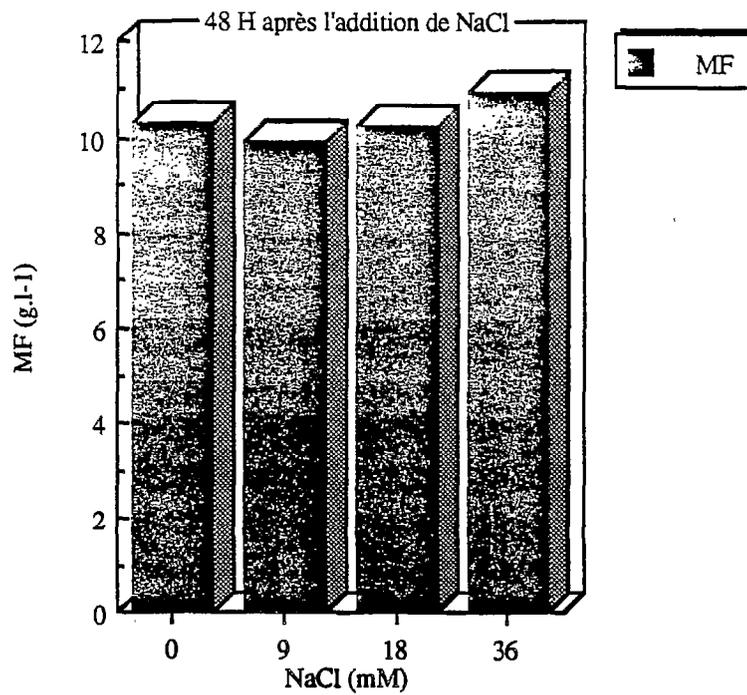
— Discussion

* On ne note pas de modifications significatives au niveau du pH extracellulaire 4 heures, 24 heures et 48 heures après l'ajout des solutions tampons de différents pH et cela quelle que soit la souche considérée.

* De même, la présence de solutions tamponnées n'entraîne pas de modification au niveau de l'évolution de la masse fraîche.

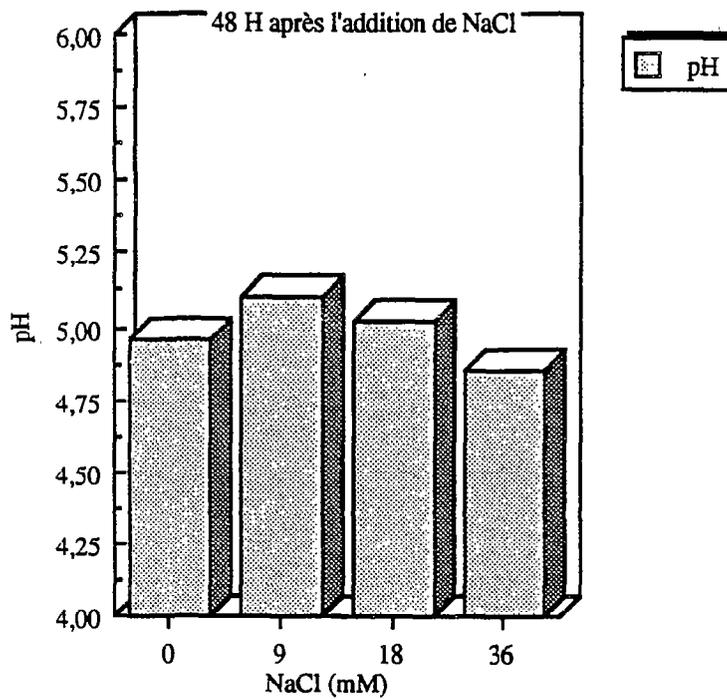
* Par contre, il est intéressant de noter que la production de roténoïdes est largement augmentée 24 heures et 48 heures après l'apport de solutions tamponnées. Cette stimulation est plus effective à pH 5,5 et 6,0.

Figure 92 :



**EVOLUTION DE LA BIOMASSE DANS LES SUSPENSIONS
HETEROTROPHES**

Figure 93 :



**EVOLUTION DU PH DANS LES SUSPENSIONS
HETEROTROPHES**

De telles observations ont déjà été faites par HATTORI et OHTA (1985) sur des suspensions cellulaires de *Vigna angularis* synthétisant des isoflavones. Ils ont également noté, que cette élévation de pH du milieu de culture induisait une augmentation de l'activité PAL.

Le fait d'élever le pH du milieu de culture autour de 5 ; 5,5 et 6 n'est pas toxique pour les cellules, le pH du milieu neuf au moment de l'ensemencement étant proche de 5,5. De ce point de vue, ce type de stress est assez différent des traitements effectués en présence d'éliciteurs.

Actuellement, on ne sait toujours pas comment l'élévation du pH du milieu de culture peut affecter les cellules et par là même la production de métabolites secondaires et l'activité d'une enzyme telle que la PAL. Il semblerait toutefois, d'après la littérature que la PAL soit sensible au pH du milieu de culture (HANSON et HAVIR, 1981) (cf. chapitre V).

De plus cette soudaine augmentation du pH du milieu pourrait entraîner une perturbation du potentiel membranaire et une inhibition des transports actifs de certains solutés conduisant à une activation des gènes codant pour la PAL et d'autres enzymes biosynthétiques (HATTORI et OHTA, 1985).

Il serait donc intéressant dans notre cas d'étudier les relations et interactions existant entre l'élévation du pH du milieu de culture, l'augmentation de l'activité PAL et l'accumulation de roténoïdes intracellulaires, dans les suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* (cf chapitre V).

b) Adjonction de fortes concentrations en sels

— *Matériel végétal utilisé*

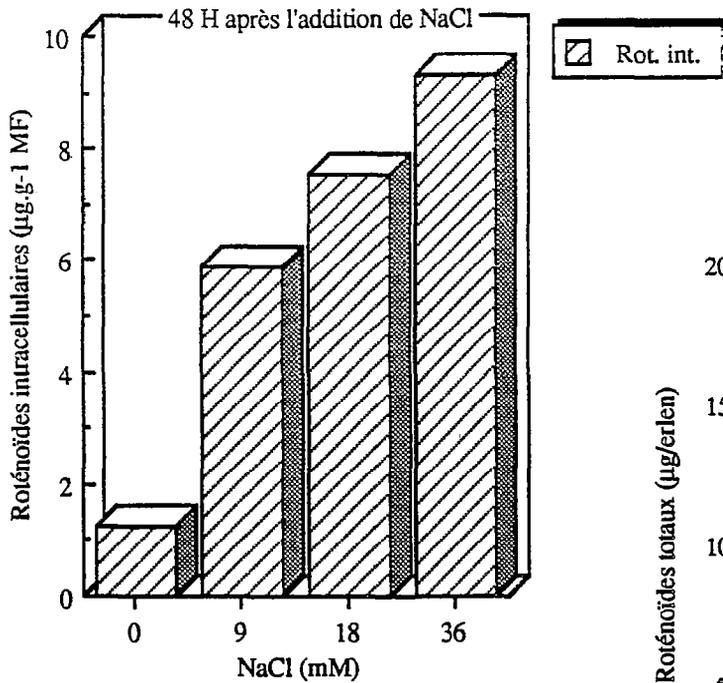
* Suspensions cellulaires hétérotrophes : souche β cultivée à l'obscurité, ayant subi 49 repiquages sur le milieu décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

* Suspensions cellulaires photomixotrophes : souche β , cultivée à la lumière, ayant subi 15 repiquages.

Les Erlenmeyers sont utilisés 48 heures après l'apport de concentrations croissantes en sels (cf protocole dans le chapitre II).

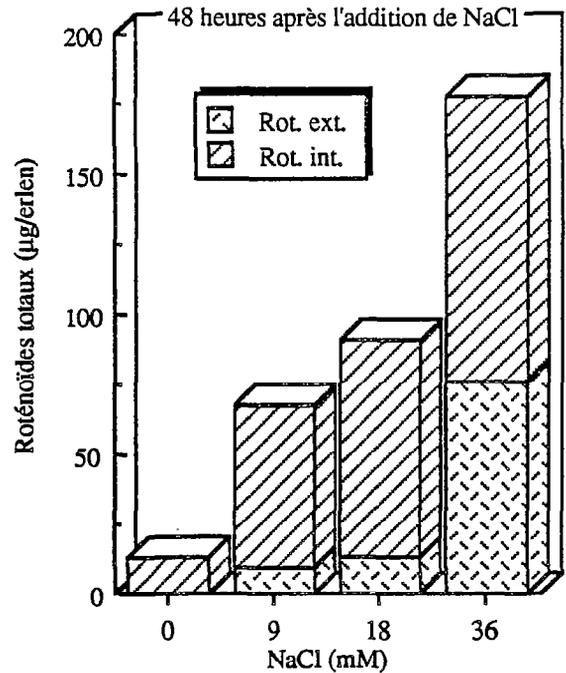
Les paramètres définis pour les manipulations précédentes sont suivis.

Figure 94 :



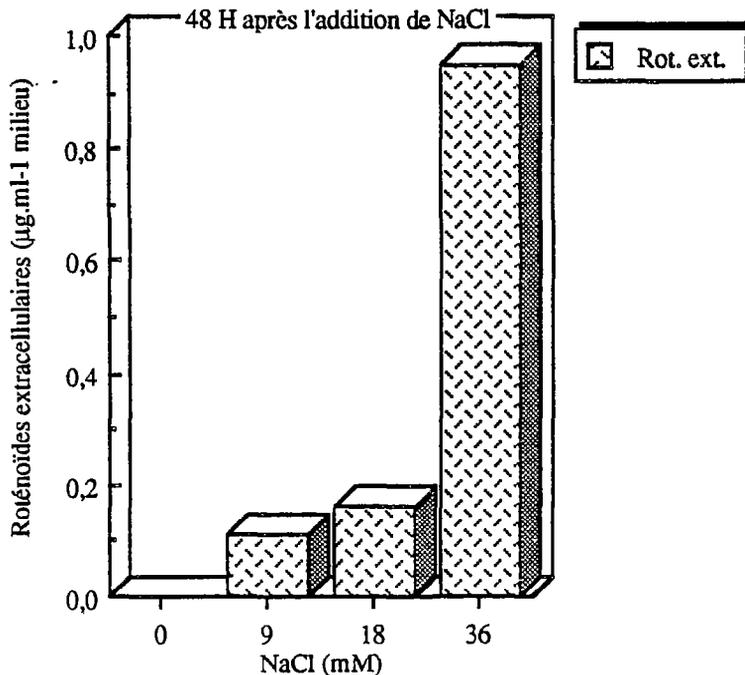
**EVOLUTION DES ROTENOIDES INTRACELLULAIRES
DANS LES SUSPENSIONS HETEROTROPHES**

Figure 96 :



**EVOLUTION DE LA PRODUCTION PAR ERLLEN
DANS LES SUSPENSIONS HETEROTROPHES**

Figure 95 :



**EVOLUTION DES ROTENOIDES EXTRACELLULAIRES
DANS LES SUSPENSIONS HETEROTROPHES**

— *Résultats*

*SOUCHE HETEROTROPHE

** *Evolution de la masse fraîche : (figure 92)*

On ne constate aucun effet significatif des concentrations en sels sur l'évolution de la masse fraîche (écart maximum < 10 %).

** *Evolution du pH extracellulaire*

Aucune modification significative du pH n'est observée lors de l'ajout de concentrations croissantes en NaCl dans le milieu de culture (figure 93).

** *Evolution de la production totale de roténoïdes: (figure 94, 95, 96)*

* On peut noter une forte stimulation de l'accumulation de roténoïdes intracellulaires, 48 heures après l'ajout de concentrations croissantes en NaCl.

On observe en fait qu'il existe une corrélation positive entre la concentration en sels apportée au milieu de culture et l'accumulation de roténoïdes.

* On observe un fait relativement identique à celui noté pour les teneurs en roténoïdes intracellulaires : plus la concentration en NaCl est forte plus l'effet sur la production de roténoïdes extracellulaires est important. A concentration croissante en NaCl, la teneur en roténoïdes intracellulaires est respectivement de 0,11 ; 0,16 et 0,95 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de milieu.

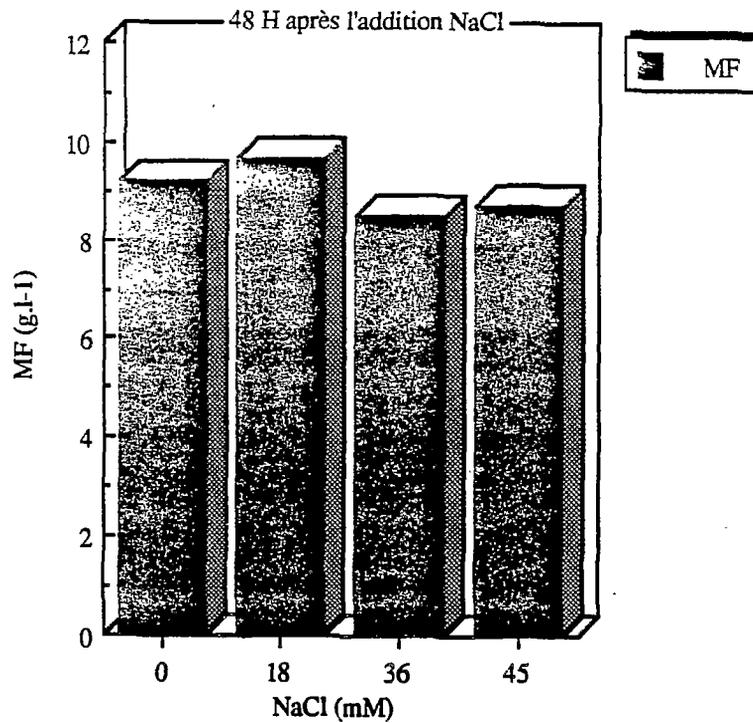
* L'évolution cumulée des roténoïdes intra et extracellulaires exprimée par Erlenmeyer permette de visualiser la répartition des roténoïdes intracellulaires par rapport aux roténoïdes extracellulaires. Elle est de 31 % en présence de 36 mM de NaCl et seulement de 7 % à faibles concentrations en sels.

* SOUCHE PHOTOMIXOTROPHE

** *Evolution de la masse fraîche : (figure 97)*

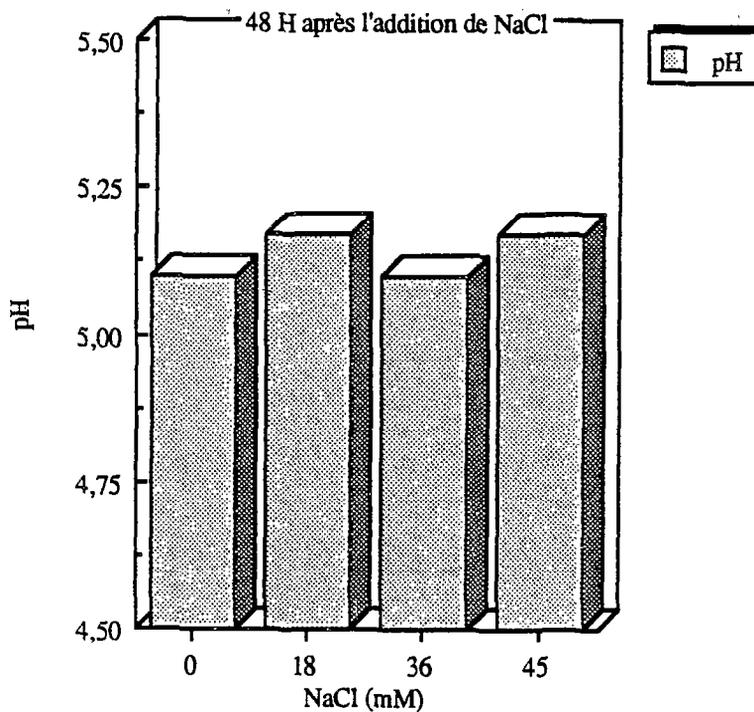
La masse fraîche des différents essais ne semble pas être affectée par la présence de concentrations croissantes en sels dans le milieu de culture.

Figure 97 :



**EVOLUTION DE LA BIOMASSE DANS
LES SUSPENSIONS MIXOTROPES**

Figure 98 :



**EVOLUTION DU PH DANS LES SUSPENSIONS
MIXOTROPES**

**** Evolution du pH extracellulaire**

On ne note, aucune modification du pH lors de l'ajout de concentrations croissantes en NaCl dans le milieu de culture (figure 98).

**** Evolution de la production totale de roténoïdes : (figure 99, 100 et 101)**

* On observe une stimulation croissante de la production de roténoïdes intracellulaires en fonction des teneurs en sels. Cette stimulation est beaucoup plus effective à fortes concentrations (45 mM).

Il est important de signaler que l'on retrouve à nouveau dans ces suspensions cellulaires photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* de fortes teneurs en roténone par rapport aux roténoïdes totaux (environ 65 à 75 %), mais cela aussi bien dans les témoins que dans les essais.

* D'après la figure 101, à faible concentration en sels (18 mM), on observe une légère stimulation du relargage des roténoïdes dans le milieu (x 1,44). Par contre, à plus fortes concentrations (36 et 45 mM) on note une forte diminution de la teneur en métabolites dans le milieu de culture.

* L'évolution globale de la concentration en roténoïdes exprimée par Erlenmeyer nous permet de montrer que l'apport de solutions salées n'a pas ou que très peu d'effet sur la production de roténoïdes totaux.

__ Comparaison-Discussion

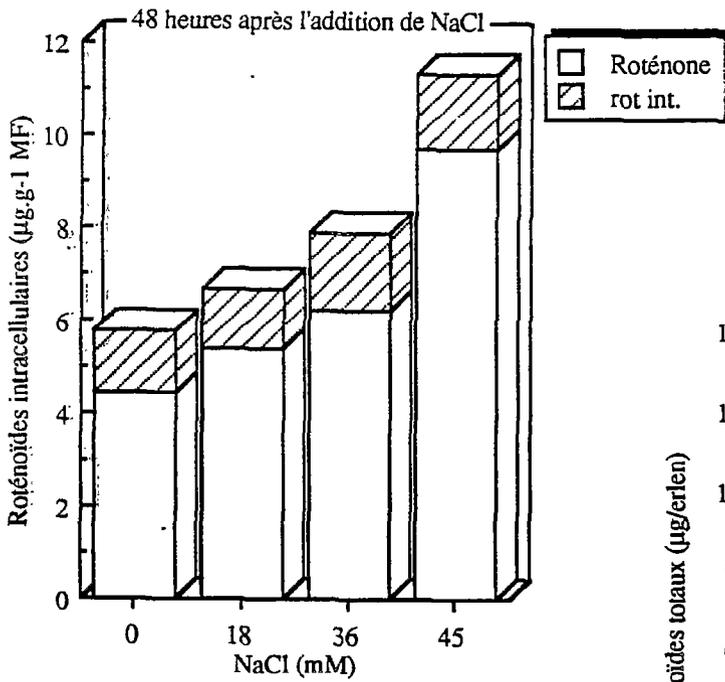
**** Evolution du pH extracellulaire**

Il n'apparaît pas de modification importante au niveau du pH extracellulaire 48 heures après l'ajout de concentrations croissantes en NaCl, et cela, quelle que soit la souche considérée (hétérotrophe ou photomixotrophe).

**** Evolution de la masse fraîche**

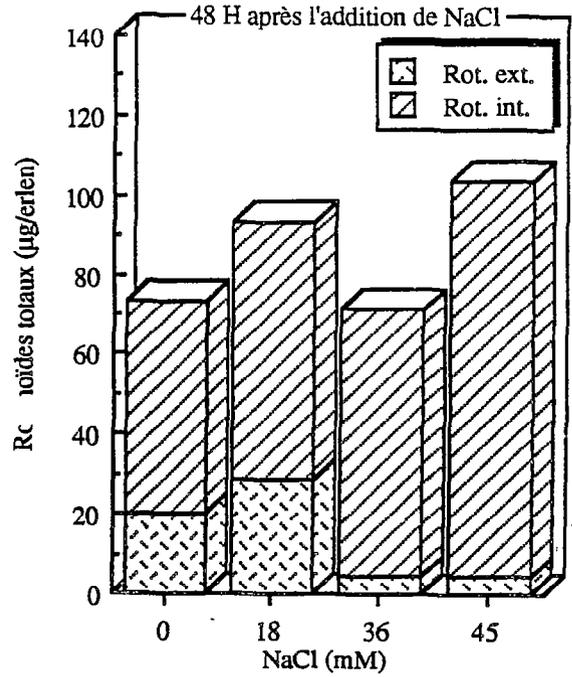
Des concentrations croissantes en NaCl dans le milieu de culture n'entraînent pas de modification au niveau de la masse fraîche 48 heures après, aussi bien dans les suspensions cellulaires hétérotrophes que dans les suspensions cellulaires photomixotrophes.

Figure 99 :



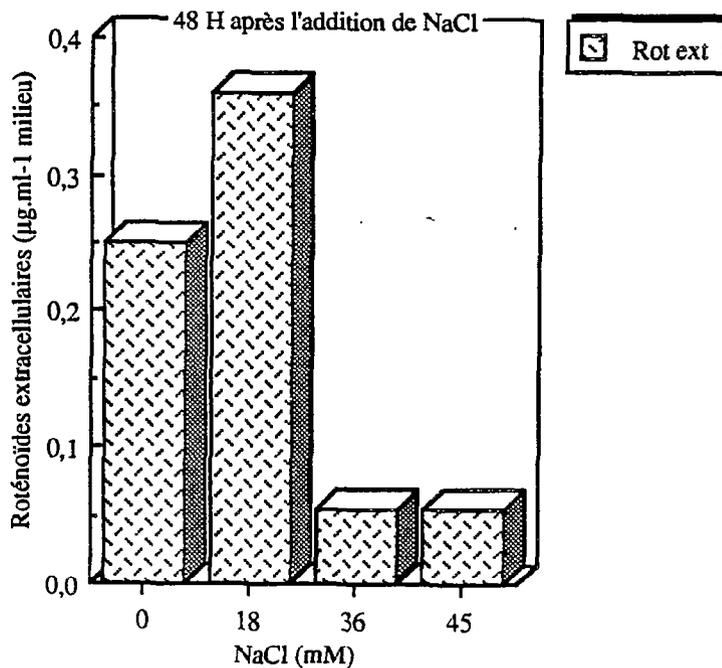
**EVOLUTION DES ROTENOIDES INTRACELLULAIRES
DANS LES SUSPENSIONS MIXOTROPHES**

Figure 101 :



**EVOLUTION DE LA PRODUCTION PAR ERLLEN
DANS LES SUSPENSIONS MIXOTROPHES**

Figure 100 :



**EVOLUTION DES ROTENOIDES EXTRACELLULAIRES
DANS LES SUSPENSIONS MIXOTROPHES**

** Evolution de la production totale de roténoïdes

* Une stimulation de l'accumulation de roténoïdes intracellulaires est observée en présence de concentrations croissantes en NaCl, de façon plus marquée dans la souche hétérotrophe (taux de multiplication maximal 7,46) que dans la souche photomixotrophe (taux de multiplication maximal 1,9).

* Des comportements différents sont observés au niveau du relargage des roténoïdes dans le milieu de culture en fonction de la souche considérée :

__ dans des suspensions hétérotrophes ce phénomène semble stimulé par de fortes concentrations en sels

__ dans des suspensions mixotrophes il est fortement inhibé par ces mêmes concentrations en sels.

* Au niveau bilan global des roténoïdes, on observe en présence d'une solution de NaCl : une stimulation de la production de roténoïdes chez les suspensions hétérotrophes et par contre aucun effet chez les suspensions mixotrophes.

Cette stimulation de la production de métabolites secondaires lors de l'addition de concentrations croissantes en sels a été également observé par NEF *et al.*, (1988) sur des suspensions cellulaires hétérotrophes de *Catharanthus roseus* synthétisant des alcaloïdes indoliques.

c) Traitement à l'éthrel

_ Matériel végétal utilisé

* Suspensions cellulaires hétérotrophes : souche β cultivée à l'obscurité, ayant subi 53 repiquages sur le milieu décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

* Suspensions cellulaires photomixotrophes : souche β , cultivée à la lumière, ayant subi 17 repiquages.

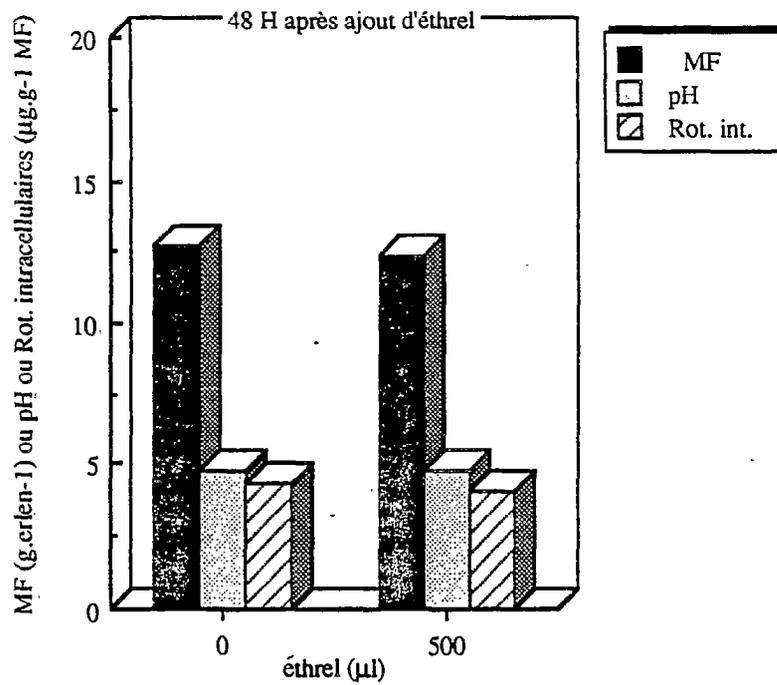
* Souche hétérotrophe :

Douze fioles à vide sontensemencées par pesée (cf. paragraphe A) dans les conditions habituelles de culture (densité cellulaire initiale de 11 %) : trois fioles à vide par temps de prélèvements, plus trois témoins.

Au 6^{ème} jour de culture, la mise en présence d'éthylène est réalisée suivant le protocole décrit dans le chapitre II.

L'ensemble des fioles à vide sont alors remises à agiter dans les conditions standard

Figure 102 :



EVOLUTION DE LA BIOMASSE, DU PH ET DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES DANS DES SUSPENSIONS HETEROTROPHES

de culture, puis sont sacrifiées à des temps différents suivant l'évolution des cultures.

Les paramètres suivis durant cette étude sont :

- pH extracellulaire ;
- poids de matière fraîche ;
- roténoïdes intracellulaires ;
- roténoïdes extracellulaires.

* Souche photomixotrophe :

Le protocole est identique à celui décrit pour la souche hétérotrophe. La densité cellulaire d'ensemencement est de 12 %. La fiole à vide contenant l'éthrel est mise en présence de la suspension cellulaire 12 jours après le début de la culture.

Les Erlenmeyers sont utilisés 72 heures après.

Les paramètres définis pour la souche hétérotrophe sont suivis.

— Résultats

Remarque : la manipulation suivante n'a été réalisée qu'une seule fois.

*SOUCHE HETEROTROPHE (figure 102)

** Evolution du pH extracellulaire

On ne note pas de modification notable du pH dans le milieu de culture, par rapport au témoin 48 heures après la mise en présence d'éthylène.

** Evolution de la masse fraîche

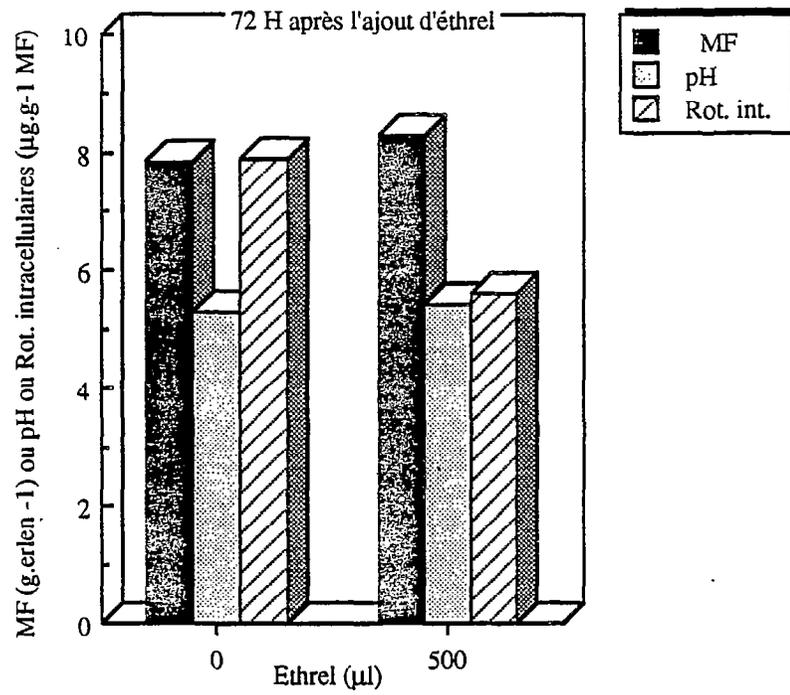
L'apport d'éthylène au milieu de culture semble entraîner une diminution de la masse fraîche des suspensions cellulaires hétérotrophes (10,5 pour les essais contre 12,7 pour les témoins).

** Evolution des roténoïdes intra & extracellulaires

Aucune différence significative au niveau de l'accumulation de roténoïdes intracellulaires n'est observée 48 heures après l'incorporation d'éthylène dans le milieu de culture. En effet la teneur en roténoïdes dans l'essai est de 80,25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS contre 83 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans le témoin.

Le dosage des roténoïdes extracellulaires réalisé dans les conditions standard n'a

Figure 103 :



EVOLUTION DE LA BIOMASSE, DU PH ET DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES DANS DES SUSPENSIONS MIXOTROPES

donné aucun résultat, à la fois dans l'essai et dans le témoin.

*SOUCHE PHOTOMIXOTROPHE (figure 103)

** Evolution du pH extracellulaire

Le pH extracellulaire ne semble pas affecté par la présence d'éthylène.

** Evolution de la masse fraîche

L'évolution de la masse fraîche du témoin et de l'essai en présence d'éthylène est identique.

** Evolution des roténoïdes intra & extracellulaires

Un effet sensiblement négatif sur la production de roténoïdes intracellulaires a été observé en présence d'éthylène. L'accumulation en roténoïdes totaux est de 78,82 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF dans le témoin contre 56 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF dans l'essai.

Durant cette étude, aucune accumulation de roténoïdes n'a pu être mise en évidence, à la fois dans le témoin et en présence d'éthylène.

— Comparaison-Discussion

Aucune modification du pH extracellulaire ni de la masse fraîche n'a été mise en évidence lors du dégagement d'éthylène dans l'Erlenmeyer, à la fois dans les suspensions hétérotrophes et photomixotrophes.

Du point de vue de la production de roténoïdes intracellulaires, les résultats sont identiques. La présence d'éthylène dans le milieu de culture ne semble pas affecter l'accumulation des métabolites secondaires, et cela quelle que soit la souche considérée.

En conclusion, il semblerait que le dégagement d'éthylène dans le milieu de culture n'ait aucune action sur les paramètres étudiés chez des suspensions hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*. Toutefois il se peut également, que le protocole utilisé n'ait pas permis une bonne diffusion de l'éthylène vers l'Erlenmeyer contenant la culture, auquel cas, des modifications devront être apportées au protocole lors de prochaines manipulations, notamment en provoquant une circulation du mélange gazeux... Le dosage de l'activité enzymatique de la PAL nous donnera peut-être plus d'indications quant à l'action effective de l'éthylène (cf. chapitre V).

TABLEAU : VIII

TABLEAU RECAPITULATIF DE L'ESSAI DE STIMULATION
DE LA PRODUCTION DE ROTENOÏDES

		SUSPENSION MIXOTROPHE EN ERLENMEYER		SUSPENSION HETEROTROPHE EN ERLENMEYER	
		Facteur de multiplication de la production de roténoïdes			
		Roténoïdes intracellulaires	Roténoïdes extracellulaires	Roténoïdes intracellulaires	Roténoïdes extracellulaires
Ajout d'éliciteur pathogène	100 µl	-	x 3,2	x 5	100 µl x 3,5
	500 µl	x 4,8	-	x 2	500 µl x 7,4
Stress pH	pH 5,0	x 2,19	—	—	—
	pH 5,5	x 4,12	—	—	—
	pH 6,0	x 2,5	—	—	—
Stress salin	9 mM	-	-	x 4,7	—
	18 mM	x 1,22	x 1,44	x 6	—
	36 mM	x 1,54	-	x7,45	—
Adjonction d'ethrel	—	Aucun effet	Aucun effet	—	—
Incorporation de phénylalanine	10 ⁻⁴ M	x 3	—	x 3,48	—
	5.10 ⁻⁴ M	x 2,4	—	x 5,38	—

D) DISCUSSION GENERALE SUR L'ESSAI D'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION

Il est important de noter en premier lieu, que les essais d'optimisation de la production de roténoïdes par des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*, soit par incorporation de précurseurs, soit sous l'effet de différents stress, se sont révélés dans certains cas très positifs et prometteurs.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VIII.

On observe des différences de réponses, en fonction du traitement effectué, mais également en fonction de la souche considérée.

— Ainsi, les traitements ayant donné les résultats les plus intéressants sont les essais de stimulation en présence d'éliciteur pathogène ou d'incorporation de phénylalanine et de fortes concentrations en sels.

— Les suspensions hétérotrophes de *Tephrosia vogelii* répondent de manière beaucoup plus intense aux différents essais de stimulation. L'accumulation de roténoïdes est parfois multipliée par un facteur de 7,5 par rapport au témoin.

Cependant les teneurs en roténoïdes obtenues après différents traitements des suspensions hétérotrophes sont toujours inférieures à celles des souches photomixotrophes.

Il semble que les agents stimulateurs de la production ne suffisent pas à restaurer dans les suspensions hétérotrophes, les potentialités biosynthétiques de la PAL à la lumière.

De plus, c'est en présence de phénylalanine que l'on obtient le maximum d'accumulation de roténoïdes dans les suspensions cellulaires mixotrophes.

Par contre, lors de l'incorporation de phénylalanine dans des suspensions hétérotrophes on observe, certes une augmentation de la production, mais celle-ci n'atteint jamais les teneurs observées à la lumière.

Il apparaît donc que la lumière est un des principaux facteurs limitant la production de roténoïdes. La phénylalanine semble jouer également un rôle important dans ce mode de régulation de la production, une fois le facteur lumière rétabli.

D'autres études, notamment au niveau de la voie de biosynthèse des roténoïdes et plus particulièrement lors de la première étape (impliquant largement la PAL), nous seront très utiles pour une meilleure compréhension et interprétation des résultats obtenus (cf. chapitre V).

CHAPITRE V :

CARACTERISATION ET EVOLUTION
D'UNE ENZYME CLE DE LA VOIE DE
BIOSYNTHESE DES ROTENOIDES :
LA PAL

CHAPITRE V : CARACTERISATION ET EVOLUTION D'UNE ENZYME CLE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES ROTENOIDES : LA PAL

A) INTRODUCTION

La phénylalanine ammonia-lyase qui catalyse la première réaction de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, se trouve à l'interface entre le métabolisme primaire (protéosynthèse) et le métabolisme secondaire (biosynthèse des phénylpropanoïdes).

Selon la littérature, cette enzyme est extrêmement sensible à l'état physiologique de la plante.

Des modifications rapides et transitoires de l'activité enzymatique de la PAL ont été ainsi observées sous l'effet de divers stimuli : lumière (ZIMMERMANN et HAHLBROCK, 1975 ; HAHLBROCK *et al.*, 1976) ; dilution de suspensions cellulaires (HAHLBROCK et SCHRODER, 1975) ; éliciteurs pathogènes (HAHLBROCK *et al.*, 1981 ; LAMB et DIXON, 1978 ; EBEL *et al.*, 1976) éliciteurs abiotiques (HATTORI et OHTA, 1985 ; MOESTA et GRISEBACH, 1981 ; DAVIS *et al.*, 1986).

B) DEFINITIONS DES CONDITIONS OPTIMALES DE DOSAGE DE LA PAL

Remarque : Pour l'ensemble des manipulations de caractérisation partielle de la PAL, nous avons utilisés des cals chlorophylliens de souche F₁ Cad car moins friable, donc une teneur en eau plus faible et plus chargés en protéines solubles.

1) Linéarité en fonction du temps d'incubation et de la teneur en protéines

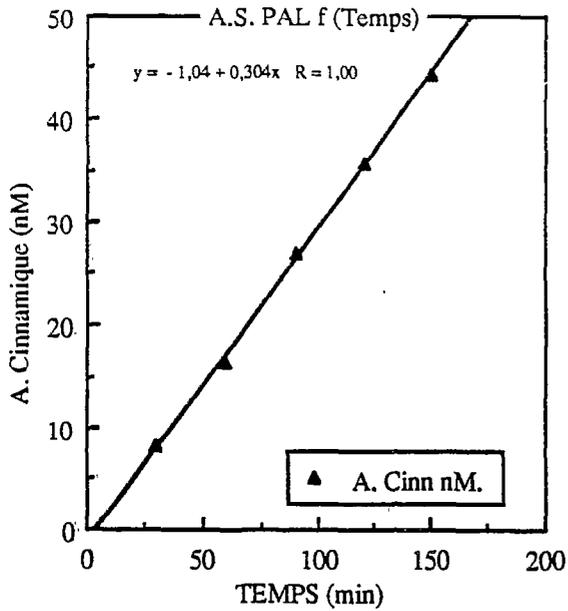
a) Matériel végétal

Cals chlorophylliens de souche F₁ Cad ayant subi 30 repiquages sur le milieu donné dans le chapitre "Matériel et Méthodes" additionné de 30 g.l⁻¹ (88 mM) de saccharose, âgés de 12 jours de culture.

b) Protocole

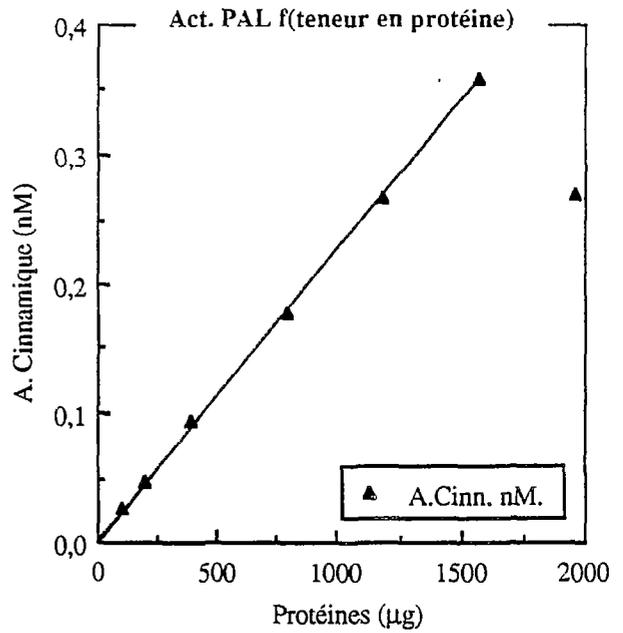
Le protocole est celui donné dans le chapitre "Matériel et Méthodes". La réaction

Figure 104 :



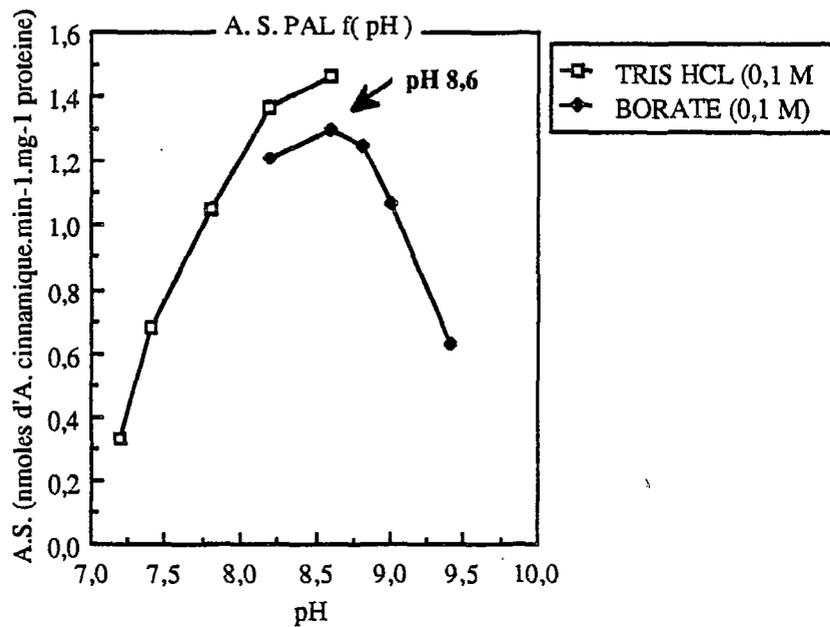
CAL S CHLOROPHYLLIENS F1 Cad (12j)

Figure 105 :



CAL S CHLOROPHYLLIENS F1 Cad (22 j)

Figure 106 :



CAL S CHLOROPHYLLIENS F1 Cad (13j)

enzymatique est arrêtée à différents temps. Ainsi la période optimale d'incubation sera définie. De même, des concentrations croissantes en extraits enzymatiques bruts sont ajoutées au milieu d'incubation afin de déterminer la quantité optimale de protéines requises lors du dosage de l'activité de la PAL.

c) Résultats

Les résultats de ces deux manipulations sont donnés dans les figures 104 et 105.

Linéarité en fonction du temps d'incubation

La formation d'acide cinnamique catalysée par la PAL est linéaire pendant plus de deux heures, à 30 °C. Pour les dosages en routine, le temps d'incubation retenu est de 90 minutes.

Linéarité en fonction de la teneur en protéines

L'effet de la concentration en protéines sur l'activité enzymatique de la PAL est donné dans la figure. La formation de l'acide cinnamique, dosée par spectrophotométrie, est linéaire jusqu'à une teneur en protéines de 1 500 µg. Lors des dosages en routine de l'activité enzymatique de la PAL, une teneur en protéines d'environ 1 000 µg sera requise.

L'activité spécifique de la PAL dans cette expérience est de 1,08 nmoles d'acide cinnamique.min⁻¹.mg⁻¹ protéines.

2) Effet du pH

a) Matériel végétal

Cals chlorophylliens de souche F₁ Cad. ayant subi 32 repiquages sur le milieu donné dans le chapitre "Matériel et Méthodes" additionné de 30 g.l⁻¹ (88 mM) de saccharose, âgés de 13 jours.

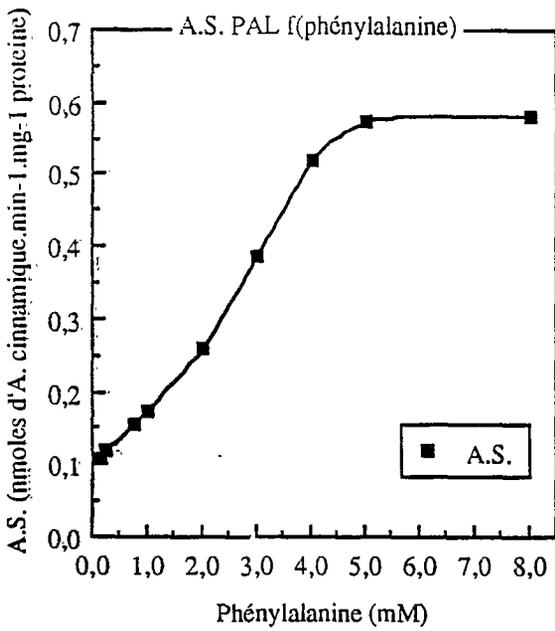
b) Protocole

Le protocole est celui décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Deux solutions tampons différentes sont préparées :

- un tampon Tris-HCL (100 mM) ajusté à 5 pH différents (7,2 ; 7,4 ; 7,8 ; 8,2 ; 8,6)
- un tampon borate (100 mM) ajusté à 5 pH différents (8,2 ; 8,6 ; 8,8 ; 9,0 ; 9,4)

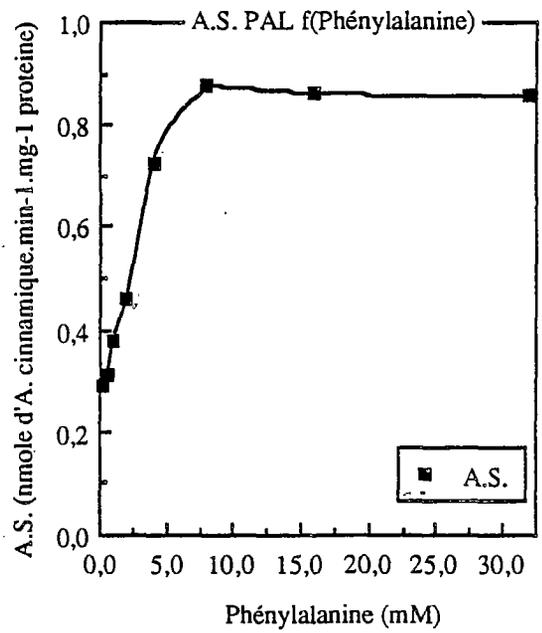
10 milieux d'incubation sont alors réalisés en présence des tampons de pH différents. Le pH de chaque milieu d'incubation est mesuré en présence de l'échantillon avant le début de la réaction. Le pH mesuré correspond bien au pH lors de la réaction.

Figure 107 :



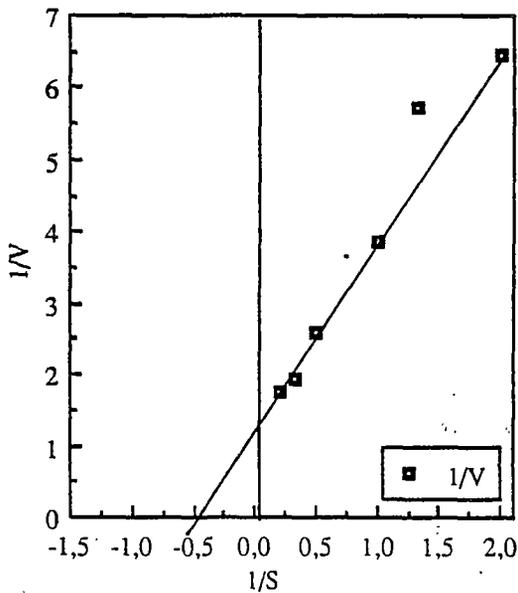
CALS CHLOROPHYLLIENS F1 CAD (14 jours)

Figure 108 :



CALS CHLOROPHYLLIENS F1 CAD (15 JOURS)

Figure 109 :



CALS CHLOROPHYLLIENS F1 CAD (15 JOURS)

c) Résultats

Les résultats de cette expérience sont portés sur la figure 106.

On observe un pH optimum de la PAL autour de 8,6. Cette valeur correspond au pH optimum obtenu par KOUKOL et CONN en 1961, lors de premières mesures faites sur *Hordeum vulgare* et également par HANSON et HAVIR dans leur revue bibliographique sur la PAL (1981).

L'incubation dans du tampon Tris-HCl permet une meilleure expression de l'activité de la L-phénylalanine ammonia-lyase. Pour les dosages en routine de la PAL, nous utiliserons donc une solution tampon Tris-HCl 100 mM ajustée à pH 8,6.

3) Effet de la concentration en substrat-Détermination de la constante de Michaelis-Menten

a) Matériel végétal

Cals chlorophylliens de souche F₁ Cad., âgés de 15 jours, ayant subi 34 repiquages sur le milieu donné dans le chapitre "Matériel et Méthodes", additionnés de 30 g.l⁻¹ (88 mM) de saccharose.

b) Protocole

Le protocole est celui décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

Neuf milieux d'incubations sont réalisés en présence de concentrations croissantes en L-Phénylalanine (de 0,125 mM à 8 mM). De la même manière, 8 milieux d'incubations sont réalisés avec de plus fortes teneurs en L-Phénylalanine (0,25 mM à 32 mM).

c) Résultats

Les valeurs obtenues au cours de cette expérience sont reportées sur la figure 107 pour les faibles concentrations en L-Phénylalanine et sur la figure 108 pour les fortes concentrations en substrat. Les analyses cinétiques montrent que l'enzyme ne suit pas un simple mécanisme michaelien ; la forme sigmoïdale indique que l'enzyme semble soumise à une régulation allostérique de type coopérativité négative. Les courbes $V = f(S)$ présentent une saturation de l'enzyme à 5 mM en phénylalanine.

Les valeurs transformées suivant LINEWEAVER et BURK sont représentées sur la figure 109. La constante de Michaelis-Menten, K_m calculée graphiquement est estimée à 2 mM.

Cette caractérisation partielle de la PAL sur les cultures cellulaires de *Tephrosia vogelii* nous a permis de déterminer les conditions de dosages qui seront utilisées en routine pour les expérimentations suivantes.

C) EVOLUTION DE L'ACTIVITE PAL DANS LES SUSPENSIONS CELLULAIRES CULTIVEES EN BIOREACTEUR

1) Introduction

Lors de l'analyse des résultats obtenus sur les manipulations présentées dans les chapitres III et IV, nous avons, à maintes reprises, mentionné le rôle probablement prédominant de la PAL en tant qu'enzyme pivot du métabolisme des phénylpropanoïdes.

Aussi, après adaptation des méthodes d'extraction et de dosage de l'activité enzymatique de la PAL à notre matériel végétal *in vitro*, nous avons suivi l'évolution de cette activité enzymatique au cours de la culture de suspensions hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*, cultivées en bioréacteur.

2) Suspensions hétérotrophes

a) Matériel végétal utilisé

* Suspensions cellulaires hétérotrophes : souche B cultivée à l'obscurité, ayant subi 47 repiquages sur le milieu décrit dans le chapitre "Matériels et Méthodes".

b) Protocole

Le protocole de culture pour les suspensions hétérotrophes est identique à celui présenté dans le chapitre III sur la culture en bioréacteur. (Un premier cycle de culture est donc réalisé à l'obscurité, et un deuxième cycle à la lumière après renouvellement du milieu).

Les seuls paramètres suivis, sont les suivants :

- _ Roténoïdes totaux intracellulaires
- _ Roténoïdes totaux extracellulaires
- _ Activité spécifique de la PAL

c) Résultats

Les résultats présentés ici correspondent à des manipulations répétées deux fois.

__ *Premier cycle à l'obscurité (figure 110)*

**** Evolution de la production de roténoïdes intracellulaires**

La production de roténoïdes intracellulaires est maximale en fin de phase exponentielle, entre le 6^{ème} (7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF) et le 8^{ème} jour de culture.

Les teneurs en roténone étant très faibles (environ 1 à 5 % des roténoïdes totaux), la production ne sera exprimée qu'en fonction des roténoïdes totaux.

**** Evolution de la production de roténoïdes extracellulaires**

Au cours des repiquages et lors du passage en bioréacteur, les roténoïdes extracellulaires n'ont été présents qu'à l'état de trace à peine détectable lors des analyses HPLC.

**** Evolution de l'activité spécifique de la PAL**

D'après la figure 110, on note deux pics d'activité de la PAL.

Un premier pic se situe au premier jour de culture, juste après l'ensemencement, et un deuxième pic au 6^{ème} jour de culture, peu avant la fin de la phase exponentielle.

Ces deux pics, à deux temps bien définis du cycle de croissance de la culture, sont d'amplitudes égales et de courtes durées (1 à 2 jours maximum). Le phénomène est reproductible.

__ *Deuxième cycle à la lumière (figure 111)*

**** Evolution de la production de roténoïdes intracellulaires**

Le maximum de production de roténoïdes (12,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF) est atteint au 8^{ème} jour de culture, en fin de phase exponentielle. L'accumulation de roténoïdes intracellulaires diminue ensuite très rapidement, elle n'est plus que de 4,25 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF au 10^{ème} jour de culture.

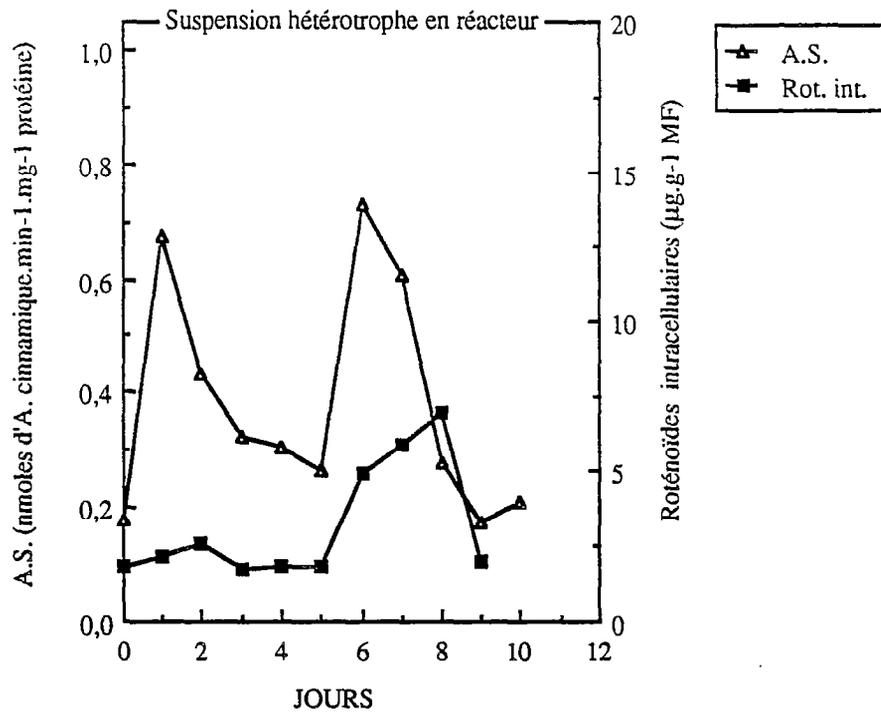
**** Evolution de la production en roténoïdes extracellulaires**

De très faibles concentrations en roténoïdes extracellulaires ont été détectées durant cette expérimentation.

**** Evolution de l'activité spécifique de la PAL**

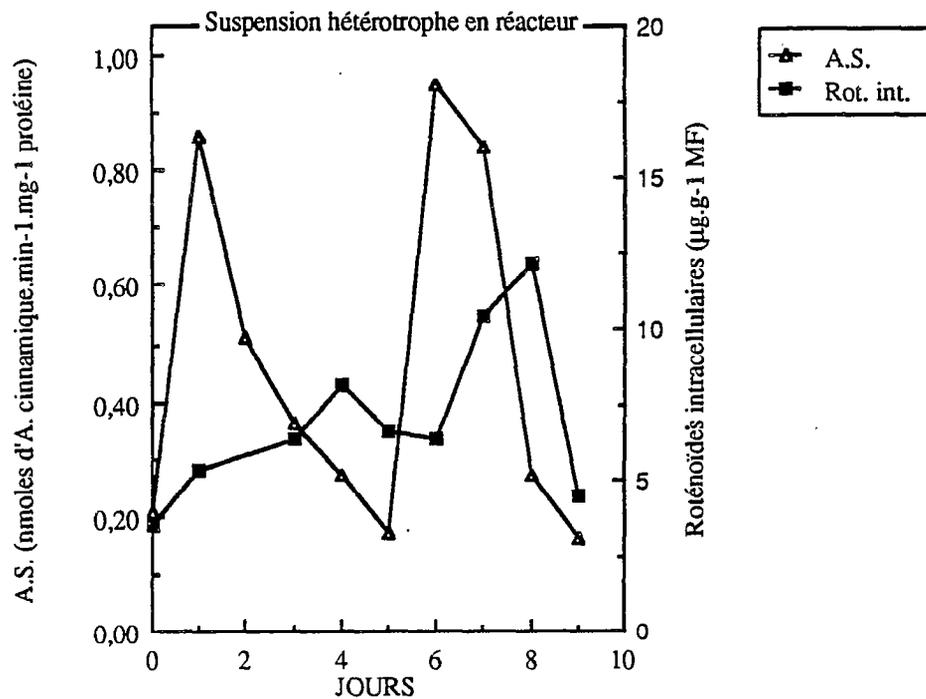
On observe, durant la croissance à la lumière de la suspension cellulaire

Figure 110.:



CORRELATION ENTRE ACTIVITE PAL ET PRODUCTION DE ROTENOIDES A L'OBSCURITE

Figure 111.:



CORRELATION ENTRE ACTIVITE PAL ET PRODUCTION DE ROTENOIDES A LA LUMIERE

hétérotrophe, deux pics d'activité spécifique de la PAL, tout à fait superposable à ceux obtenus à l'obscurité.

Comme à l'obscurité, un premier pic est détectable dès le premier jour de culture puis chute jusqu'à t_5 , un deuxième pic est ensuite observé en fin de phase exponentielle de croissance, c'est à dire dès les 6^{ème} et 7^{ème} jour de culture. Ces deux pics d'activité spécifique de la PAL sont d'amplitudes équivalentes et leurs durées n'excèdent jamais deux jours.

3) Suspension photomixotrophe

a) Matériel végétal utilisé

* Suspensions cellulaires photomixotrophes : souche β , cultivée à la lumière, ayant subi 16 repiquages.

b) Protocole

Le protocole est identique à celui décrit dans le chapitre III sur la culture en bioréacteur. Les paramètres suivis sont les mêmes que ceux définis pour les suspensions cellulaires hétérotrophes.

c) Résultats

Les résultats présentés ici correspondent à des manipulations répétées trois fois (figure 112).

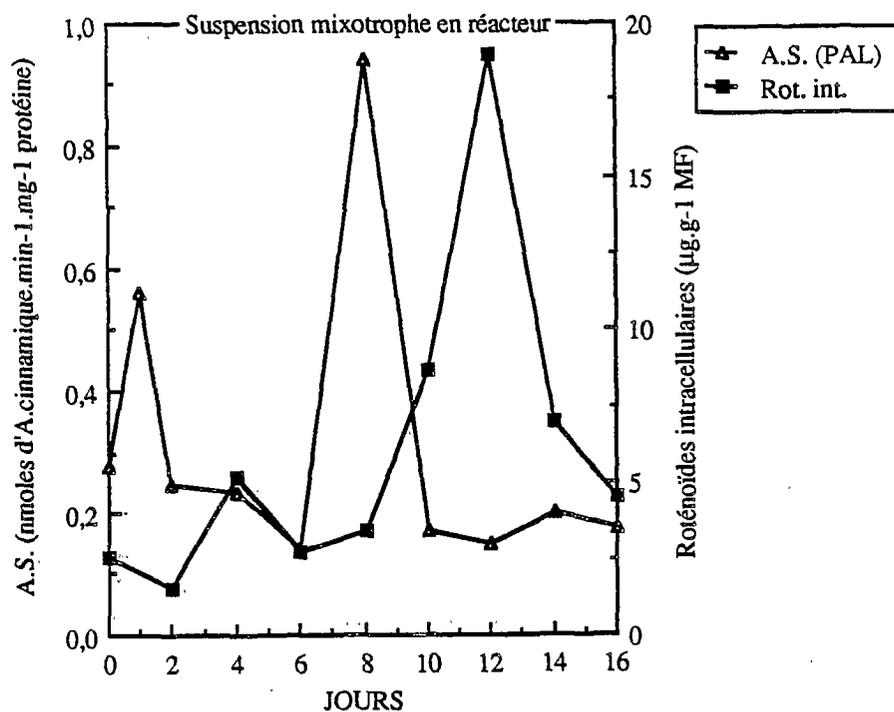
** Evolution de la production de roténoïdes intracellulaires

On observe deux pics de production de roténoïdes intracellulaires.

Un premier, en tout début de culture, de faible amplitude lors du 2^{ème} jour ($5,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF roténoïdes totaux contre $2,41 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF à l'ensemencement), et le deuxième de plus forte amplitude en fin de phase exponentielle au 12^{ème} jour de culture ($19 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF). Cette accumulation de roténoïdes intracellulaires au 12^{ème} jour de culture n'est que transitoire, en effet, elle diminue très rapidement (sa teneur n'est plus que de $2,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF en fin de culture).

La roténone représente ici environ 40 % des roténoïdes totaux.

Figure 112:



**CORRELATION ENTRE ACTIVITE PAL ET
PRODUCTION DE ROTENOIDES**

** Evolution des roténoïdes extracellulaires : à peine détectables

** Evolution de l'activité spécifique de la PAL (figure 114)

Deux pics d'activité spécifique de la PAL sont encore observés au cours du cycle de croissance des cellules photomixotrophes : un premier pic détectable dès le premier jour de culture et de très courte durée, et un deuxième pic de plus forte amplitude apparaissant beaucoup plus tard dans le temps, au 8^{ème} jour de culture en pleine phase exponentielle, s'étalant sur deux jours.

4) Comparaison-Discussion

a) Evolution des roténoïdes intracellulaires

Deux pics d'accumulation de roténoïdes sont mis en évidence dans la souche hétérotrophe (obscurité/lumière) et également pour la souche photomixotrophe.

Il est important de noter que le premier pic de production observé en début de culture est à la limite de la significativité et de beaucoup plus faible amplitude que le second mis en place durant la phase exponentielle.

Dans la souche hétérotrophe, l'accumulation de roténoïdes est exacerbée à la lumière. En effet, le maximum de production obtenu au 6^{ème} jour de culture est de 12 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF à la lumière contre 7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF à l'obscurité soit pratiquement le double.

Cette stimulation de l'accumulation de roténoïdes à la lumière a déjà été observée et discutée dans le paragraphe traitant de l'évolution de la croissance et de la production de roténoïdes en Erlenmeyer.

Ces résultats obtenus ici nous confortent dans l'idée que le facteur lumière est indispensable pour l'expression optimale de la production de roténoïdes.

b) Evolution des roténoïdes extracellulaires

Le dosage des roténoïdes extracellulaires n'a permis de détecter que des traces quelles que soient les souches et les conditions de culture : lumière/obscurité. Il est donc impossible de mettre en relation l'activité PAL et l'excrétion des roténoïdes dans le milieu avec les paramètres lumière ou obscurité.

c) Evolution de l'activité spécifique de la PAL

On observe, à la fois dans les cultures hétérotrophes et photomixotrophes, deux pics d'activité spécifique de la Phénylalanine ammonia-lyase, l'un dès le premier jour de culture

et l'autre en fin de phase exponentielle .

L'intensité de ces deux pics est identique lorsqu'on considère la souche hétérotrophe que ce soit à la lumière ou à l'obscurité.

Par contre, dans les cultures photomixotrophes, ces deux pics ne présentent pas la même amplitude ; le deuxième pic, en fin de phase exponentielle étant deux fois plus important que le premier.

Durant ces expériences, nous avons pu également noter que lors du passage des cultures hétérotrophes de *Tephrosia vogelii* de l'obscurité à la lumière, l'activité spécifique de la PAL est légèrement amplifiée (facteur d'amplification 30%, pas très significatif).

Il est à remarquer que, quelles que soient les conditions de culture : lumière/obscurité, les cellules maintiennent une certaine activité PAL. Cela avait déjà été observé par THORPE *et al.*, 1971, sur des cals de *Citrus* cultivés à la lumière ou à l'obscurité.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces manipulations est en accord notamment avec les résultats de ZIMMERMANN et HAHLBROCK, en 1975 sur les cultures cellulaires de *Petroselinum hortense*.

Ces auteurs ont tout d'abord montré l'existence de deux pics distincts d'activité spécifique de la PAL durant le cycle de la culture. L'un est mesurable juste après l'ensemencement, l'autre est mis en place à la fin de la période d'accroissement de la masse fraîche. Il semblerait, dans le cas du premier pic, que le transfert des cellules, en fin de phase stationnaire dans un milieu neuf, entraîne une augmentation de l'activité PAL (HAHLBROCK et WELLMANN, 1973). De mêmes observations ont été faites par HAHLBROCK et SCHRODER (1975) lors de dilution de suspensions cellulaires de persil dans de l'eau. Un temps de latence de 2 à 3 heures est noté avant le pic d'activité (12-15 heures après la dilution de la culture) qui chute ensuite très rapidement. Ce changement d'activité enzymatique, dans les cultures cellulaires de persil diluées, est corrélé à une synthèse d'ARNm (SCHRODER *et al.*, 1977).

Pensant que l'induction de la PAL était due à une diminution de la densité cellulaire des cultures, HAHLBROCK et SCHRODER, en 1975, ont éliminé des cellules d'une culture en pleine croissance, tout en gardant le même milieu. Aucune induction n'a été observée. Le stimulus dépend donc de la baisse en concentration d'un composé d'origine cellulaire dans le milieu de culture. La nature de ce composé n'a pas été déterminée dans les suspensions cellulaires de persil. Cependant, il a été envisagé la possibilité suivante : une diminution de la concentration en acide hydroxycinnamique pourrait être responsable d'une dérépression de la synthèse de la PAL (ENGELSMA, 1972). Une des approches

possibles de ce problème est de tester l'effet de repiquage de cellules dans du milieu de culture conditionné (sur lequel ont déjà poussé des suspensions). Ainsi, dans des cultures de *Phaseolus vulgaris*, le milieu conditionné inhiberait l'augmentation de l'activité PAL de façon variable (DIXON *et al.*, 1980). Il a été également démontré, que l'eau distillée ayant servi à laver les cellules avait une action inhibitrice sur la PAL. L'acide hydrocinnamique semble être responsable de cette inhibition, mais n'est peut-être pas le seul facteur impliqué. En effet, la concentration en CO₂ dissout pourrait jouer également un rôle crucial dans ce mécanisme. Le dioxyde de carbone, qui est essentiel pour l'initiation de la croissance de cultures cellulaires de Sycomore (GATHERCOLE *et al.*, 1976), absent lors du repiquage, pourrait être impliqué dans l'induction de la PAL. L'hypothèse suivante a été émise : la disponibilité en O₂, augmentée lors de la dilution de la culture, en fin de phase exponentielle, pourrait entraîner une véritable stimulation de la phosphorylation oxydative, d'où une synthèse de protéines.

En fait, le repiquage provoque une rapide stimulation de la formation de polysome et une augmentation du taux d'ARNm (non définis) dans des cultures cellulaires de *Phaseolus vulgaris* et de *Glycine max* (BEVAN et NORTHCOTE, 1981). Ainsi, d'autres enzymes que la PAL sont activées lors du repiquage des cultures cellulaires : Nitrate réductase et Rubisco (RIVAL, 1989).

L'augmentation de l'activité de la PAL (faible dans le cas de *Tephrosia vogelii*), lors du passage de l'obscurité à la lumière des suspensions cellulaires hétérotrophes, a déjà été observée par de nombreux auteurs sur d'autres cultures cellulaires (ZIMMERMANN et HAHLBROCK, 1975 ; CAMM et TOWERS, 1977 ; SCHRODER *et al.*, 1977). Cette stimulation transitoire de l'activité spécifique de la PAL, lors de l'éclairement des suspensions, est due à une dérepression du génome et une augmentation du pool d'ARNm codant pour cette enzyme (BETZ *et al.*, 1978 ; SCHRODER *et al.*, 1977 ; SCHRODER *et al.*, 1979).

L'existence d'une activité PAL à l'obscurité peut paraître paradoxale. En fait, il a été également démontré que si la lumière stimulait la synthèse de la PAL, l'obscurité, elle, n'inhibait ni sa synthèse ni son activité qui n'est alors que réduite (THORPE *et al.*, 1971).

La PAL, en fait, est sous contrôle du phytochrome. Cela a été démontré au niveau de la plante entière (SCHOPFER, 1977) mais également sur des cultures cellulaires de *Petroselinum hortense* (WELLMANN, 1974 ; WELLMANN, 1975 ; WELLMANN et SCHOPFER, 1975). Les résultats obtenus montrent que l'activité de l'enzyme augmente

considérablement après un temps de latence d'environ 1 heure, après l'éclairement RS. Après une vingtaine d'heures, l'activité chute ; on peut interpréter ces faits en supposant l'existence de trois évènements qui se succèdent dans le temps : induction de la synthèse de l'enzyme, inactivation de l'enzyme et répression de la synthèse enzymatique.

Ce type de mécanisme est identique à celui qui survient lors du repiquage des suspensions cellulaires.

Cela implique donc, que la PAL est sous contrôle transcriptionnel pour la lumière et la dilution, dans les cultures cellulaires de *Petroselinum hortense* (JONES, 1984).

Ainsi selon la littérature, sous l'effet des deux types de stimuli que sont la dilution de suspensions cellulaires et la lumière, on assiste réellement à une induction et non à une stimulation post traductionnelle de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase.

d) Corrélation entre activité PAL et production de roténoïdes

Dans les deux souches étudiées, après dilution de la suspension, il semble que l'induction de la PAL et son activité maximale précèdent légèrement le pic de production de roténoïdes.

De même, le deuxième pic d'activité spécifique de la PAL, dans tous les cas (souche hétérotrophe lumière/obscurité, souche photomixotrophe), précède légèrement l'augmentation de la production de roténoïdes intracellulaires.

Le passage de l'obscurité à la lumière, des cultures cellulaires hétérotrophes de *Tephrosia vogelii*, se traduit par une augmentation de l'activité PAL corrélée à celle de la production de roténoïdes. L'activité PAL à la lumière est ainsi multipliée par un facteur de 1,35 et l'accumulation par un facteur 2.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature. En effet, l'induction de l'activité PAL par la lumière, en relation avec une production maximale de métabolites *in vitro*, a déjà été rapportée par IBRAHIM et EDGAR, (1976) ainsi que KOUMBA et MACHEIX (1982), pour l'accumulation d'acide hydroxycinnamique dans des suspensions cellulaires respectivement de *Perilla* et de pomme. BRUNET et IBRAHIM en 1973, ont également mis en évidence des résultats analogues sur des cultures de tissu de *Citrus* produisant des dérivées flavones. De même, OZEKI et KOMAMINE, en 1985, notent sous l'effet de la lumière une induction de la PAL corrélée à une accumulation d'anthocyanines dans des suspensions cellulaires de carotte.

Cependant, le taux de production des composés phénoliques ne se trouve pas seulement sous la dépendance de l'induction de la PAL, d'autres enzymes également sont

impliquées.

Ainsi, dans les cultures cellulaires de persil, lors de l'induction de l'accumulation de flavonoïdes sous l'effet de la lumière blanche ou UV, une induction simultanée de trois enzymes du métabolisme général des phénylpropanoïdes (Groupe I : Phénylalanine ammonia-lyase (PAL), Cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et 4-hydroxycinnamate CoA ligase (4HCL)) et de cinq enzymes de la voie des flavones (groupe II) a été mise en évidence (HAHLBROCK *et al.*, 1976).

La durée des activités induites des deux groupes enzymatiques diffère considérablement. Cependant, les enzymes de chaque groupe enzymatique, qui catalysent successivement les différentes séquences de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, apparaissent être régulés de manière coordonnée.

L'implication du Pfr dans ce mécanisme complexe, peut être démontrée après des expériences d'induction/réversion dans des suspensions cellulaires de persil (WELLMANN, 1974 ; WELLMANN, 1975 ; WELLMANN et SCHOPFER, 1975).

Finalement, la synthèse de flavonoïdes, sous la dépendance de la lumière, semble être initiée par Pfr, par l'intermédiaire de l'induction simultanée de deux groupes d'enzymes coordonnés.

D) LA STIMULATION DE LA PRODUCTION ET L'ACTIVITE PAL

1) Introduction

La PAL, rappelons-le, enzyme clé de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et donc des roténoïdes, est facilement inductible sous l'effet de différents agents stressants.

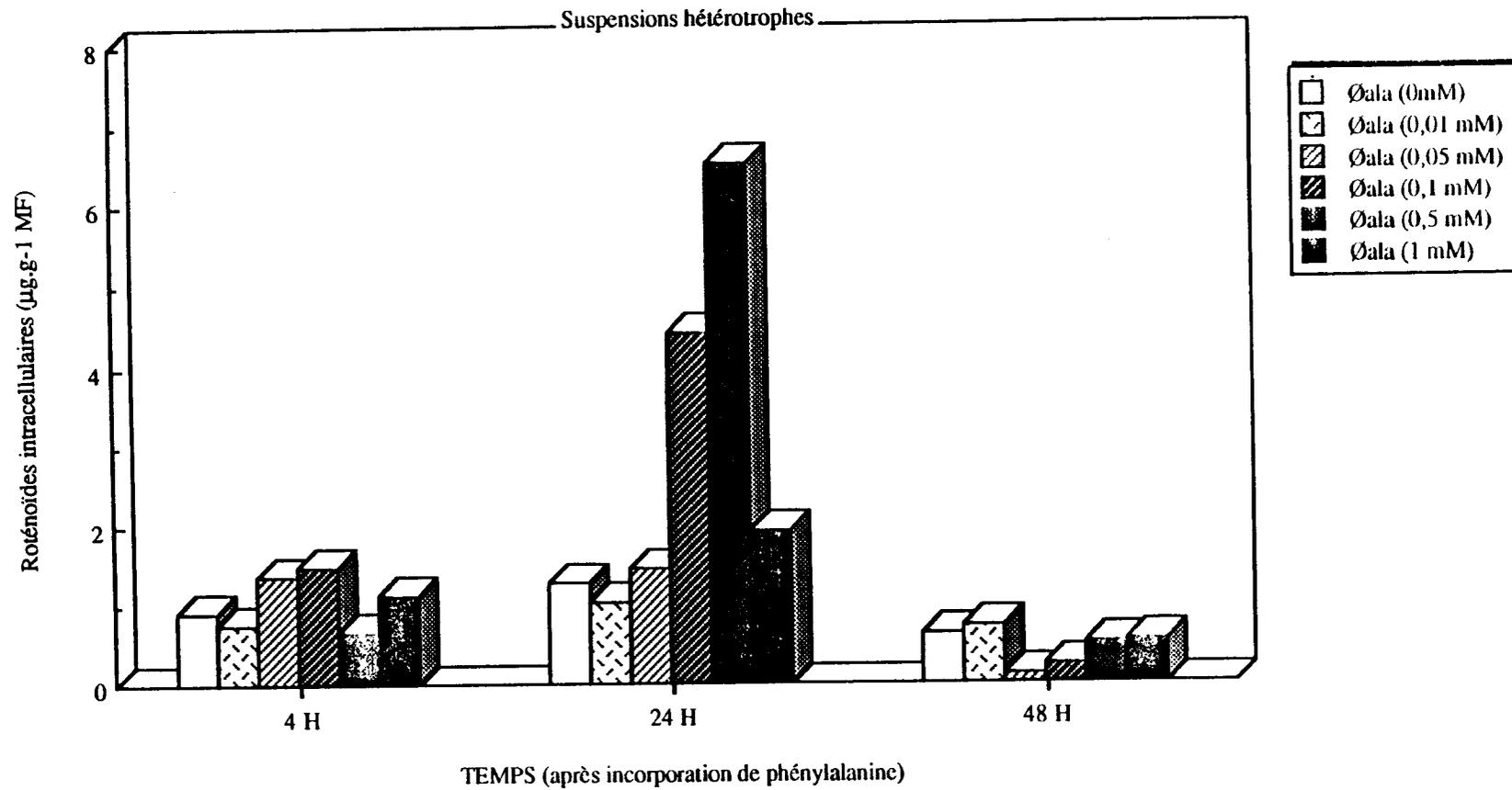
Aussi, une étude de l'évolution de l'activité spécifique de la Phénylalanine ammonia-lyase en relation avec la production de roténoïdes, dans des suspensions hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* soumises à différents stress biotiques ou abiotiques, et également lors de l'ajout de précurseur tel que la L-phénylalanine, a été entreprise.

2) Incorporation de L-Phénylalanine

a) Souche hétérotrophe

Remarque : Le matériel végétal et le protocole utilisés pour ces expériences sont identiques à ceux décrits dans le paragraphe D sur l'optimisation de la production de

Figure 113 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES APRES
INCORPORATION DE PHENYLALANINE AU 6ème JOUR DE CULTURE

roténoïdes. Des prélèvements sont effectués 4, 24 et 48 heures après l'incorporation de L-phénylalanine.

— *Evolution de la production de roténoïdes intracellulaires (figure 113)*

Quatre heures après l'ajout de L-phénylalanine dans le milieu de culture, on n'observe pas de modification notable de l'accumulation de roténoïdes intracellulaires.

Un effet positif des teneurs 0,1 mM et 0,5 mM en précurseur est noté 24 heures après l'incorporation. La production de roténoïdes intracellulaires est multipliée par 3,5 à 0,1 mM et par 5 à 0,5 mM par rapport au témoin.

48 heures après l'ajout de précurseur, plus aucune stimulation de l'accumulation de roténoïdes intracellulaires n'est mise en évidence, et cela quelle que soit la concentration en L-phénylalanine.

— *Evolution de l'activité spécifique de la PAL (figure 114)*

L'activité spécifique de la L-phénylalanine ammonia-lyase n'est pas modifiée 4 heures après l'incorporation de précurseur dans le milieu de culture, excepté à la concentration de 0,5 mM, où elle est multipliée par 2,5.

24 heures après, on observe une stimulation transitoire de l'activité PAL par des concentrations en L-phénylalanine exogène de 0,1 mM (x 1,65), de 0,5 mM (x 2) et de 1 mM (x 1,54), qui n'est plus détectable 48 heures après le traitement.

b) Souche photomixotrophe

Remarque identique à celle faite précédemment sur la souche β hétérotrophe quant au matériel végétal et au protocole utilisés.

— *Evolution de la production de roténoïdes intracellulaires (figure 115)*

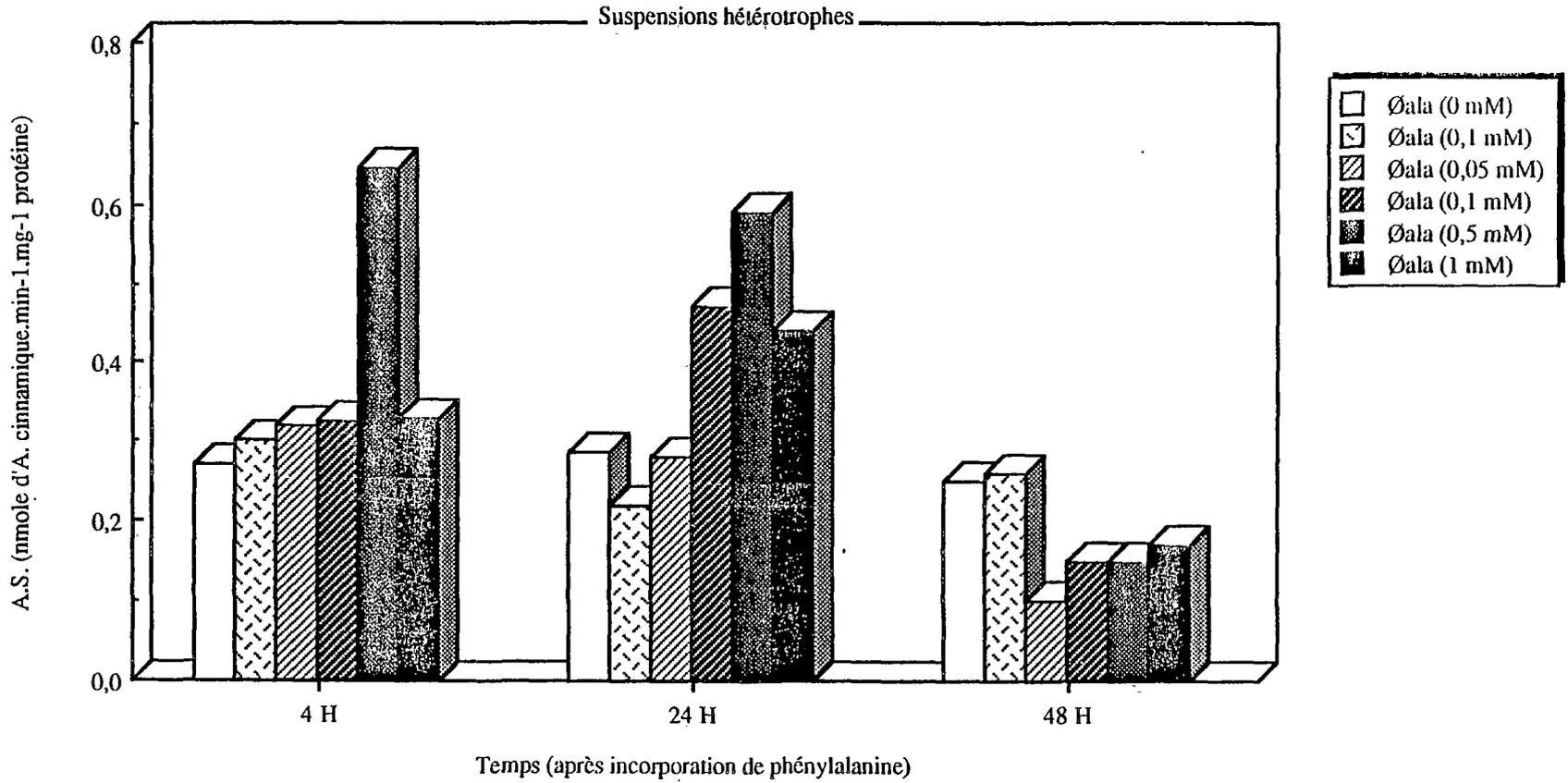
On observe, 4 heures après l'ajonction de précurseurs, de très faibles teneurs en roténoïdes identiques dans les essais et les témoins.

24 heures après l'ajout du précurseur, l'accumulation de roténoïdes intracellulaires est très largement modifiée, surtout aux fortes concentrations en phénylalanine.

La teneur en métabolites est multipliée par 10 à la concentration optimum de 0,1 mM, par 8 à 0,5 mM et par 4 à 1 mM.

Il semblerait que 48 heures après l'ajout de phénylalanine il n'y ait plus aucun effet

Figure 114 :



EVOLUTION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PAL APRES
INCORPORATION DE PHENYLALANINE AU 6ème JOUR DE CULTURE

sur l'accumulation de roténoïdes intracellulaires.

Par contre, la teneur en métabolites du témoin est importante, ce qui semblerait correspondre au pic de production tel qu'il a été décrit dans le chapitre sur l'évolution de l'activité PAL au cours de la culture des suspensions cellulaires.

— Evolution des roténoïdes extracellulaires

Au cours de cette expérience, les roténoïdes extracellulaires n'ont été détectées qu'à l'état de traces.

— Evolution de l'activité spécifique de la PAL (figure 116)

La Phénylalanine ammonia-lyase est sensible à la présence de L-phénylalanine, dans le milieu de culture et cela 4 heures après l'incorporation. Une augmentation de l'activité PAL est observable à la concentration de 0,1 mM, où elle est multipliée par un facteur 3 et à 0,5 mM, où l'activité de la PAL n'est multipliée que par un facteur 2.

24 heures après, on ne note plus d'effet positif du précurseur sur l'activité de la PAL. Par contre, une importante augmentation de l'activité PAL est notée dans le témoin, correspondant apparemment au pic d'activité en fin de phase exponentielle, précédant le pic de production de roténoïdes.

Cette activité spécifique de la PAL reste encore forte 48 heures après l'incorporation aussi bien dans le témoin que dans les essais comportant de faibles teneurs en phénylalanine.

c) Comparaison-Discussion

— Evolution de la production de roténoïdes intracellulaires

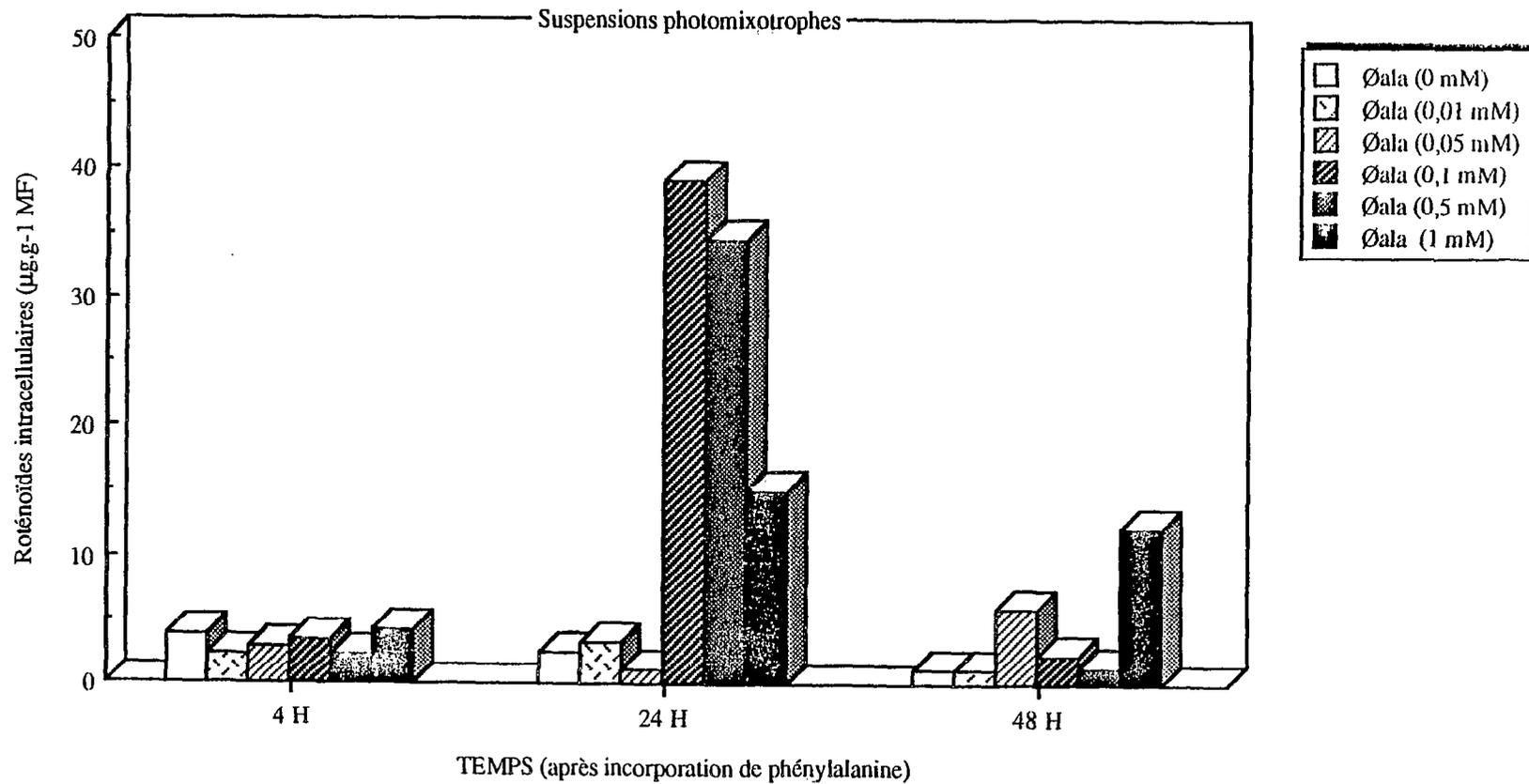
On note en général un effet plutôt positif de l'incorporation de L-phénylalanine au milieu de culture sur la production de roténoïdes intracellulaires, aussi bien pour les suspensions cellulaires hétérotrophes que photomixotrophes.

Cette stimulation est surtout observable 24 heures après l'adjonction de précurseurs, à fortes concentrations en phénylalanine.

L'accumulation de roténoïdes lors de l'apport de phénylalanine, est beaucoup plus importante dans les cultures photomixotrophes que dans les cultures hétérotrophes.

En effet, pour la même concentration en précurseur de 0,1 mM, on note un facteur de multiplication de la production de 10 pour la souche photomixotrophe, et de 3,5 seulement pour la souche hétérotrophe.

Figure 115 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES APRES
INCORPORATION DE PHENYLALANINE AU 12^{ème} JOUR DE CULTURE

— *Evolution de l'activité spécifique de la PAL*

L'adjonction de L-phénylalanine au milieu de culture induit, 4 heures après, une augmentation transitoire de l'activité spécifique de la PAL, dans des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes. Cette activité est maximale en présence de 0,1 mM de phénylalanine dans la souche photomixotrophe et de 0,5 mM dans la souche hétérotrophe.

24 heures et 48 heures après on ne note plus d'effet positif de l'adjonction du précurseur biosynthétique sur l'activité PAL.

Ces résultats sont en accord avec les observations faites par CREASY (1968) sur des feuilles de fraisier. Il a démontré que de faibles teneurs en phénylalanine inhibaient l'activité spécifique de la PAL ; par contre, des concentrations intermédiaires ont un effet favorable sur le taux de Phénylalanine ammonia-lyase.

ZUCKER, en 1968, a montré quant à lui que la phénylalanine, apportée à forte dose (5×10^{-2} M) à des tubercules de Pomme de terre, inhibait l'activité spécifique de la PAL.

THORPE *et al.* (1971), ont pour leur part observé que la phénylalanine (à faible concentration non toxique, 0,1 mM et 0,001 mM) produisait un effet légèrement positif sur l'activité de la PAL de cultures de tissus de *Citrus paradisi*.

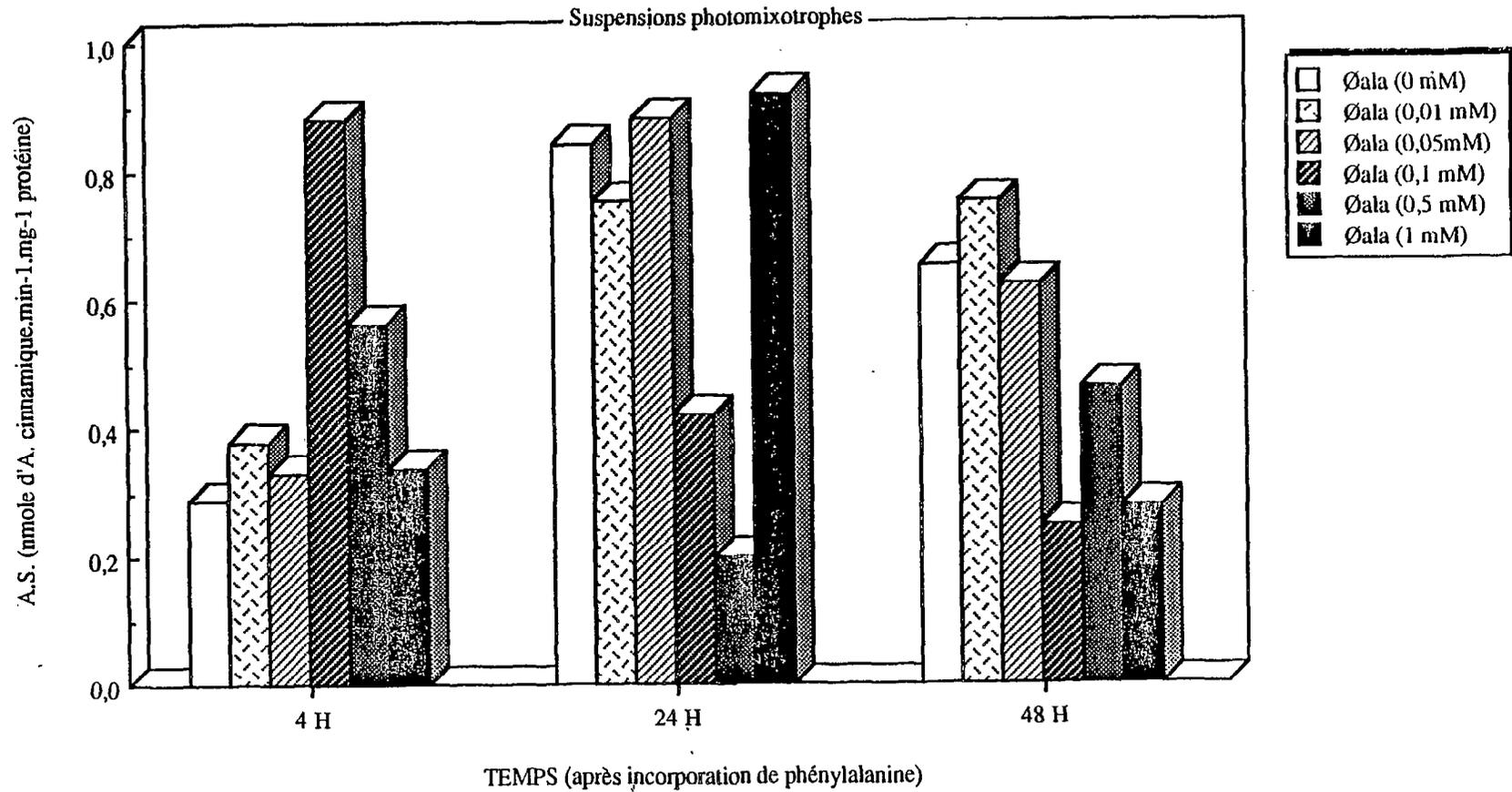
— *Evolution de l'activité PAL en relation avec la production de roténoïdes*

L'activité spécifique de la PAL semble précéder l'accumulation de roténoïdes, dans les suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes, en présence de phénylalanine. Les concentrations en précurseur de 0,1 mM et de 0,5 mM sont les plus favorables à la production de roténoïdes et induisent une augmentation de l'activité PAL. MACHEIX *et al.*, (1981) ont également démontré que l'accumulation de dérivés phénoliques lors de l'incorporation de phénylalanine était corrélée positivement à une augmentation de l'activité PAL, dans des suspensions cellulaires de Pomme.

Il existe en fait, un certain antagonisme dans l'utilisation possible de la phénylalanine entre la protéosynthèse et la biosynthèse de flavonoïdes et de dérivées cinnamiques (MARGNA, 1977 ; PHILLIPS et HENSHAW, 1977).

En effet, dans des conditions favorables pour la biosynthèse de protéines (croissance active de la suspension), on observe une diminution de la teneur en phénylpropanoïdes. Par contre, toutes conditions conduisant à une répression de la synthèse de protéines ou favorisant leur "turn-over" et leur catabolisme semblent stimuler l'accumulation de composés phénoliques. Ainsi, MACHEIX *et al.*, (1981) ont démontré

Figure 116 :



EVOLUTION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PAL APRES
INCORPORATION DE PHENYLALANINE AU 12ème JOUR DE CULTURE

que l'incorporation de phénylalanine dans les dérivés phénoliques est pratiquement inexistante pendant la phase exponentielle de croissance de suspensions cellulaires de Pomme lorsque la teneur en protéines est importante. La concentration en composés phénoliques augmente seulement lors de l'addition de phénylalanine, en début de culture ou durant la phase stationnaire de croissance.

Il est probable que la biosynthèse de protéines, processus cellulaire indispensable à la croissance, soit le premier consommateur de phénylalanine synthétisée par les cellules. La quantité de phénylalanine devenant disponible pour la production de phénylpropanoïdes est déterminée alors suivant le degré d'utilisation de celle-ci dans la protéosynthèse, d'une part, et suivant l'importance de son relargage par les protéines durant leur "turn-over", d'autre part. Les relations synchrones existant entre le métabolisme des protéines et l'accumulation de phénylpropanoïdes semblent prouver que la quantité disponible en phénylalanine est souvent beaucoup plus faible que la capacité catalytique de la PAL (MARGNA, 1977), et limite donc l'expression maximale de la production de métabolites.

L'exemple de cultures cellulaires de *Acer pseudoplatanus*, illustre bien cette antagonisme. L'apport de phénylalanine marquée au ^{14}C permet de suivre son incorporation à différents niveaux de la biosynthèse. Ainsi, lors d'apport de ce précurseur aux cultures cellulaires, la radioactivité se retrouve au niveau des phénols. Par contre, si on injecte en surcroît de l'urée, la phénylalanine sera incorporée préférentiellement dans les protéines.

La période à laquelle est apportée le précurseur est donc de la plus grande importance, pour présager de son action sur la production de composés phénylpropanoïdiques. En effet, suivant la teneur en azote du milieu, la phénylalanine sera utilisée *via* la protéosynthèse ou *via* la biosynthèse de phénylpropanoïdes.

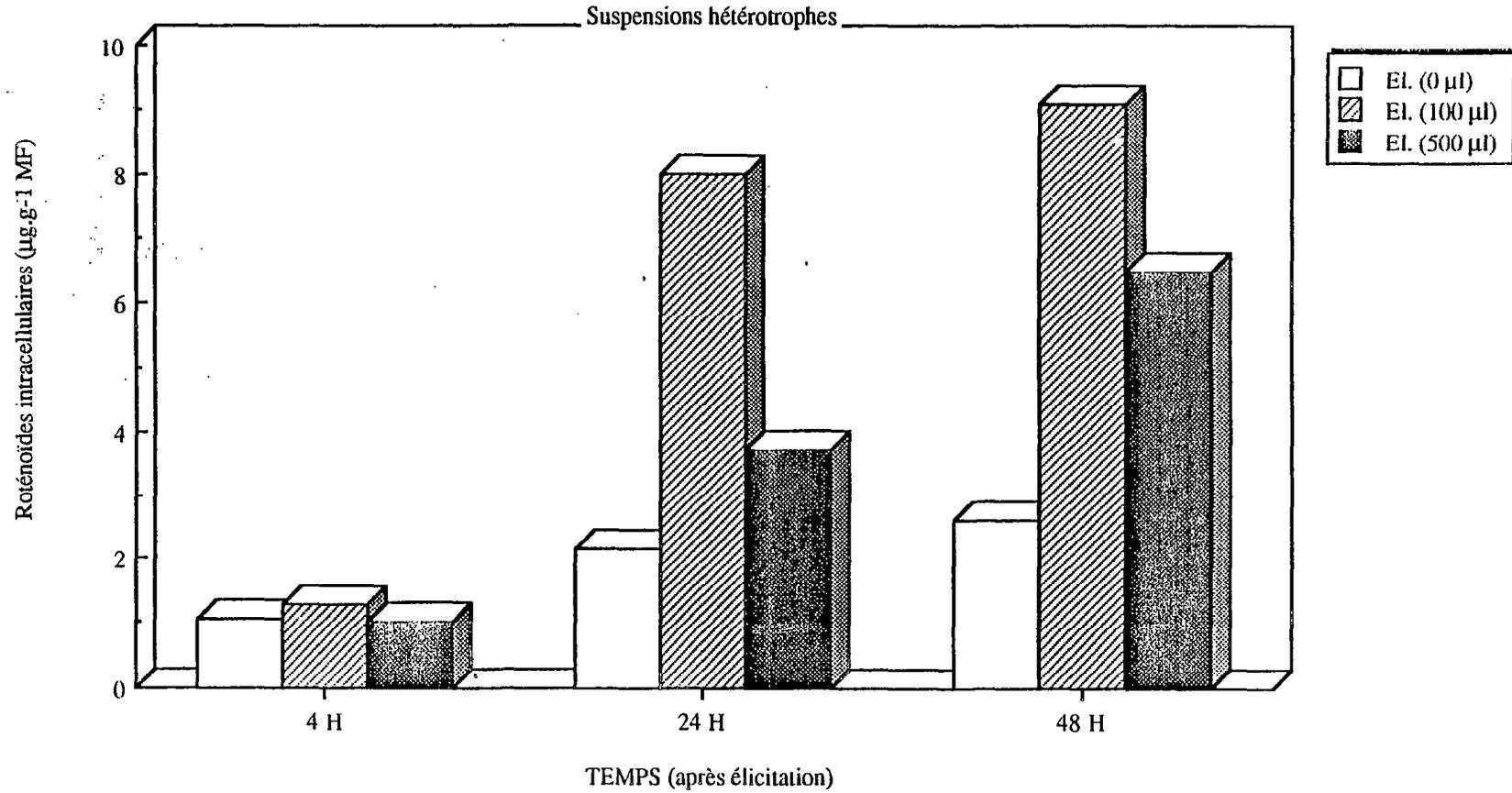
3) Stress d'origine biotique

a) Eliciteur pathogène

— Souche β hétérotrophe

Remarque : Le matériel végétal et le protocole utilisés pour ces expériences sont identiques à ceux décrits dans le chapitre IV sur l'optimisation de la production de roténoïdes. Des prélèvements sont effectués 4, 24 et 48 heures après l'incorporation de 100 et 500 μl d'éliciteurs 123 B.

Figure 117 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES INTRACELLULAIRES
APRES ELICITATION AU 6^{ème} JOUR DE CULTURE

**** *Evolution de la production intracellulaire de roténoïdes : (figure 117)***

Quatre heures après l'ajout de deux concentrations en éliciteurs (100 et 500 μl), on n'observe pas de modification de la teneur en roténoïdes intracellulaires par rapport au témoin.

En présence d'éliciteur à la concentration de 100 μl , on note une stimulation de la l'accumulation de roténoïdes intracellulaires (x3,6), 24 heures après l'élicitation. Un même effet positif mais moindre, de forte teneur en éliciteur (500 μl), est obtenu après ce même temps (la production est multiplié par 1,7).

48 heures après l'élicitation, un effet positif des deux concentrations en éliciteurs est observé sur l'accumulation de roténoïdes avec un facteur de multiplication de 3,5 en présence de 100 μl d'éliciteur et de 2,5 en présence de 500 μl .

**** *Evolution de l'activité spécifique de la PAL (figure 118)***

L'activité spécifique de la L-phénylalanine ammonia-lyase est largement modifiée 4 heures après l'ajout d'éliciteur dans le milieu de culture, aussi bien lors de l'incorporation de 100 μl (activité PAL x 3), que de 500 μl (activité PAL x 4). L'induction de la PAL précède nettement la synthèse des roténoïdes.

24 heures après l'élicitation, plus aucune stimulation de l'activité enzymatique de la PAL par des teneurs croissantes en éliciteur 123 B n'est détectable ; au contraire, on note même une diminution des activités enzymatiques par rapport au témoin.

L'évolution de l'activité PAL 48 heures après élicitation est identique à celle observée 24 heures après, les valeurs obtenues en présence d'éliciteurs sont plus faibles que dans le témoin.

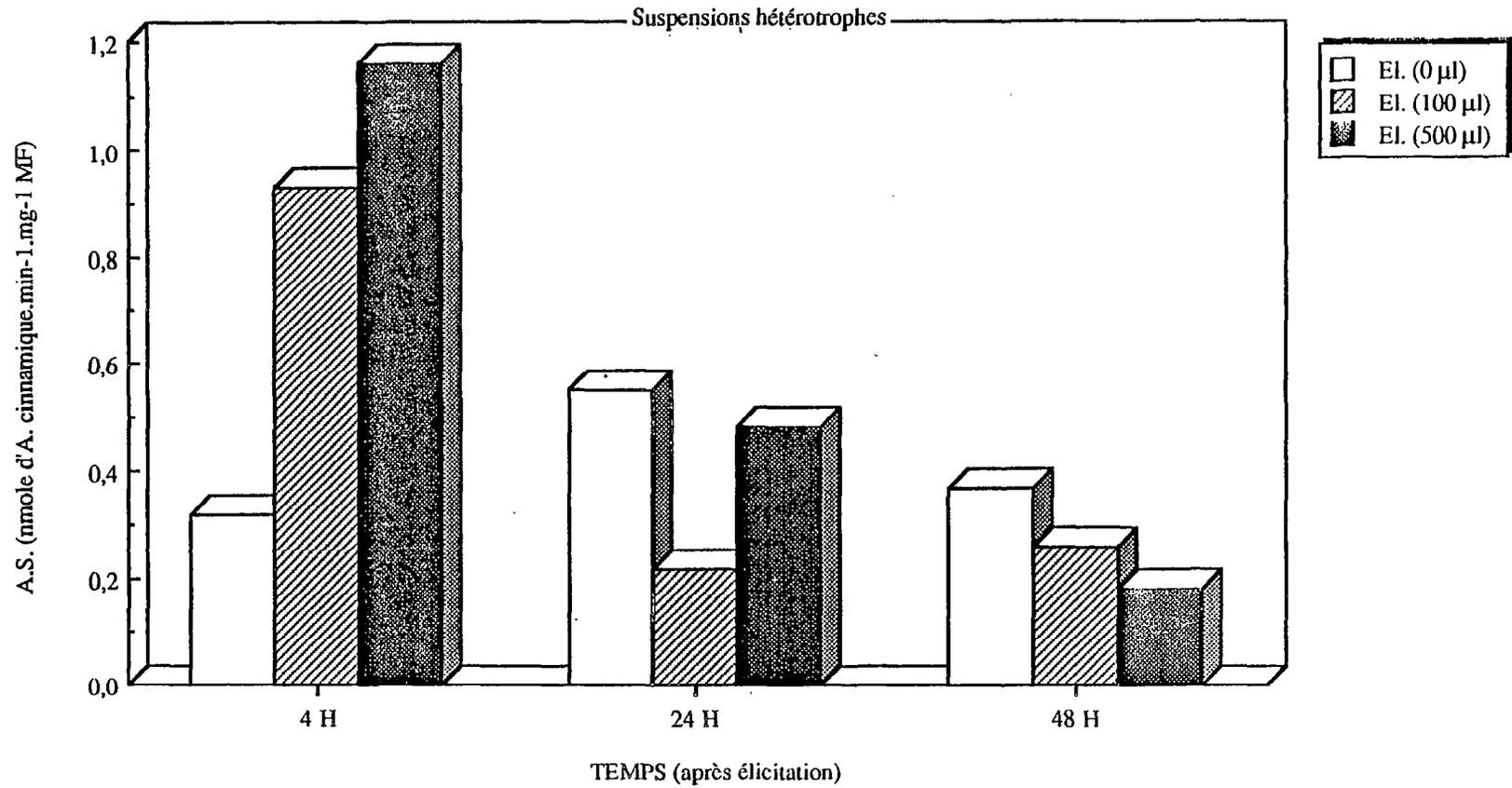
Discussion

* On note un effet plutôt positif de l'incorporation d'éliciteur 123 B au milieu de culture sur la production de roténoïdes intracellulaires.

Cette stimulation est surtout observable 24 heures et 48 heures après l'adjonction d'éliciteurs pathogènes à la concentration de 100 μl et également 500 μl . Le facteur de multiplication de la production est identique 24 et 48 heures après l'élicitation en présence de 100 μl d'éliciteur (x 3,5).

* L'adjonction d'éliciteur au milieu de culture induit également, 4 heures après, une augmentation rapide et transitoire de l'activité PAL (x3 voire 4) qui précède le pic de

Figure 118 :



EVOLUTION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PAL
APRES ELICITATION AU 6ème JOUR DE CULTURE

production de roténoïdes.

Cette stimulation de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase, après élicitation, a déjà été rapportée notamment par LAMB et DIXON, (1978), sur des cultures cellulaires de *Phaseolus vulgaris*, par EBEL *et al.*, (1976, 1984), sur des suspensions cellulaires de *Glycine max* et par HAHNBROCK *et al.*, (1981), TIETJEN et MATERN, (1983) sur des cultures de *Petroselinum hortense*.

Il semblerait que l'addition d'éliciteur induit une dérépression du génome et l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, dont notamment la PAL, dans les trois types de culture citées ci-dessus (EILERT, 1987).

Cette induction de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase a été également observée chez d'autres plantes. Ainsi, HATTORI et OHTA, (1985) ont montré l'existence d'une stimulation de l'activité spécifique de la PAL lors de l'apport de *Phytophthora megasperma* var. *sojae* sur des suspensions cellulaires de *Vigna angularis*. Cette augmentation de l'activité PAL est également due ici à une synthèse *de novo* de la PAL (HATTORI et OHTA, 1985).

La réponse de la PAL lors de l'élicitation est très rapide et transitoire, son activité est maximale 4 heures après le traitement dans les cultures hétérotrophes de *Tephrosia vogelii* et précède la synthèse de roténoïdes.

Cette observation avait déjà été faite par HATTORI et OHTA, (1985), sur des suspensions cellulaires de *Vigna angularis*, où l'activité maximale de la PAL est atteinte 3 à 4 heures après l'élicitation, et ensuite diminue très vite en l'espace de quelques heures.

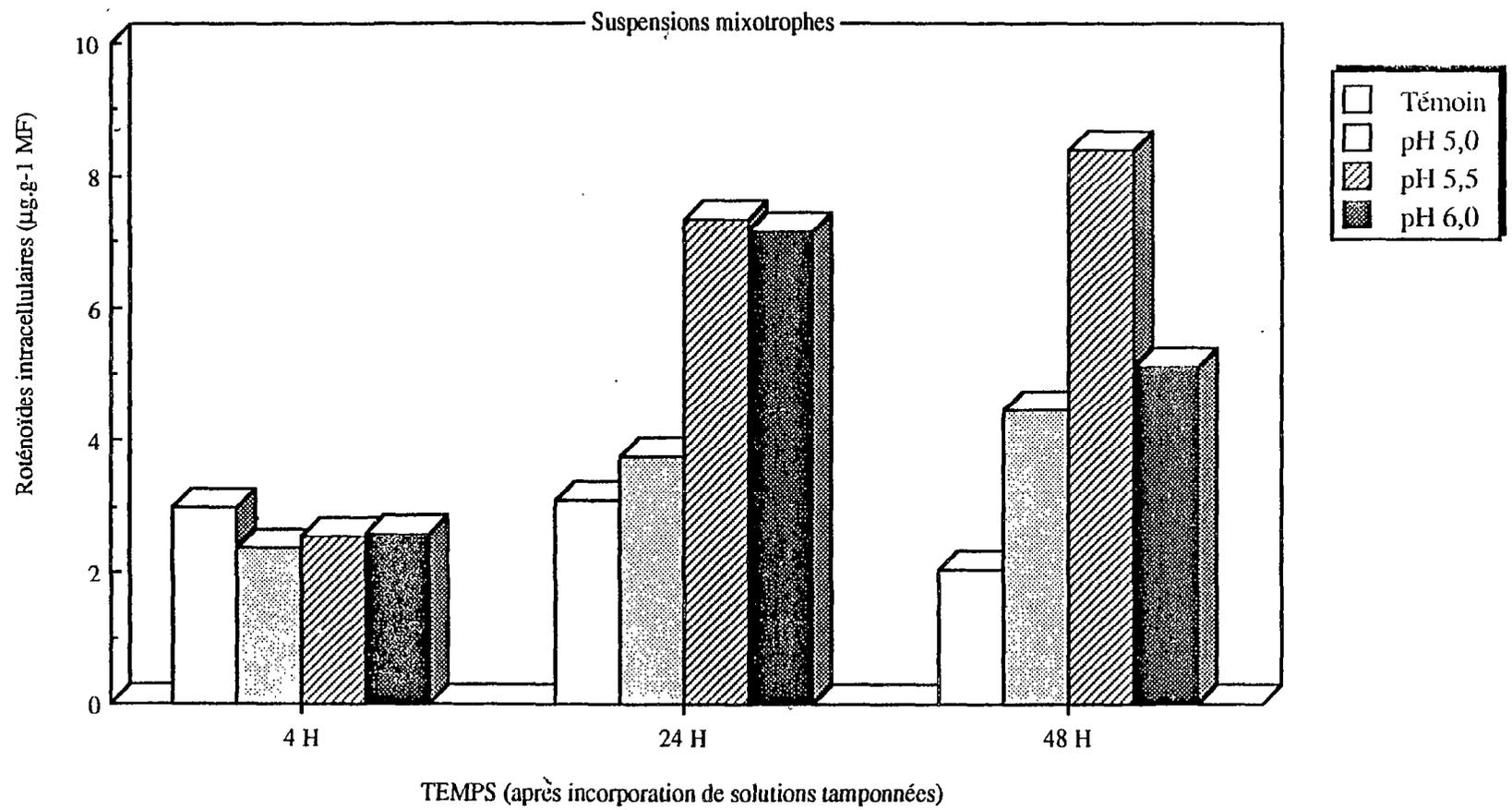
De nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le mécanisme d'induction de l'activité PAL mais également d'autres enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, lors d'élicitation.

Il a été suggéré que les modifications du potentiel de membrane ou des transports d'ions décrits par différents auteurs (EBEL *et al.*, 1976 ; KATOU *et al.*, 1982 ; LERNER et REUVENI, 1982 ; YOUNG *et al.*, 1982) pourraient être une des étapes intermédiaires induisant l'augmentation de la transcription des ARNm, codant notamment pour la PAL, lors du processus d'élicitation.

**** Evolution de l'activité PAL en relation avec la production de roténoïdes**

Au cours de cette étude, on observe une accumulation de roténoïdes intracellulaires précédée par une augmentation de l'activité PAL aussi bien dans les suspensions hétérotrophes que photomixotrophes.

Figure 119 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES
APRES UN STRESS PH AU 12^{ème} JOUR DE CULTURE

Bien que ces composés ne soient pas des phytoalexines au sens strict du terme, leur production est stimulée en présence d'éliciteurs pathogènes, ils sont donc considérés comme des "stress compounds". De tels résultats ont été observés notamment par HATTORI et OHTA (1985) sur des suspensions cellulaires de *Vigna angularis*, où l'induction de l'activité PAL est corrélée à la teneur en isoflavone.

De même, dans des cultures cellulaires de *Glycine max* traitées avec *Phytophthora*, on observe une augmentation de l'activité PAL précédant la synthèse d'isoflavonoïdes (EBEL *et al.*, 1976).

Cependant, l'augmentation de l'activité PAL lors de la mise en présence avec un éliciteur n'induit pas nécessairement une accumulation de métabolites. Ainsi, dans des cultures cellulaires de persil, l'ajout de différents éliciteurs tels que chitosane ou poly-L-lysine entraîne une augmentation de l'activité PAL mais aucune modification dans la formation de coumarine (KOMBRINK et HAHLBROCK, 1986).

EBEL *et al.*, 1984, ont également démontré que l'induction de la PAL mais également d'autres enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, après traitement avec des éliciteurs, n'est pas obligatoirement suivie par une formation d'isoflavonoïdes dans des cultures cellulaires de *Glycine max*.

Ce manque de coordination entre l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase et la chalcone synthase et le taux de phytoalexines induites, pourrait impliquer qu'une autre enzyme de la voie de biosynthèse, dans les cultures cellulaires de soja, catalyse une étape limitante dans les conditions de culture retenue (EBEL *et al.*, 1984).

4) Stress d'origine abiotique

a) modification du pH du milieu de culture

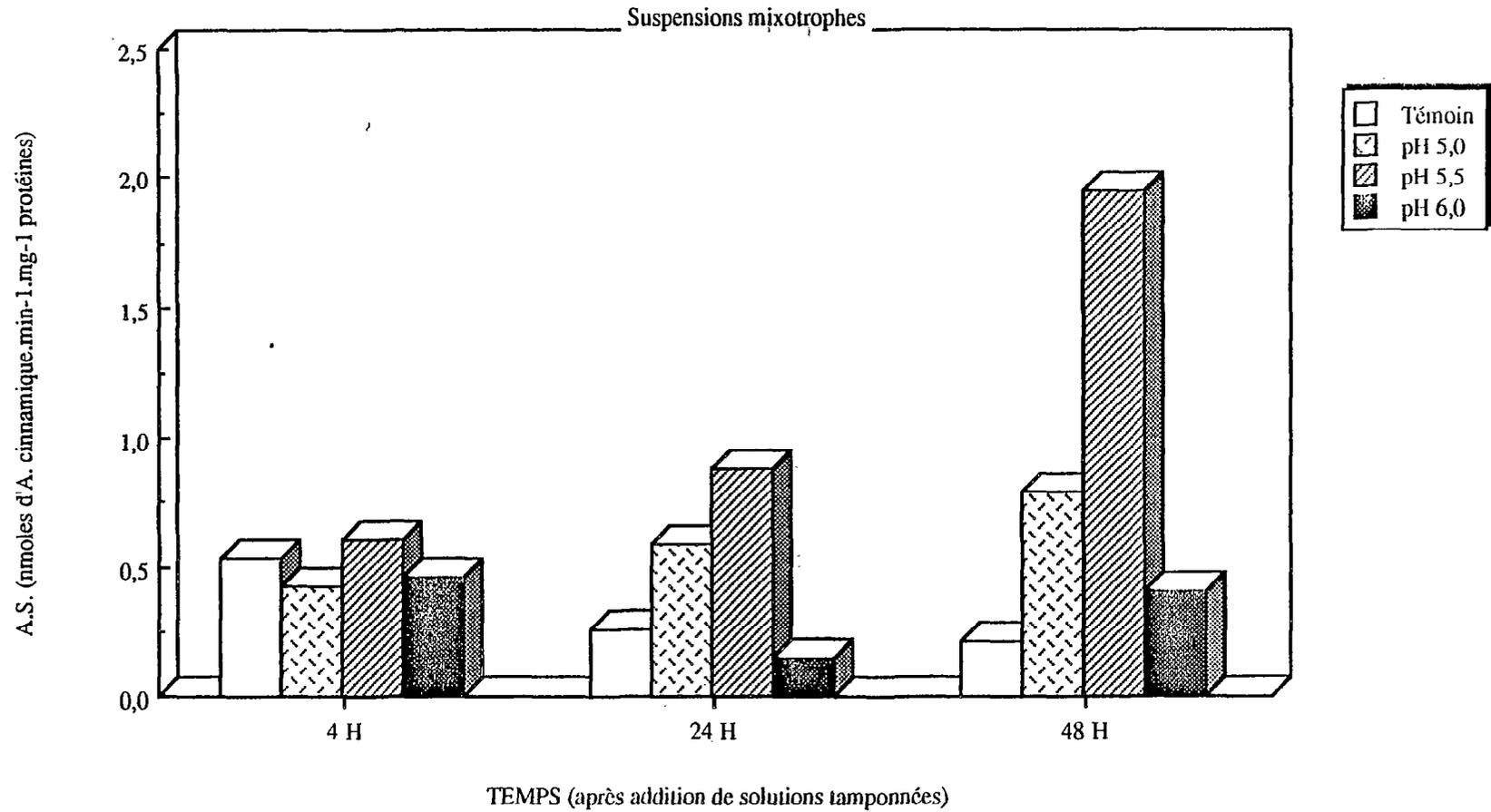
— Souche β photomixotrophe

Remarque : Le matériel végétal et le protocole utilisés pour ces expériences sont identiques à ceux décrits dans le chapitre IV sur l'optimisation de la production de roténoïdes. Des prélèvements sont effectués 4, 24 et 48 heures après l'incorporation de solutions tamponnées à pH 5,0 ; 5,5 ; 6,0.

** Evolution de la production intracellulaire de roténoïdes (figure 119)

Pour les résultats se référer au chapitre IV.

Figure 120 :



**EVOLUTION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PAL ET
DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES APRES UN STRESS PH**

**** *Evolution de l'activité spécifique de la PAL (figure 120)***

Lors de l'élévation du pH du milieu de culture, on n'observe pas, 4 heures après l'addition de solutions tamponnées, de modifications importantes au niveau de l'activité spécifique de la PAL.

24 heures après, une nette stimulation des solutions tamponnées sur l'activité enzymatique de la PAL est notée : à pH 5 (x 2,3) ; à pH 5,5 (x 3,4) ; et un effet négatif à pH 6.

Cette induction de l'activité PAL par un stress à pH 5,0 et 5,5 est encore détectable, 48 heures après l'addition des solutions tamponnées. L'activité spécifique de la PAL à pH 5,0 est multipliée par 3,8 et à pH 5,5 par 9.

— *Discussion*

* La stimulation de la production de roténoïdes dans les cultures photomixotrophes, lors de l'élévation transitoire du pH du milieu de culture (de 5,0 à 6,0), par addition des solutions tamponnées, est un fait très intéressant.

De telles observations ont déjà été faites, par HATTORI et OHTA, en 1985, sur des suspensions cellulaires de *Vigna angularis*, synthétisant des isoflavones.

* Une augmentation de l'activité PAL est également observée lors de l'ajout de solutions tamponnées de différents pH.

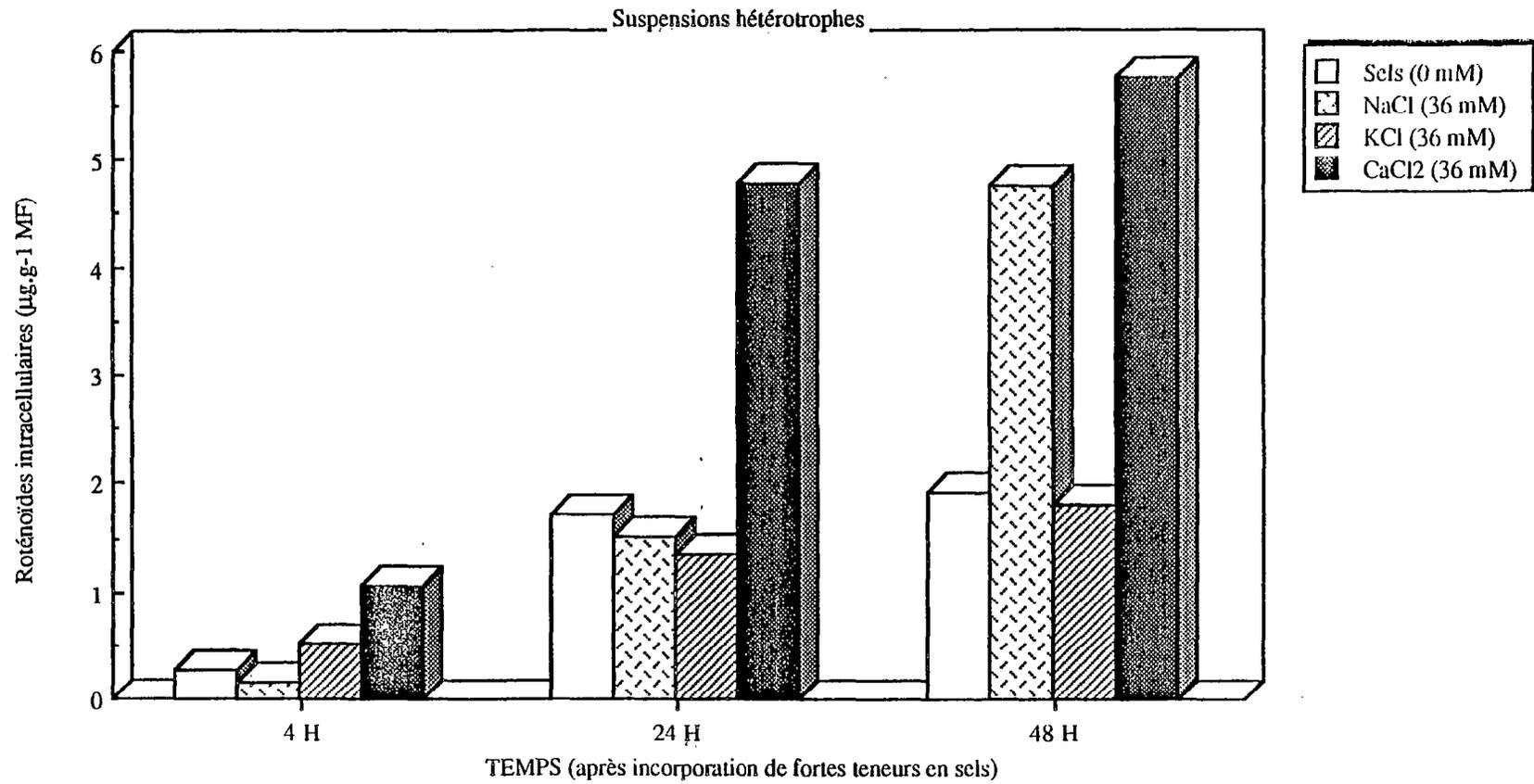
Cette activation de la PAL n'est pas encore détectable 4 heures après le traitement, contrairement aux réponses obtenues précédemment lors d'élicitation par un extrait de pathogène. L'activité spécifique de la PAL ne commence à augmenter qu'après un temps de latence, et atteint son maximum 48 heures après, c'est-à-dire lorsque le pH du milieu est rétabli.

La réponse des cellules lors de l'élévation du pH du milieu de culture est donc différée dans le temps dans nos conditions de culture.

Ceci est en désaccord avec les observations faites par HATTORI et OHTA, (1985) sur des suspensions cellulaires de *Vigna angularis*, dont l'activité PAL est maximale 4 heures après l'addition de solutions tampons de pH différents.

* Pour les pH 5,0 et 5,5, l'augmentation de l'activité spécifique de la PAL est corrélée à une stimulation de la production de roténoïdes intracellulaires. Dans ce cas, il y a donc concomitance des effets contrairement aux autres stress où l'activation de la PAL

Figure 121 :



EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE ROTENOIDES APRES INCORPORATION DE FORTES CONCENTRATIONS EN SELS AU 6^{ème} JOUR DE CULTURE

précède l'augmentation de la production de roténoïdes. Cela n'est par contre plus valable à pH 6,0.

Des observations identiques ont déjà été mentionnées par HATTORI et OHTA (1985) sur des suspensions cellulaires de *Vigna angularis* synthétisant des isoflavones.

Cette augmentation de l'activité PAL, seulement par élévation du pH du milieu de culture n'a pas fait l'objet jusqu'à présent de nombreuses publications.

Il semblerait, toutefois, qu'une soudaine augmentation du pH du milieu de culture entraînerait une diminution de l'amplitude du gradient de protons au travers de la membrane plasmique et une perturbation du potentiel de membrane, ce qui impliquerait une diminution des transports actifs transplasmalemmes. L'ensemble de ces modifications pourrait avoir pour conséquence une activation des gènes codant pour la PAL (HATTORI et OHTA, 1985).

b) Adjonction de fortes concentrations en sels

— Souche β hétérotrophe

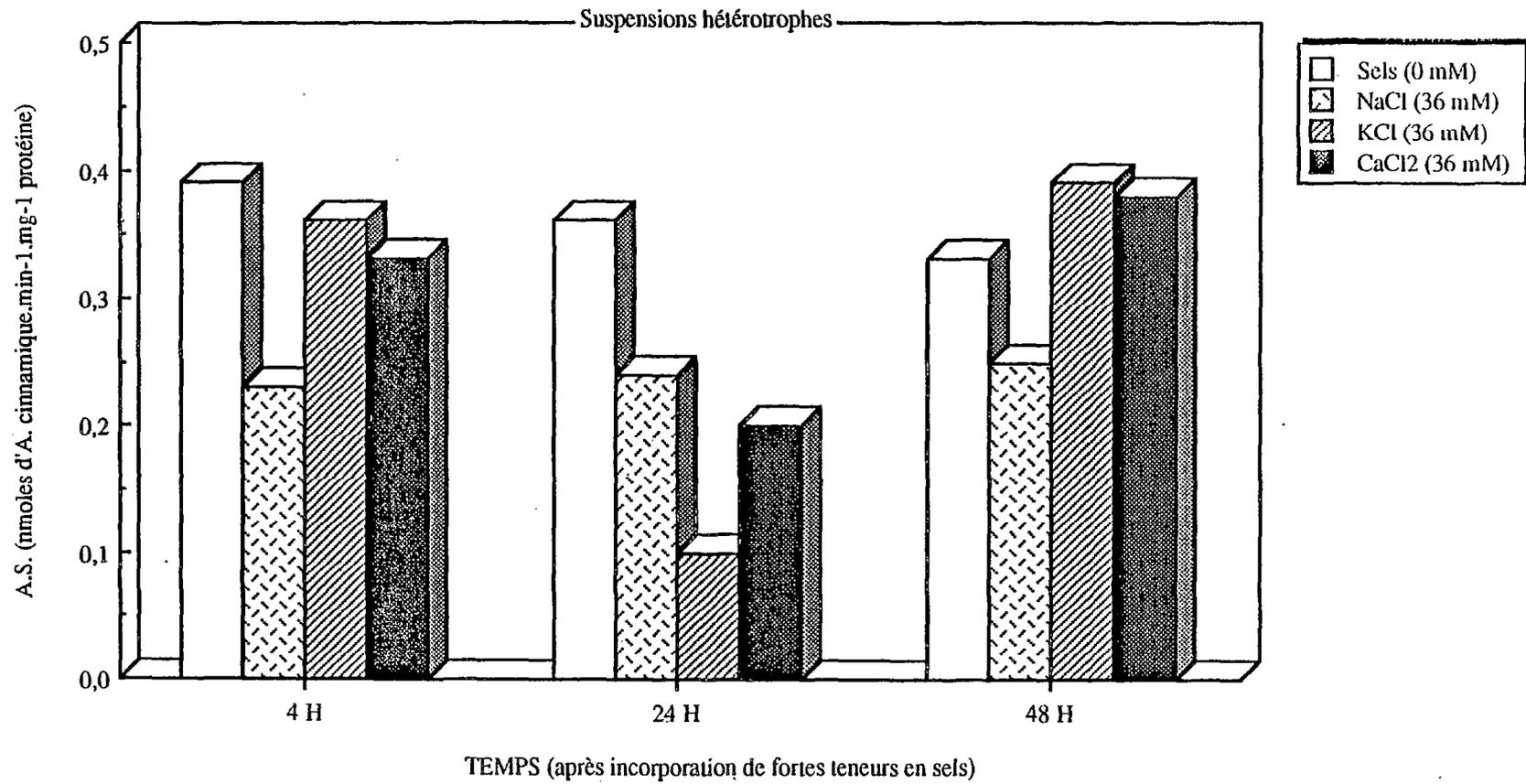
Remarque : Le matériel et le protocole utilisés pour ces expériences sont identiques à ceux décrits dans le chapitre IV sur l'optimisation de la production de roténoïdes. Différentes solutions salines sont utilisées NaCl, KCl, CaCl₂, (2,85 M), et sont ajoutées au milieu de culture à la concentration finale de 36 mM (concentration optimale pour la stimulation de la production, d'après le chapitre précédent). Les Erlenmeyers sont utilisés 4, 24 et 48 heures après l'incorporation des solutions salines.

** Evolution de la production de roténoïdes intracellulaires (figure 121)

Quatre heures après l'ajout de solutions salines dans le milieu de culture, on n'observe une stimulation de l'accumulation de roténoïdes qu'en présence de KCl (x 2) et de CaCl₂ (x 4). Cette stimulation de la production est encore détectable 24 heures et 48 heures après en présence de CaCl₂, avec des teneurs en roténoïdes 3 fois plus importantes que dans le témoin.

L'addition de NaCl entraîne une modification de la production de métabolites secondaires seulement 48 heures après le traitement. Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans le chapitre précédent, le facteur de multiplication de la production étant cependant plus faible (3 fois contre 7 précédemment).

Figure 122 :



EVOLUTION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PAL APRES INCORPORATION DE FORTES CONCENTRATIONS EN SELS AU 6ème JOUR DE CULTURE

**** Evolution de l'activité spécifique de la PAL (figure 122)**

On n'observe aucune modification de l'activité spécifique de la PAL lors de l'ajout de différentes solutions salines, et cela 4 heures, 24 heures et 48 heures après le traitement, sauf en présence de KCl après 24 heures.

Discussion

**** Evolution de l'activité PAL et de la production de roténoïdes intracellulaires**

Les stress salins testés se traduisent systématiquement par une augmentation de la synthèse des roténoïdes. Cette stimulation est beaucoup plus marquée en présence de CaCl_2 .

L'accumulation de métabolites, quelle que soit la solution saline utilisée, n'est pas corrélée à une amplification de l'activité PAL, contrairement aux résultats obtenus lors des autres stress. Il semblerait d'après la littérature qu'il n'y ait pas toujours corrélation entre induction de la PAL et production de métabolites secondaires issus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. SUGANO *et al.*, en 1975, ont montré sur des suspensions cellulaires de carotte, l'existence d'une importante activité PAL non corrélée à une accumulation de composés phénoliques. Ces résultats suggèrent donc que la biosynthèse de composés phénylpropanoïdiques ne dépend pas uniquement de l'activité PAL.

Très peu d'études ont été réalisées à ce jour sur l'effet de fortes concentrations en sels sur des suspensions cellulaires, en relation avec la production de métabolites secondaires.

AYABE *et al.*, en 1986, ont étudié l'effet de l'adjonction de CaCl_2 (au 7^{ème} jour de culture) sur des cellules immobilisées de *Glycyrrhiza echinata*, synthétisant de l'échinatine, transférées en milieu liquide. L'apport de CaCl_2 n'exalte pas la production de métabolites, et inhibe par contre la prolifération cellulaire.

c) Traitement à l'éthrel

Remarque: Le matériel et le protocole utilisés pour ces expériences sont identiques à ceux décrits dans le chapitre IV sur l'optimisation de la production de roténoïdes. Les Erlenmeyers sont utilisés 48 heures (suspensions hétérotrophes) et 72 heures (suspensions photomixotrophes) après l'incorporation d'éthrel.

— *Souche hétérotrophe*

** *Evolution de la production de roténoïdes*

On n'observe aucun effet favorable de l'apport d'éthylène sur la production de roténoïdes.

** *Evolution de l'activité spécifique de la PAL*

La présence d'éthylène exogène n'induit pas dans nos conditions de culture de modification notable de l'activité spécifique de la PAL.

— *Souche photomixotrophe*

Dans les suspensions cellulaires photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*, aucune variation n'est observée lors de l'apport d'éthylène aussi bien sur la production de roténoïdes que sur l'activité spécifique de la PAL.

— *Discussion*

** *Evolutions de la production de roténoïdes en relation avec l'activité spécifique de la PAL*

Durant ces expériences effectuées une seule fois sur les suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes, on ne note pas de modification de l'accumulation de roténoïdes et de l'activité de la PAL lors de l'adjonction d'éthylène.

Le rôle de l'éthylène dans l'induction et la répression de certaines enzymes chez les végétaux, et notamment de la PAL, a fait l'objet de nombreux travaux (CHALUTZ E., 1973; HYODO et YANG, 1971; IMAZEKI *et al.*, 1968; RHODES et WOOLTORTON, 1971; RIOV *et al.*, 1969; HYODO *et al.*, 1978). Il est apparu que l'effet est très variable, voire opposé suivant la dose d'éthylène appliquée. De nombreux tissus de différentes plantes, ne présentent pas de modification au niveau de l'activité PAL, en présence d'éthylène. Et même dans certains tissus, l'éthylène n'augmente pas l'activité de la PAL (ENGELSMA et VAN BRUGGEN, 1971; HYODO et YANG, 1974).

L'éthylène peut avoir également un effet stimulateur sur la production de métabolites secondaires.

Le plus bel exemple est celui de la stimulation de la production de caoutchouc d'*Hevea brasiliensis* par l'éthrel (PAARDEKOOPEL et SAINT-SAMORSON, 1969; COUPE, 1977; CHRESTIN, 1984).

Dans les cultures cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*

l'apport d'éthrel n'a engendré aucune modification tant au point de vue de l'activité PAL que de l'accumulation de roténoïdes ou de l'aspect extérieur des suspensions. Il est possible que dans nos conditions de manipulation l'éthylène dégagé n'est pas diffusé vers l'Erlenmeyer contenant la culture.

Des modifications devront être apportées à ce protocole, pour vérifier si l'éthylène à dose non létale peut constituer un agent potentiel de stimulation de la production de roténoïdes dans des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*.

5) Conclusion

Durant cette dernière partie, nous avons pu démontrer, d'une part, qu'une augmentation de l'activité spécifique de la PAL était accompagnée d'une accumulation de roténoïdes au cours du cycle de la culture de souche hétérotrophe et photomixotrophe de *Tephrosia vogelii* (lors du repiquage et durant la phase exponentielle), d'autre part, que l'activité spécifique de la PAL est sensiblement plus faible à l'obscurité qu'à la lumière.

Dans l'état d'avancement de nos recherches, il ne nous est pas possible de conclure s'il s'agit véritablement d'une induction de la PAL ou simplement d'une amplification de son activité. Des techniques telles que l'immuno-enzymologie devrait nous permettre de répondre à ces questions.

Les essais de stimulation de la production mis en place, sur les suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes, nous ont permis également de mettre en évidence qu'une augmentation de l'activité PAL était concomitante ou précédait l'accumulation de roténoïdes, lors d'incorporation de phénylalanine ou encore sous l'effet d'éliciteur pathogène 123B et de fortes concentrations en sels.

L'augmentation de l'activité PAL corrélée à une accumulation de roténoïdes, après l'élévation du pH du milieu, est un fait intéressant. En effet, très souvent les éliciteurs abiotiques utilisés sont toxiques pour les cellules. L'élévation transitoire du pH du milieu de culture de 5,0 à 6,0 n'est pas toxique pour les suspensions, le pH du milieu de culture étant ajusté à 5,5 à l'ensemencement.

La phase de latence précédant l'induction de la PAL varie significativement en fonction du facteur stressant. L'activité maximale de la PAL peut être atteinte 4 heures, 24 heures et parfois même 48 heures après le traitement.

Cette "induction" de l'activité PAL est souvent corrélée, d'après la littérature, à une augmentation du pool d'ARNm codant pour cette enzyme, donc à une dérépression du

génomique.

Il est important de noter tout de même qu'une forte activité spécifique de la PAL ne correspond pas obligatoirement à une accumulation proportionnelle de roténoïdes. Cela est très bien illustré par les résultats obtenus lors d'un stress pH effectué sur des cultures mixotrophes. Ainsi, l'élévation du pH du milieu de culture à une valeur proche de 5,5, se traduit 48 heures après, par un pic d'activité de la PAL de forte amplitude, corrélé à une faible accumulation de roténoïdes. Il semblerait donc que la PAL ne soit pas le principal facteur limitant l'expression du métabolisme des roténoïdes.

De plus, pour étayer notre hypothèse, il est important de remarquer que l'addition de phénylalanine à des suspensions mixotrophes n'induit qu'une augmentation de l'activité PAL de très faible amplitude, et par contre une accumulation importante de roténoïdes. La phénylalanine paraît jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la biosynthèse de roténoïdes, représentant apparemment le facteur limitant l'accumulation des phénylpropanoïdes. Cette hypothèse avait déjà été émise par MARGNA en 1977, allant à l'encontre des idées de ENGELSMA (1967) ; AMRHEIN et ZENK (1971) ; HAHLBROCK *et al.* (1971) etc., considérant que l'accumulation de flavonoïdes ou d'autres polyphénols dérivés de la phénylalanine était contrôlée au niveau enzymatique.

Il a ainsi démontré que, dans bien des cas, la capacité potentielle de désamination de la PAL était bien supérieure à ce que laissait présager l'accumulation de composés phénoliques. En d'autres termes, dans la plupart des cas, la PAL ne constituerait pas le facteur limitant la production.

Les mécanismes mis en place lors d'une élicitation sont encore très mal connus. Il semblerait d'après les données bibliographiques disponibles (HATTORI et OHTA, 1985 ; KATOU *et al.*, 1982 ; YOUNG *et al.*, 1982 etc) que la reconnaissance initiale des molécules élicitrices, probablement lors de leur fixation sur un récepteur spécifique, entraîne une inhibition de l'ATPase. Il s'en suivrait une modification du potentiel membranaire ou une interruption des transports actifs des substrats métaboliques. Le résultat final de l'enchaînement de ces événements aboutirait ainsi à l'activation de gènes impliqués dans la biosynthèse d'enzyme telle que la PAL et l'accumulation subséquente de composés du type des phytoalexines.

D'autres travaux devront être effectués afin de vérifier ces hypothèses sur notre matériel, notamment des mesures de potentiel membranaire et de transport de solutés après différents traitements.

CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le cadre du programme ORSTOM de valorisation biotechnologique des plantes médicinales tropicales, une étude comparative des marqueurs du métabolisme primaire et de l'évolution du métabolisme secondaire a été effectuée sur des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii*, synthétisant des roténoïdes (insecticides biodégradables).

Des essais de stimulation de la production ont été envisagés (addition de précurseurs, élicitation).

Dans le but de cerner quelques facteurs limitants de la voie de biosynthèse des roténoïdes et de mettre en évidence l'effet des agents stimulateurs sur celle-ci, notre travail s'est orienté ensuite vers l'étude d'une enzyme clé de la production de roténoïdes : la phénylalanine ammonia-lyase.

1) Obtention des cultures statiques

Croissance et production sur milieu gélosé

Un soucier de cals hétérotrophes et photomixotrophes a été créé à partir de fragments d'hypocotyles et de feuilles, sur un milieu de culture favorisant la chlorophyllogénèse et déjà expérimenté par HARDY pour l'obtention de cultures autotrophes d'*Euphorbia characias* (HARDY *et al.*, 1987) et CLARIS-HARDY pour l'obtention de cultures photomixotrophes d'*Abrus precatorius* (CLARIS-HARDY, 1988).

Les lignées photomixotrophes ont fait l'objet d'une rigoureuse sélection visuelle à chaque repiquage, permettant de conserver et d'améliorer les caractères de friabilité et de forte teneur en chlorophylles (maximum : 2,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS).

Dans un souci d'homogénéité quant à la provenance des souches, les lignées hétérotrophes ont été obtenues après réversion des cals chlorophylliens à l'obscurité.

Au cours des repiquages, nous avons sélectionné une souche appelée "B" cultivée à la fois dans des conditions d'hétérotrophie et de photomixotrophie, synthétisant des roténoïdes avec un pourcentage en roténone optimal mesuré en condition de mixotrophie de l'ordre de 80 % (la teneur relative en roténone des feuilles est de 7 à 12 % des roténoïdes totaux).

Une étude détaillée des paramètres de croissance et d'accumulation des métabolites

secondaires, à la fois dans des cals hétérotrophes et chlorophylliens nous a permis de préciser les caractéristiques suivantes :

— Les conditions de culture : lumière ou obscurité ne modifient pas significativement la croissance des cals. Les courbes de croissance obtenues montrent, après une phase exponentielle, l'apparition d'une phase ralentie attribuable à une déficience nutritionnelle qui permet de définir la périodicité des repiquages pour chaque souche.

— L'accumulation de roténoïdes dans les deux souches est corrélée positivement à la croissance, le maximum de production étant obtenu en fin de phase exponentielle.

— La production de roténoïdes est largement améliorée à la lumière : **750 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS** (dont 75 % de roténone) contre **87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS** à l'obscurité où la roténone est minoritaire (15 % des roténoïdes totaux).

2) Caractérisation des suspensions hétérotrophes et photomixotrophes

Les suspensions cellulaires ont été initiées à partir des cals hétérotrophes et chlorophylliens caractérisés auparavant.

Quatre cultures cellulaires différentes suivant leur comportement photosynthétique et le système de culture employé, hétérotrophe et photomixotrophe, cultivées en bioréacteur de 2 litres (Biolafitte) ou en fioles d'Erlenmeyer, ont été étudiées.

Sur ces cultures, nous avons suivi différents marqueurs de l'activité du métabolisme primaire en relation avec le métabolisme secondaire.

Ainsi, nous avons pu comparer d'une part, les cinétiques de production de biomasse, l'évolution de la teneur en chlorophylles et de l'activité respiratoire et photosynthétique, d'autre part l'évolution de certains paramètres nutritionnels du matériel *in vitro* (glucides, nitrate, ammonium, phosphate, sulfate), en relation avec l'accumulation et "l'excrétion" de roténoïdes.

Les résultats portant sur la **caractérisation de suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes cultivées en fioles d'Erlenmeyer** montrent:

— Des cinétiques de croissance similaires pour les deux souches mais une croissance plus importante dans la souche hétérotrophe (le facteur de multiplication de la biomasse, la productivité en biomasse ainsi que le rendement de conversion du saccharose sont augmentés). On peut attribuer ces modifications à une plus grande disponibilité en glucides au départ (58,6 mM contre 44 mM de saccharose).

— Une hydrolyse totale du saccharose du milieu, avec consommation préférentielle du glucose, chez les deux souches. Les glucides disparaissent complètement du milieu de culture en pleine croissance, ce qui ne permet pas d'expliquer son arrêt, vu les réserves relativement importantes en glucides intracellulaires existant en fin de culture dans les deux souches.

— Une consommation préférentielle des ions ammoniums qui disparaissent du milieu en fin de croissance, par rapport aux nitrates dont les concentrations dans le milieu, en fin de culture, sont encore supérieures à 12 mM. Cependant les teneurs en ammonium intracellulaire mesurées (5 mM) lors de l'arrêt de la croissance ne semblent pas indiquer que cet ion soit réellement limitant.

— Les cinétiques d'apparition des roténoïdes intracellulaires sont similaires chez les deux souches (maximum de production en fin de phase exponentielle) ; cependant la souche photomixotrophe synthétise deux fois plus de roténoïdes, essentiellement (65%) sous forme de roténone, alors que la souche hétérotrophe synthétise surtout de la dégueline.

— Une libération de roténoïdes dans le milieu chez les deux souches, qualitativement, ce sont les mêmes que ceux accumulés par les cellules de chaque souche. Cependant, contrairement aux concentrations intracellulaires, on retrouve deux fois plus de roténoïdes dans le milieu des suspensions hétérotrophes que photomixotrophes.

L'étude comparative du comportement des suspensions hétérotrophes et photomixotrophes cultivées en fioles d'Erlenmeyer ou en bioréacteur nous ont permis de mettre en évidence les caractéristiques suivantes :

— Le passage en bioréacteur aéré et agité est bénéfique seulement pour la souche photomixotrophe, dont la croissance, la vitesse de consommation des éléments nutritifs du milieu et le métabolisme général sont significativement activés. Le comportement de la souche hétérotrophe vis-à-vis de ces mêmes paramètres, reste pratiquement inchangé lors du passage de la culture en Erlenmeyer (atmosphère confinée) à la culture en bioréacteur aéré.

— Seule la disparition totale de l'ammonium du milieu, corrélée à des réserves intracellulaires en cet ion relativement faibles, semble liée à l'arrêt de la croissance chez les deux souches, et pourrait ainsi constituer le principal facteur limitant la croissance.

— Chez les deux souches cultivées en Erlenmeyer comme en bioréacteur, la synthèse et l'accumulation de roténoïdes sont corrélées positivement à la croissance (le maximum est atteint au cours ou en fin de phase exponentielle).

— La biosynthèse de roténoïdes (roténone majoritaire) est toujours beaucoup plus importante chez les suspensions photomixotrophes, quel que soit le type de culture considéré. Par ailleurs, cette biosynthèse est activée à la lumière chez les suspensions hétérotrophes cultivées en bioréacteur.

— Le passage de la culture en Erlenmeyer (atmosphère confinée) à la culture en bioréacteur aéré se traduit par une amélioration de la production et de l'accumulation de roténoïdes intracellulaires mais, par contre, par une forte diminution voire la disparition de l'excrétion des roténoïdes dans le milieu de culture.

3) Essais d'optimisation de la production

Afin d'optimiser la production de roténoïdes par des suspensions cellulaires de *Tephrosia vogelii*, des essais de stimulation du métabolisme secondaire ont été effectués soit par addition de précurseur type phénylalanine (bioconversion), soit sous l'effet de stress (éliciteur pathogène 123B, pH, salins, éthrel).

Ces expériences nous ont permis de montrer qu'il est possible d'augmenter de façon importante la synthèse et l'accumulation de roténoïdes (facteur maximum de multiplication de la production : 10).

On observe des différences de réponses, en fonction du traitement testé, mais également en fonction de la souche considérée.

— Ainsi, les traitements ayant donné les résultats les plus intéressants sont les essais de stimulation en présence d'éliciteurs fongiques ou de fortes concentrations en sels, ainsi que lors de l'addition de précurseur tel que la phénylalanine.

— Pour un traitement donné, les suspensions hétérotrophes de *Tephrosia vogelii* répondent souvent de manière beaucoup plus intense que les suspensions mixotrophes. Cependant l'accumulation de roténoïdes est toujours inférieure aux teneurs rencontrées dans des conditions de mixotrophie.

Il semblerait donc que les agents testés, stimulant la production, tendraient mais ne permettraient pas de restaurer, dans les suspensions hétérotrophes, les potentialités biosynthétiques de la PAL exprimées à la lumière.

De plus, l'addition du précurseur phénylalanine dans des suspensions hétérotrophes et photomixotrophes se traduit toujours par une synthèse plus faible de roténoïdes dans les souches cultivées à l'obscurité.

Par contre, l'apport de ce précurseur biosynthétique dans des suspensions mixotrophes entraîne une très forte accumulation de roténoïdes, bien supérieure à celle

obtenue lors des autres traitements. Les suspensions photomixotrophes se montrent donc plus aptes à assurer une bioconversion de la phénylalanine via les roténoïdes.

Au terme de cette étude, il est intéressant de pouvoir comparer les différentes teneurs en roténoïdes totaux obtenues à la fois dans les plantés entières, les cals et les suspensions hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* et après stimulation de la production par différents stress (tableau IX). Cela nous permet de montrer que quels que soient la souche considérée et le type de culture utilisé (Erlenmeyer, bioréacteur) la production de roténoïdes *in vitro* est inférieure à celle obtenue dans la plante entière. Les essais de stimulation de la production permettent d'améliorer cette biosynthèse *in vitro*, sans cependant restaurer les potentialités de production de roténoïdes de la plante entière. Cette faible potentialité biosynthétique *in vitro* a déjà été observée par de nombreux auteurs (BOHM, 1980 ; DEUS et ZENK, 1982 ; IBRAHIM, 1983 ; WINK, 1987). En fait, il a été démontré par ZENK *et al.* (1977) que la biosynthèse de métabolites secondaires se produit avec une très grande variabilité selon les souches considérées, la plupart de celles-ci produisant d'ailleurs fort peu ou pas de métabolites secondaires. Mais, et c'est là l'intérêt fondamental de ces résultats sur la variabilité, il s'avère possible par clonage (clonage vrai ou sur petits agrégats) de sélectionner des souches produisant autant et même plus que la plante entière (STECK et PETIARD, 1985 ; cf. tableau I).

Afin de préciser en partie, les facteurs régulant la voie de biosynthèse des roténoïdes, une étude de l'évolution de l'activité spécifique de la phénylalanine ammonia-lyase (enzyme clé de la voie de biosynthèse des roténoïdes) a été effectuée.

4) L'activité spécifique de la PAL et la production de roténoïdes

La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) de *Tephrosia vogelii* a été partiellement caractérisée sur du matériel cultivé *in vitro*, dans le but de déterminer les conditions optimales de son extraction et de son dosage à utiliser dans les expérimentations ultérieures.

a) Evolution de l'activité spécifique de la PAL au cours du cycle de culture

Des dosages de l'activité spécifique de la PAL durant le cycle de croissance de suspensions hétérotrophes et photomixotrophes, nous ont permis de préciser les faits suivants :

__ Durant le cycle de culture, on observe deux pics d'activité de la PAL : un

TABLEAU : IX

**COMPARAISON DES TENEURS EN ROTENOIDES DANS LES FEUILLES, CALS ET CULTURES CELLULAIRES
DE TEPHROSIA VOGELII ET APRES STIMULATION**

	Feuilles	Cals		Suspensions en Erlenmeyer		Suspensions en réacteur		Après stimulation		
	—————	Hétérotrophe	Mixotrophe	Hétérotrophe	Mixotrophe	Hétérotrophe	Mixotrophe	Hétérotrophe	Mixotrophe	
ROTENONE	0,32	0,0017	0,057		0,012	0,0007	0,008	0,016	0,26	
ROTENOIDES TOTAUX	3,9	0,0087	0,075	0,016	0,019	0,015	0,03	0,029	0,2	0,392

Les valeurs sont exprimées en % MS

premier pic transitoire lors de l'ensemencement et un deuxième plus intense au cours de la phase exponentielle de croissance. Cette augmentation de l'activité PAL précède légèrement ou accompagne l'accumulation de roténoïdes, quelle que soit la souche considérée.

— L'amplitude de ces deux pics est légèrement supérieure en présence de lumière.

b) Evolution de l'activité spécifique de la PAL lors de la stimulation de la production

Nous avons pu démontrer que la stimulation de la production de roténoïdes, soit par l'apport de précurseurs comme la L-phénylalanine, ou sous l'effet d'éliciteurs fongiques, ou encore par des stress pH, est précédée par une augmentation rapide et transitoire de l'activité PAL dans les deux types de suspensions considérés. Par contre, l'accumulation de roténoïdes sous l'effet de stress salins n'est pas corrélée à une quelconque stimulation de l'activité PAL.

Il ne paraît pas y avoir de différences importantes entre l'amplitude des pics d'activité de la PAL, obtenues dans ces conditions, et celle observée lors du cycle de croissance des suspensions cellulaires en condition d'hétérotrophie et de photomixotrophie.

La phase de latence précédant l'induction de la PAL varie en fonction du traitement effectué. Le maximum d'activité peut être atteint 4 heures, 24 heures et parfois même 48 heures après le traitement.

Trois mécanismes de régulation fondamentalement différents ont été proposés pour expliquer cette augmentation rapide de l'activité enzymatique en réponse à des traitements divers (LOSCHKE *et al.*, 1981). Les deux premiers mécanismes proposent une régulation de type post-traductionnelle par activation d'une forme enzymatique inactive (ATTRIDGE et SMITH, 1974 ; ENGELSMA, 1974), ou par déshinhibition d'un pool d'enzyme préexistant (ZUCKER, 1971). Dans le troisième cas, c'est un mécanisme de régulation de type traductionnel qui est présenté par dérégulation et répression du génome (DUCHESNE *et al.*, 1977 ; HAHNBROCK *et al.*, 1981 ; SCHRODER, 1977 ; SCHRODER *et al.*, 1979, TANAKA et URITANI, 1976 ; LAMB et MERRIT, 1979). Selon la littérature, il apparaît plus probable que l'augmentation transitoire de l'activité spécifique de la PAL en réponse à une élicitation dans des cultures cellulaires *in vitro* soit sous contrôle du troisième type de mécanisme : régulation de l'expression du génome (LAWTON *et al.*, 1980 ; EBEL *et al.*, 1984 ; KUHN *et al.*, 1984 ; EDWARDS *et al.*, 1985 ; CHAPPEL et HAHNBROCK, 1984).

Ne disposant pas sur place de matériel et des techniques adaptées, nous n'avons pas

pu, dans le cadre de notre étude, déterminer si l'augmentation transitoire de la PAL dans les suspensions cellulaires de *Tephrosia vogelii* est le résultat d'une néosynthèse protéique ou d'une activation post-traductionnelle de l'enzyme considérée. En effet, les mesures d'activités enzymatiques classiques se révèlent insuffisantes pour répondre à ce type de question. Par contre, les réactifs immunologiques permettent actuellement de mettre en évidence une enzyme quel que soit son niveau d'activité. Pour cela une purification poussée de l'enzyme considérée, ici, la phénylalanine ammonia-lyase doit être réalisée en vue de la préparation d'anticorps polyclonaux monospécifiques qui nous permettraient d'effectuer une étude immuno-enzymologique fine.

De tels travaux sont tout à fait envisageables, et ont déjà été entrepris par RIVAL en collaboration avec le Laboratoire de Structure et Métabolisme des Plantes de l'Université d'Orsay, sur d'autres enzymes telles que la Nitrate réductase ou la RubP Carboxylase des suspensions cellulaires d'*Abrus precatorius*, cultivées au Laboratoire (RIVAL, 1989).

Les mécanismes mis en place lors d'une élicitation sont encore très mal connus. Il semblerait, d'après les données bibliographiques disponibles (HATTORI et OHTA, 1985 ; KATOU *et al.*, 1982 ; YOUNG *et al.*, 1982 etc) que la reconnaissance initiale des molécules élicitrices, probablement lors de leur fixation sur un récepteur spécifique, entraîne une inhibition de l'ATPase, une modification du potentiel membranaire ou une interruption des transports actifs des substrats métaboliques. La réponse des cellules à l'enchaînement de ces événements comprend : l'activation des gènes, puis de la transcription, la biosynthèse d'enzymes telles que la PAL et l'accumulation subséquente de composés du type des phytoalexines.

L'activation de ce mécanisme de défense spécifique requiert un deuxième signal ou "second messenger" au niveau cellulaire, qui fait l'objet actuellement de nombreuses investigations. Sa présence, jusqu'à présent, n'a pas été prouvée. Toutefois, de nombreuses recherches démontrent le rôle prépondérant des ions Ca^{++} comme transducteurs du signal entre la reconnaissance du site spécifique de l'éliciteur et la réponse finale : l'accumulation de phytoalexines. Ainsi, en l'absence de calcium ou encore lors d'incorporation dans le milieu de culture d'agents chélateurs tels que l'EGTA ou l'EDTA, aucune accumulation de phytoalexines n'est retrouvée après élicitation dans des cultures cellulaires de *Escholtzia californica* (SCUMACHER *et al.*, 1987) et de *Glycine max* (EBEL *et al.*, 1984). De même, dans des cultures élicitées de soja, la synthèse de callose est Ca^{++} dépendante (KOHLE *et al.*, 1985). Ce rôle du Ca^{++} en tant que second messenger a déjà été appréhendé chez les végétaux dans un certain nombre de régulations enzymatiques

(MARME, 1985). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour déterminer si les ions calcium jouent seuls le rôle de "second messenger" ou encore s'ils participent avec d'autres signaux aux réactions de défense de la plante contre les attaques des agents pathogènes.

Pour une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeux dans des cultures cellulaires de *Tephrosia vogelii* sous l'effet de différents stress, une étude plus approfondie, notamment des modifications du potentiel membranaire, est à envisager. De tels travaux ont été initiés au Laboratoire par C. NEF, sur des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* soumises à certains stress, en collaboration avec le Laboratoire d'électrophysiologie du Pr RONA à l'Université de Paris VII. Les premiers résultats obtenus sur ce matériel végétal ont été encourageants (C. NEF, Communication personnelle) et semblent aller dans le sens des observations faites par PELISSIER *et al.* (1986) sur l'effet d'éliciteurs sur le potentiel de surface des cellules.

De même, les modifications au niveau de l'activité ATPase après élicitation, (rapportées par différents auteurs : HATTORI et OHTA, 1985 ; LERNER et REUVENI, 1982 ; YOUNG *et al.*, 1982) nous semblent un point important à développer et à approfondir. Des résultats intéressants dans ce domaine ont été obtenus chez *Hevea brasiliensis* (d'AUZAC *et al.*, 1989). Dans le cadre de recherches sur la stimulation de la production du cis-polyisoprène, CHRESTIN *et al.* (1986) ont pu mettre en évidence l'existence d'une augmentation de l'activité ATPase tonoplastique 13 à 21 heures après le traitement à l'éthrel, corrélée à une activation de la protéosynthèse au niveau du tonoplaste lutoïdique (GIDROL, 1984). Il en résulte une augmentation de la production de caoutchouc (CHRESTIN *et al.*, 1986). Il semble donc que l'activité ATPase ait un rôle important à jouer au niveau des mécanismes de régulation de la biosynthèse de métabolites secondaires en réponse à un stress.

Concernant le métabolisme phénylpropanoïdique, de nombreuses études semblent indiquer que la PAL est le facteur limitant principal (ENGELSMA, 1967 ; AMRHEIN et ZENK, 1971 ; HAHLBROCK *et al.*, 1971 ; HAHLBROCK et GRISEBACH, 1979 ; DIXON *et al.*, 1986).

Les résultats obtenus au cours de nos manipulations ne nous permettent pas d'adopter pleinement cette hypothèse. En effet, dans les suspensions cellulaires de *Tephrosia vogelii*, une forte activité spécifique de la PAL ne correspond pas obligatoirement à une accumulation optimale de roténoïdes (cf. stress pH, chapitre V, et premier pic lors de l'ensemencement). De plus, lors de l'incorporation de phénylalanine dans des suspensions mixotrophes, on observe une augmentation de l'activité PAL de faible amplitude, alors que l'accumulation de roténoïdes est la plus forte mesurée. La phénylalanine ammonia-lyase ne

paraît donc pas constituer le principal facteur limitant la synthèse et l'accumulation de roténoïdes dans les cultures cellulaires de *Tephrosia vogelli*.

La phénylalanine, par contre, semble jouer un rôle important dans la régulation de la biosynthèse de ces composés. En effet son incorporation dans des suspensions cellulaires photomixotrophes induit une production maximale de roténoïdes. Il semblerait dans ce cas que ce précurseur biosynthétique, représente un des facteurs potentiels de limitation de l'accumulation des roténoïdes.

Ces observations vont dans le sens de celles réalisées par MARGNA, (1977) qui a montré que la capacité potentielle de désamination de la PAL était bien supérieure au taux requis pour l'accumulation de composés phénoliques dans de nombreux tissus. De même, l'accumulation de phénylpropanoïdes en présence de phénylalanine exogène ou encore l'existence d'un rapport équilibré entre le métabolisme protéique et la formation de flavonoïdes et de dérivés de l'acide cinnamique dans les plantes sont, pour lui, autant de preuves du rôle prépondérant de la phénylalanine dans ce mode de régulation.

La lumière joue également un rôle majeur sur la régulation de l'accumulation de roténoïdes dans les suspensions cellulaires de *Tephrosia vogelli*. En effet, on observe toujours, même après stimulation de la production, des teneurs plus faibles en métabolites secondaires dans la souche cultivée en condition d'hétérotrophie. L'induction de l'activité PAL par la lumière, en relation avec une production maximale de métabolites *in vitro*, a déjà été rapportée sur d'autres cultures cellulaires (IBRAHIM et EDGAR, 1976 ; KOUMBA et MACHEIX, 1982 ; BRUNET et IBRAHIM en 1973 ; OZEKI et KOMAMINE, 1985).

Il faut cependant rester très prudent quant à l'interprétation des résultats obtenus durant cette étude. En effet les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont très complexes et de nombreux facteurs interagissent entre eux. Des données supplémentaires, notamment au niveau d'autres étapes enzymatiques de cette voie biosynthétique, devraient nous permettre de mieux appréhender son mode de régulation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKE ASSI L., (1983). Santé et valorisation des plantes médicinales en Côte d'Ivoire. Bothalia, 14, 603-605.
- ALBERSHEIM P. et VALENT B.S., (1978). Host-pathogen interactions in plants. Plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. J. Cell. Biol., 78, 627-643.
- ALIBERT G., RANJEVA R., et BOUDET A., (1977). Organisation subcellulaire des voies de biosynthèse des composés phénoliques. Physiol. Vég., 15, 279-301.
- ALIBERT G., RANJEVA R., et BOUDET A., (1972). Recherches sur les enzymes catalysant la formation des acides phénoliques chez *Quercus pedunculata* (Ehrh.). II. Localisation intracellulaire de la phénylalanine ammoniacque-lyase, de la cinnamate 4-hydroxylase et de la "benzoate synthase". Biochim. Biophys. Acta, 279, 282-289.
- AMBID C., ROUSTAN J. P., NEF C. et FALLOT J., (1982). Influence of 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid on the production of ajmalicine and serpentine by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In : Proc. 5th Intl. Plant Tissue & Cell Culture. 331-332.
- AMINO S. et TAZAWA M., (1988). Uptake and utilization of sugars in cultured rice cells. Plant Cell Physiol., 29, 483-487.
- AMRHEIN N. et ZENK M. H., (1971). Untersuchungen zur Rolle der phenylalanin-ammonium-lyase (PAL) bei der flavonoidsynthese im Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* Moench.). Z. Pflanzenphysiol., 64, 145-168.
- ANDERSON L. A., KEENE A. T. et PHILIPPSON J. D., (1982). Alkaloid production by leaf organ, root organ and cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. Planta Med., 46, 25-27.
- ARENS H., BORBE H. O., ULBRICH B. et STOCKIGT J., (1982). Detection of pericine, a new CNS active indole alkaloid from *Picralima nitida* cell suspension culture by opiate receptor binding studies. Planta Med., 46, 210-214.
- ATTRIDGE T. H. et SMITH H., (1974). Density-labelling evidence for the blue-light-mediated activation of phenylalanine ammonia-lyase in *Cucumis sativus* seedlings. Biochem. Biophys. Acta, 342, 452-464.
- AUGE R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT, B., GALANDRIN J. CL., MINIER R., MORAND J. CL. ET VIDALIE H., (1986). La culture in vitro et ses applications horticoles. Baillière J. B. ed.. Technique et Documentation. Lavoisier. 152 p.
- d'AUZAC J. et RIBAILLIER D., (1969). L'éthylène nouvel agent stimulant la production de latex chez *Hevea brasiliensis*. C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. D. 268, 3046-3049.
- d'AUZAC J., JACOB J. L. et CRESTIN H. (1989). Physiologie of Rubber Tree Latex. d'Auzac J., Jacob J. L. et Chrestin H. Eds. C. R. C. Press, Inc, 470 p.

- AYABE S., IIDA K. et FURUYA T., (1986). Induction of stress metabolites in immobilized *Glycyrrhiza echinata* cultured cells. Plant Cell Rep., 3, 186-189.
- BALAGUE C. et WILSON G., (1982). Growth and alkaloid biosynthesis by cell suspensions of *Catharanthus roseus* in a chemostat under sucrose and phosphate limiting conditions. Physiol. Veg., 20, 515-522.
- BARZ W. et HUSEMANN W., (1982). Aspects of photoautotrophic cell suspension cultures. In : Plant Tissue Culture. Fujiwara A. ed. Japanese Association for plant tissue culture, Maruzen, Tokyo, 245-248.
- BECKER H. et SCHRALL R., (1977). Callus suspensionkulturen von *Sylbinum maritimum*. Planta Med., 31, 515-522.
- BERGMANN L. et BERGER C., (1966). Farblicht und plastiden differenzierung von Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* var. "Samsun". Planta, 69, 58-69.
- BERGMEYER H. U., BERNT E., SCHMIDT F. et STORK H., (1974). In : Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer H. U. ed., vol. 3, 1196-1201.
- BERLIN J. et WIDHOLM J. M., (1977). Correlation between phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic biosynthesis in *p*-fluorophenylalanine-sensitive and -resistant tobacco and carrot tissue cultures. Plant Physiol., 59, 550-553.
- BERNT E. et BERGMEYER H. U., (1974). Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer H. U. ed., vol. 3, 1304-1307.
- BETZ B., SCHAFFER E. et HAHNBROCK K., (1978). Light-induced phenylalanine ammonia-lyase in cell-suspension cultures of *petroselinum hortense*. Quantitative comparison of rates of synthesis and degradation. Arch. Biochem. Biophys., 190, 126-135.
- BEVAN M. W. et NORTHCOTE D. H., (1981). Subculture-induced protein synthesis in tissue culture of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Planta, 152, 24-31.
- BOTTON H., (1957). Les plantes de couverture. Guide pratique de reconnaissance et d'utilisation des Légumineuses en Côte d'Ivoire. Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée. Tome IV. 12, 553-617.
- BOHM H., (1980). The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures. In : Perspectives in Plant Cell and Tissue Cultures. Vasil I. K. ed. Academic Press, Inc., 183-208.
- BOUQUET A. et DEBRAY M., (1974). Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire. Travaux et Documents de l'ORSTOM, 32, 13.
- BROOKER J. D. et RUSSEL D. W., (1975). Properties of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzymes A reductase from *Pisum sativum* seedlings. Arch. Biochem. Biophys., 167, 729-733.

- BROOKS C. J. W., WATSON D. G. et FREER I. M., (1986). Elicitation of capsidiol accumulation in suspended callus cultures of *Capsidium annuum*. Phytochemistry, 25, 1089-1092.
- BRUNET G. et IBRAHIM R., (1973). Tissue culture of *Citrus* peel and its potential for flavonoid synthesis. Z. Pflanzenphysiol., 69, 152-162.
- BUTENANDT A., (1928). Über das Rotenon, den physiologisch wirksamen Bestandteil der *Derris elliptica*. Liebigs. Ann. Chem., 464, 253-256.
- CAHN R. S., PHIPERS R. F. et BRODATY E., (1945). The stability of *Derris* in insectidal dusts. The solvent-powder effect. J. Soc. Chem. Ind., London, 64, 33-35.
- CAMM E. L. et TOWERS G. H. N., (1973a). Phenylalanine ammonia-lyase. Phytochemistry, 12, 961-973.
- CAMM E. L. et TOWERS G. H. N., (1973b). Effects of ageing on enzymes of phenylpropanoid metabolism in *Solanum tuberosum* discs. Phytochemistry, 12, 1575-1580.
- CAMM E. L. et TOWERS G. H. N., (1977). Phenylalanine ammonia-lyase. Progr. Phytochem. 4, 169-188.
- CAREW D.P. et KRUEGER R. J., (1976). Anthocyanidins of *Catharanthus roseus* callus cultures. Phytochemistry, 15, 442.
- CASTAGNE E., (1938). Contribution à l'étude chimique des légumineuses insecticides du Congo belge. Institut royal colonial Belge. Mémoires-Collection in-8°. Tome VI, fascicule 3. 103 p.
- CHALEFF R. S., (1986). Selection for herbicide-resistant mutants. *In* : Handbook of plant cell culture. Vol. 4. Techniques and applications. Evans D. A., Sharp W. R. et Ammirato P. V., eds.. Macmillan publishing company. 133-149.
- CHALUTZ E., (1973). Ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in gherkin seedlings. Planta, 91, 1033-1036.
- CHANDLER M. T., TANDEAU DE MARSAL N. et DE KOUCHKOVSKY N., (1972). Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. Can. J. Bot., 50, 2265-2270.
- CHAPPELL J. et HAHLBROCK K., (1984). Transcription of plant defense genes in response to UV-light or fungal elicitor. Nature (London), 311, 76-78.
- CHRESTIN H., GIDROL X. et MARIN B., (1986). Transonoplast pH changes as a signal for activation of the cytosolic metabolism in *Hevea* latex cells in response to treatments with ethrel (an ethylene releaser). Implications for the production of a secondary metabolite : natural rubber. *In* : Plant vacuoles-Their importance in solute compartmentation in cells and their application in Plant Biotechnology. Marin B., ed. Plenum Press, New york, London, 467-476.

- CHRESTIN H., (1984). Le compartiment vacuo-lysosomal (les lutoïdes) du latex d'*Hevea brasiliensis*. Son rôle dans le maintien de l'homéostasie et dans le processus de sénescence des cellules laticifères. Thèse de Doctorat d'Etat, U.S.T.L., Montpellier, édité par l'ORSTOM dans Collection Etudes et Thèses, Paris, 1985, 575 p.
- COCKING E. C., (1985). Somatic hybridization : implications for agricultural. *In* : Biotechnology in Plant Science. Relevance to agriculture in the eighties. Zaitlin M., Day P. et Hollaender A., eds.. Academic Press, Inc.. 101-115.
- CONSTABEL F., SHYLUK J. P. et GAMBORG O. L., (1971). The effects of hormones on anthocyanin accumulation in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Planta, 96, 306-316.
- COPPING L. G. et STREET H. E., (1972). Properties of the invertase of cultured Sycamore cells and changes in their activity during culture growth. Physiol. Plant., 26, 346-354.
- COUPE M., (1977). Etudes physiologiques sur le renouvellement du latex d'*Hevea brasiliensis*. Action de l'éthylène. Importance des polyribosomes. Thèse de Doctorat d'Etat, Sciences Naturelles, Université de Montpellier II U.S.T.L., Montpellier, 213 p.
- CREASY L. L., (1968). The increase in PAL activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. Phytochemistry, 7, 441-446.
- CREASY L. L., (1987). The role of enzyme inactivation in the regulation of synthetic pathways : A case history. Physiol. Plant., 71, 389-392.
- CROMBIE L., DEWICK P. M. et WHITING D. A., (1971). Biosynthesis of the rotenoid Amorphigenin in germinating *Amorpha fruticosa* seeds : the post-isoflavone stages. Chem. Comm., 1182-1185.
- CROMBIE L., HOLDEN I., KILBEE G. W. et WHITING D. A., (1982). Biosynthesis of rotenoids by *Amorpha fruticosa* : sequence, specificity, and stereochemistry in the development of hemiterpenoid segment. J. C. S. Perkin I, 789-797.
- CZICHI U. et KINDL H., (1975). Formation of p-coumaric acid and α -coumaric acid from L-phenylalanine by microsomal membrane fractions from potato : evidence of membrane-bound enzymes. Planta, 125, 115-125.
- CZICHI U. et KINDL H., (1976). Phenylalanine metabolism on plant membrane complexes. Communication X^e Congrès International de Biochimie, Hambourg-Juillet 1976.
- CZICHI U. et KINDL H., (1977). Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid hydroxylases as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of Cucumber cotyledons : cooperation and subcellular. Planta, 134, 133-145.
- DALTON C. C., (1980). Photoautotrophy of spinach cells in continuous culture: photosynthetic development and sustained photoautotrophic growth. J. Exp. Botany, 31, 791-804.

- DALTON C. C. et PEEL E., (1983). Product formation and plant cell specialization : a case study of photosynthetic development in plant cell cultures. Progress in Industrial Microbiology, 17, 107-166.
- DALTON C. C. et STREET H. E., (1976). The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension cultures of spinach (*Spinacia oleracea* L.). In vitro, 12, 485-494.
- DALTON C. C. et STREET H. E., (1977). The influence of applied carbohydrates on the growth and greening of cultured spinach (*Spinacia oleracea* L.) cells. Pl. Sci. Lett., 10, 157-164.
- DARVILL A. G. et ALBERSHEIM P., (1984). Phytoalexins and their elicitors-a defence against microbial infections in plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 35, 243-275.
- DAVIS K. R., DARVILL A. G. et ALBERSHEIM P., (1986). Several biotic and abiotic elicitors act synergistically in the production of phytoalexin accumulation in soybean. Plant Mol. Biol., 6, 23-32.
- DE-EKNAMBUL W. et ELLIS B., (1984). Rosmarinic acid production and growth characteristics of *Anchusa officinalis* suspension cultures. Planta Med., 51, 346-350.
- DE-EKNAMBUL W. et ELLIS B., (1985 a). Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Rep., 4, 46-49.
- DE-EKNAMBUL W. et ELLIS B., (1985 b). Effects of auxins and cytokinins on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Rep., 4, 50-53.
- DELFEL N. E., (1973). Gas-liquid chromatographic determination of rotenone and deguelin in plant extracts and commercial insecticides. Journal of the A.O.A.C., 56, 1343-1349.
- DELFEL N. E., TALLENT W. H., CARLSON D. G. et WOLFF I. A., (1970). Distribution of rotenone and deguelin in *Tephrosia vogelii* and separation of rotenoid-rich fractions. J. Agr. Food. Chem., 18, 385-390.
- DEUS B. et ZENK M. H., (1982). Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. Biotechn. and Bioeng., 24, 1965-1974.
- DHILLON D. S. et BROWN S. A., (1976). Localization, purification and characterization of dimethylallylpyrophosphate : Umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. Arch. Biochem. Biophys., 177, 74-83.
- DICOSMO F., NORTON R. et TOWERS G. H. N., (1982). Fungal culture-filtrate elicits aromatic polyacetylenes in plant tissue culture. Naturwissenschaften, 69, 550-551.
- DICOSMO F. et TALLEVI S. G., (1985). Plant cell cultures and microbial insult : interactions with biotechnological potential. Trends in Biotechnology, 3, 110-111.

- DIXON R. A. et BENDALL D. S., (1978). Changes in phenolic compounds associated with phaseollin production in cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant. Pathol., 13, 293-294.
- DIXON R. A. et BOLWELL P., (1986). Modulation of the phenylpropanoid pathway in bean (*Phaseolus vulgaris*) cell suspension cultures. In : Secondary metabolism in plant cell cultures. Morris P., Scragg A. H., Stattford A. et Fowler M. W. eds. Cambridge University Press. 89-102.
- DIXON R. A., BROWNE T. et WARD M., (1980). Modulation of L-Phenylalanine ammonia-lyase by pathway intermediates in cell suspension cultures of dwarf french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Planta, 150, 279-285.
- DIXON R. A., DEY P. M. et WHITE HEAD I. M., (1982). Purification and properties of chalcone isomerase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. Biochem. Biophys. Acta, 715, 25-33.
- DIXON R. A. et FULLER K. W., (1976). Effects of synthetic auxin levels on Phaseollin production and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L.. Physiol. plant Pathol., 9, 299-312.
- DIXON R. A. et LAMB C. J., (1979). Stimulation of *de novo* synthesis of L-phenylalanine ammonia-lyase in relation to phytoalexin accumulation in *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-heated cell suspension cultures of french bean (*Phaseolus vulgaris*). Biochim. Biophys. Acta, 586, 453-463.
- DOLLER G., ALFERMANN W. et REINHARD E., (1976). Production of indole alkaloids in tissue cultures of *Catharanthus roseus*. Planta Med., 30, 14-20.
- DOREE M., LEGUAY J. et TERRINE C., (1972). Flux de CO₂ et modulations de perméabilité cellulaire chez les cellules d'*Acer pseudoplatanus*. Physiol. vég., 10, 115-131.
- DOUGALL D. K., (1980). Nutrition and metabolism. In : Plant Tissue culture as a source of biochemicals. (E. J. Staba, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. 21-58.
- DRAPEAU D., BLANCH H. W. et WILKE C. R., (1986a). Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. Biotechn. Bioengin., 28, 1555-1563.
- DRAPEAU D., SAUVAIRE Y., BLANCH H. W. et WILKE C. R., (1986b). Improvement diosgenin yield from *Dioscorea deltoidea* plant cell cultures by use of a non-traditional hydrolysis method. Planta Med., 6, 474-478.
- DUBOIS J., (1973). Action de la lumière sur la croissance et la teneur en pigments plastidiaux des tissus isolés de carotte. Bull. Soc. Bot. Fr., 120, 3-26.
- DUCHESNE M., FRITIG B. et HIRTH L., (1977). Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco mosaic virus-infected hypersensitive tobacco. Density-labelling evidence of *de novo* synthesis. Biochim. Biophys. Acta., 485, 464-481.

- DURST F., (1974). Contribution à l'étude de la régulation de la phénylalanine ammonium-lyase dans les tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. Thèse Doct. Sci. Nat. (Etat), Strasbourg.
- EBEL J., AYERS R. A. et ALBERSHEIM P., (1976). Host pathogen interactions XII. Response of suspension-cultured soybean cells to the elicitor isolated from *Phytophthora megasperma* var *sojae*, a fungal pathogen of soybeans. Plant Physiol., 57, 775-779.
- EBEL J. et HAHLBROCK K., (1977). Enzymes of flavone and flavonol-glycoside biosynthesis. Eur. J. Biochem., 75, 201-209.
- EBEL J. et HAHLBROCK K., (1982). Biosynthesis of flavonoids. *In* : The Flavonoids : Advances in research, Harborne J. B. et Mabry T. J. eds., Chapman et Hall. London. 641-679.
- EBEL J., SCHMIDT W. E. et LOYAL R., (1984). Phytoalexin synthesis in soybean cells: Elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. Arch. Biochem. Biophys., 232, 240-248.
- EBEL J., STAEB M. R. et SCHMIDT W. E., (1985). Induction of enzymes of phytoalexin synthesis in soybean cells by fungal elicitor. *In* : Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Neumann K. H., Barz W. et Reinhard E., eds.. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 247-254.
- EDELMAN J. et HANSON A. D., (1972). Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot-tissue cultures. The effect of composition of the culture medium. J. Exp. Bot., 23, 469-478.
- EDWARDS K., CRAMER C. L., BOLWELL G. P., DIXON R. A., SCHUCH W. et LAMB C. J., (1985). Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 6731-6735.
- EILERT U., (1987). Elicitation methodology and aspects of application. *In* : Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 4. Constabel F. et Vasil I. K. eds. Academic press, Inc., 153-196.
- EILERT U. et CONSTABEL F., (1985). Ultrastructure of *Papaver somniferum* cells cultured *in vitro* and treated with fungal homogenate eliciting alkaloid production. Protoplasma, 128, 38-42.
- EILERT U., CONSTABEL F. et KURZ W. G. W., (1986a). Elicitor-stimulation of monoterpene indole alkaloid formation in suspension cultures of *Catharanthus roseus*. J. plant physiol., 126, 11-22.
- EILERT U., DELUCA V., CONSTABEL F. et KURZ W. G. W., (1986b). Elicitation of indole alkaloid biosynthesis in periwinkle. *In* : Recognition in Microbe Plant symbiotic on pathogenic interactions. Lugtenberg B. Ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 363-366.

- EILERT U., EHMKE A. et WOLTERS B., (1984). Elicitor-induced accumulation of acridone alkaloid epoxydes in *Ruta graveolens* suspension cultures. Planta Med., **6**, 508-512.
- EILERT U., KURZ W. G. W. et CONSTABEL F., (1985). Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. J. Plant Physiol., **119**, 65-76.
- EL HINNAWAY E., (1974). Effect of some growth regulating substances and carbohydrates on chlorophyll production in *Melilotus alba* Desr. callus tissues cultures. Z. Pflanzenphysiol., **74**, 95-105.
- ENGELSMA G., (1967). Photoinduction of phenylalanine deaminase in gherkin seedlings. I. Effects of blue light. Planta, **75**, 207-219.
- ENGELSMA G., (1972). Possible role of divalent manganese ions in the photoinduction of PAL. Plant. Physiol., **50**, 599-602.
- ENGELSMA G., (1974). On the mechanism of the changes in phenylalanine ammonia-lyase activity in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Eur. J. Biochem., **63**, 137-145.
- ENGELSMA G. et VAN BRUGGEN J. M. H., (1971). Ethylene production and enzyme induction in excised plant tissues. Plant. Physiol., **48**, 94-96.
- ERNSTER L., DALLNER G. et AZZONE G. F., (1963). Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. J. Biol. Chem., **238**, 1124-1131.
- EVANS D. A., (1988). Applications of somaclonal variation. *In* : Advances in biotechnological processes. vol. 9. Biotechnology in agriculture. Mizrahi A., ed.. Alan R. Liss, Inc., New York. 204-220.
- FAHN W., GUNDLACH H., DEUS-NEUMANN B. et STOECKIGT J., (1985). Late enzymes of biosynthesis. Acetyl-CoA : 17-O-deacetylvindoline 17-O-acetyl-transferase. Plant Cell Report, **4**, 333-336.
- FOWLER M. W. et STEPHAN-SARKISSIAN G., (1985). Carbohydrate source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures. *In* : Primary and Secondary Metabolism of plant cell cultures. Neumann K. H., Barz W. et Reinhard E. Eds. Springer-Verlag, Berlin. 66-73.
- FROMAGEOT P., (1963). Dosage des différentes formes du soufre dans les milieux biologiques. *In* : Loiseleur . Techniques de Laboratoire. Tome 1. Fasc. 2. Masson Editeur. Paris. 1000-1016.
- FRY S. C., (1979). Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. Planta, **146**, 343-351.

- FUJITA Y., HARA Y., OGINO T. et SUGA C., (1981a). Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. I. Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. Plant Cell Rep., 1, 59-60.
- FUJITA Y., HARA Y., SUGA C. et MORIMOTO T., (1981b). Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. I. A new medium for the production of shikonin derivatives. Plant Cell Rep., 1, 61-63.
- FUNK C., GUGLER K. et BRODELIUS P., (1987). Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). Phytochemistry, 26, 401-405.
- FURUYA T., YOSHIKAWA T. et KIYOHARA H., (1983). Alkaloid production in cultured cells of *Dioscoreophyllum cumminsii*. Phytochemistry, 22, 1671-1674.
- GATHERCOLE R. W. E., MANSFIELD K. J. et STREET H. E., (1976). Carbon dioxide as an essential requirement for cultured sycamore cell. Physiol. Plant., 37, 213-217.
- GAUTHERET R. J., (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie de tissus de tubercules de carotte. C. R. Acad. Sc. Paris, série D, 208, 118-121.
- GIDROL X., (1984). Caractérisation de l'ATPase tonoplastique de la cellule laticifère d'*Hevea brasiliensis*. Thèse de 3^{ème} cycle, Université d'Aix-Marseille II.
- GREGOR H. D., (1976). Studies on phenylalanine ammonia-lyase from castor bean endosperm. I. Subcellular localization of the enzyme. Z. Pflanzenphysiol., 77, 454-463.
- GRUMBACH K. H. et BACH T. J., (1979). The effect of PSII herbicides, Amitrol and SAN 6706 on the activity of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A-reductase and the incorporation of (2-¹⁴C) acetate and (2-³H) mevalonate into chloroplast pigments of radish seedlings. Z. Naturforsch., 34c, 941-943.
- GUERN J., (1979). Les cellules de plante cultivées en milieu liquide et la croissance de leurs populations. Dans : Production de substances naturelles par culture in vitro de tissus et de cellules de végétaux. Colloque APRIA, Paris.
- GUERN J., RENAUDIN J. P. et BROWN S. C., (1987). The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures. In : Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 4. Constabel F. et Vasil I. K. eds. Academic Press, Inc., 43-76.
- HADDON L. E. et NORTHCOTE D. H., (1975). Quantitative measurement of the course of bean callus differentiation. J. Cell Sci., 17, 11-26.
- HAGIMORI M., MATSUMOTO T. et MIKAMI Y., (1984a). Digitoxin biosynthesis in isolated mesophyll cells and cultured cells of *Digitalis*. Plant Cell Physiol., 25, 947-953.

- HAGIMORI M., MATSUMOTO T. et MIKAMI Y., (1984b). Photoautotrophic culture of undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L.. Plant Cell Physiol., 25, 1099-1102.
- HAGIMORI M., MATSUMOTO T. et OBI Y., (1982). Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. Plant Cell Physiol., 23, 1205-1211.
- HAHLBROCK K., (1977). Regulatory aspects of phenylpropanoid biosynthesis in cell cultures. In : Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application. Barz E., Reinhard E. et Zenk M. Eds. Springer Verlag, Berlin et New York. 95-111.
- HAHLBROCK K. et GRISEBACH H., (1979). Enzymic controls in the biosynthesis of flavonoids and lignin. Annu. Rev. Plant Physiol., 30, 105-130.
- HAHLBROCK K., KNOBLOCH K. H., KREUZALER F., POTTS J. R. M. et WELLMANN E., (1976). Coordinated induction and subsequent activity changes in two groups of metabolically interrelated enzymes. Light-induced synthesis of flavonoids glycosides in cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Eur. J. Biochem., 61, 199-206.
- HAHLBROCK K., LAMB C. J., PURWIN C., EBEL J., FAUTZ E. et SCHAFER E., (1981). Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from *Phytophthora megasperma* var *sojae*. Induction of the enzymes of general phenylpropanoid metabolism. Plant Physiol., 67, 768-777.
- HAHLBROCK K. et SCHRODER J., (1975). Specific effects of enzyme activities upon dilution of *Petroselinum hortense* into water. Arch. Biochem. Biophys., 171, 500-506.
- HAHLBROCK K., SUTTER A., WELLMANN E., ORTMAN R. et GRISEBACH H., (1971). Relation between organ development and activity of enzymes involved in flavone glycoside biosynthesis in young parsley plants. Phytochemistry, 10, 109-116.
- HAHLBROCK K. et WELLMANN E., (1973). Light-independant induction of enzymes related to phenylpropanoid metabolism in cell suspension culture of parsley. Biochim. Biophys. Acta, 304, 702-706.
- HANSON A. D. et EDELMAN J., (1972). Photosynthesis by carrot tissue cultures. Planta, 102, 11-25.
- HANSON K. R. et HAVIR E. A., (1981). Phenylalanine ammonia-lyase. In : The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise. vol. 7. P. K. Stumpf and E. E. Conn, Eds., Academic Press, New York. ISBN 0-12-67407-1, 577-625.
- HARDY T., (1984). Culture *in vitro* d'*Euphorbia characias* : obtention et étude d'une souche photoautotrophe. Thèse de Docteur Ingénieur, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, 104 p.

- HARDY T., CHAUMONT D., BRUNEL L. et GUDIN C., (1987). Photoautotrophic suspension cultures. I. Obtention of photoautotrophic cultures from *Euphorbia characias* L.. J. Plant Physiol., 128, 11-19.
- HARDY-CLARIS I., (1988). Obtention et études physiologique et biochimique de suspensions photomixotrophes et hétérotrophes d'*Abrus precatorius*. Thèse de Doctorat de l'Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand II. U. F. R. de Recherche Scientifique et Technique. N° d'Ordre : 139, 152 p.
- HARTMANN T., WINK M., SCHOOF G. et TEICHMANN S., (1980). Biochemistry of lupin-alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus* and photomixotrophic cell suspension cultures. Planta Med., 39, 282.
- HATTORI T. et OHTA Y., (1985). Induction of phenylalanine ammonia-lyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red-bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate and elevation of medium pH. Plant Cell Physiol., 26, 1101-1110.
- HAVIR E. A. et HANSON K. R., (1973). L-phenylalanine ammonia-lyase (maize and potato). Evidence that the enzyme is composed of four subunits. Biochem., 12, 1583-1591.
- HEGARTY P. K., SMART N. J., SCRAAG A. H. et FOWLER M. W., (1986). The aeration of *Catharanthus roseus* L. G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: the inhibitory effects at high aeration rates on culture growth. J. of Exp. Bot., 37, 1911-1920.
- HEINSTEIN P. F., (1985). Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures. J. Nat. Prod., 48, 1-9.
- HENRY M., AGIER C. et BISTER-MIEL F., (1981). Obtention et croissance *in vitro* d'une suspension cellulaire de *Saponaria ocymoides* L.. Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot., 4, 295-309.
- HINZ H. et ZENK M. H., (1981). Production of protoberberine alkaloids by cell suspension culture of *Berberis* species. Naturwissenschaften, 68, 620-621.
- HORN M. E., SHERRARD J. H. et WIDHOLM J. M., (1983). Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension culture. I. Establishment of photoautotrophic cultures. Plant. Physiol., 72, 426-429.
- HORN M. E. et WIDHOLM J. M., (1984). Aspects of photosynthetic plant tissue culture. In : Applications of genetic engineering to crop improvement. Collins G. B. et Petolino J. F., eds. Nijhoff M./Dr. W. Junk Publ., 113-161.
- HOSADA N., IOT H. et YATASAWA M., (1979). Some accounts on culture conditions of callus tissues of *Solanum laciniatum* Ait. for producing solasodine. Agric. Biol. Chem., 43, 1745-1748.
- HSU A., (1981). Effect of protein synthesis inhibitors on cell growth and alkaloid production in cell cultures of *Papaver somniferum*. J. Nat. Prod., 44, 408-414.

- HUSEMANN W., (1981). Growth characteristics of hormone and vitamin independent photoautotrophic cell suspension cultures from *Chenopodium rubrum*. Protoplasma, 102, 415-451.
- HUSEMANN W., (1983). Continuous culture growth of photoautotrophic cell suspensions from *Chenopodium rubrum*. Plant Cell Reports, 2, 59-62.
- HUSEMANN W. et BARZ W., (1977). Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension of *Chenopodium rubrum*. Physiol. Plant., 40, 877-881.
- HUTCHINSON J., (1964). The genera of flowering plants. Dicotyledones vol. I. Oxford University Press, 396.
- HYODO H., KURODA H. et YANG S. F., (1978). Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. Plant Physiol., 62, 31-35.
- HYODO H. et YANG S. F., (1971). Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in pea seedlings. Plant Physiol., 47, 765-770.
- HYODO H. et YANG S. F., (1974). The effect of ethylene on the development of phenylalanine ammonia-lyase in potato tuber discs. Z. Pflanzenphysiol., 71, 76-79.
- IBRAHIM R. K., (1983). Production de substances chimiques spéciales par la culture *in vitro* : conséquences et déviations métaboliques. Rev. Can. Biol. Exptl., 42, 13-18.
- IBRAHIM R. K., (1987). Regulation of synthesis of phenolics. *In* : Cell Culture and Cell Genetics of Plants. Vol. 4. Constabel F. et Vasil I. K. eds. Academic Press, Inc., 77-95.
- IBRAHIM R. K. et EDGAR D., (1976). Phenolic synthesis in *Perilla* cell suspension cultures. Phytochemistry, 15, 129-131.
- IGBAVBOA U., SIEWEKE H. J., LEITSNER E., ROWER I., HUSEMANN W. et BARZ W., (1985). Alternative formation of anthraquinones and lipoquinones in heterotrophic and photoautotrophic cell suspension culture of *Morinda lucida* Benth. Planta, 166, 537-544.
- IKEDA T., MATSUMOTO T. et NOGUSHI M., (1976). Effects of nutritional factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. Agric. Biol. Chem., 40, 1765-1770.
- IKUMA H. et BONNER W. D., (1967). Properties of higher plant mitochondria. III. Effects of respiratory inhibitors. Plant Physiol., 42, 1535-1544.
- IMASEKI H., UCHIYAMA M. et URITANI I., (1968). Effect of ethylene on the inductive increase in metabolic activities in slices sweet potato roots. Agric. Biol. Chem., 32, 387-389.
- IMOTO S. et OHTA Y., (1988). Elicitation of diacetylenic compounds in suspension cultured cells of Eggplant. Plant Physiol., 86, 176-181.

- INOUYE H., UEDA S., INONE K. et MATSMURA H., (1979). Biosynthesis of shikonin in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Phytochemistry, 18, 1301-1308.
- IRVINE J. E. et FREYRE R. H., (1959). Occurrence of rotenoids in some species of the genus *Tephrosia*. J. Agric. Food Chem., 7, 106-107.
- JANAS K. M., (1984). Control mechanism of L-phenylalanine ammonia-lyase activity in *spirodela oligorrhiza* (Kurz) Hegelm. In : Plant metabolism regulation. Kudrev T., Atanasova L., Ananiev E., Angelov M. et Tsanov T. Eds. Bulgarian acad. Sci. Publ. House, Sofia. 186-189.
- JASPARS E. M. J., (1965). Pigmentation of tobacco crown-gall tissues cultured *in vitro* in dependence of the composition of the medium. Physiol. Plant., 18, 933-940.
- JONES D. H., (1984). Phenylalanine ammonia-lyase : Regulation of its induction, and its role in plant development. Phytochemistry, 23, 1349-1359.
- JULIEN H., (1985). Méthodologie des cultures de cellules végétales. 10ème Colloque, Société Française de Microbiologie, "Aspects industriels des cultures cellulaires d'origine animale et végétale". 93-115.
- KANABUS J., BRESSAN R. A. et CARPITA N. C., (1986). Carbon assimilation in carrot cells in liquid culture. Plant Physiol., 82, 363-368.
- KATO A. et NAGAI S., (1979). Energetics of tobacco cells, *Nicotiana tabacum* L., growing on sucrose medium. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7, 219-225.
- KATO A., SHIMUZU Y. et NAGAI S., (1975). Effect of the initial K_{La} on the growth of tobacco cells in batch culture. J. of Fermentation Technol., 53, 744-751.
- KATOH K., (1983). Photosynthesis and photoassimilation of glucose during photomixotrophic growth of *Marchantia polymorpha* cells in suspension culture. Physiol. Plant., 57, 67-74.
- KATOH K., OHTA Y., HIROSE Y. et IWAMURA T., (1979). Photoautotrophic growth of *Marchantia polymorpha* L. cells in suspension culture. Planta, 144, 509-510.
- KATOU K., TOMIYAMA K. et OKAMOTO H., (1982). Effects of hyphal wall components of *Phytophthora infestans* on membrane potential of potato tuber cells. Physiol. Plant Pathology, 21, 311-317.
- KAUL K. et SABHARWAL P. S., (1971). Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. Plant Physiol., 47, 691-695.
- KEEN N. T., PARTRIDGE J. E. et ZAKI A. I., (1972). Pathogen-produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybean mono-genically resistant to *phytophthora megasperma* var. *Sojae*. Phytopathology, 62, 768.
- KERHARO J. et BOUQUET A., (1950). Plantes médicinales et toxiques de la Côte d'Ivoire-Haute Volta. Vigot frères ed. 2-4.

- KINDL H. et RUIS M., (1971). Metabolism of aromatic amino acids in glyoxysomes. Phytochemistry, 10, 1633-1636.
- KNOBLOCH K. H., BAST G. et BERLIN J., (1982). Medium-induced and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry, 21, 591-594.
- KNOBLOCH K. H. ET BERLIN J., (1980). Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. G. Don.. Z. Naturforsch., 35, 551-556.
- KNOBLOCH K. H. et BERLIN J., (1981). Phosphate mediated regulation of cinnamoyl putrescine biosynthesis in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. Planta Med., 42, 167-172.
- KNOBLOCH K. H. et BERLIN J., (1983). Influence of phosphate on the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspensions culture of *Catharanthus roseus* . I. Comparison of enzyme activities and product accumulation. Plant Cell Tissue Organ. Cult., 2, 333-340.
- KODAMA T., YAMAKAWA T. et MINODA Y., (1980). Rotenoids biosynthesis by tissue culture of *Derris elliptica*. Agric. Biol. Chem., 44, 2387-2390.
- KOHLER H., JEBLICK W., POTEN F., BLASCHEK W. et KAUSS H., (1985). Chitosan-elicited callose synthesis in Soybean cells as a Ca⁺⁺-dependent process. Plant Physiol., 77, 544-551.
- KOHLER H., YOUNG D. H. et KAUSS H., (1984). Physiological changes in suspension-cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. Plant Science Lett., 33, 221-230.
- KOMBRIK E. et HAHNBROCK K., (1985). Dependence of the level of phytoalexin and enzyme induction by fungal elicitor on the growth stage of *Petroselinum crispum* cell cultures. Plant Cell Rep., 4, 277-280.
- KOMBRIK E. et HAHNBROCK K., (1986). Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Plant Physiol., 81, 216-221.
- KOUKOL J. et CONN E. E., (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. J. Biol. Chem., 236, 2692-2698.
- KOUMBA D. et MACHEIX J. J., (1982). Biosynthesis of hydroxycinnamic derivatives in apple fruit cell suspension culture. Physiol. Veg., 20, 137-142.
- KREUZALER F. et HAHNBROCK K., (1973). Flavonoid glycosides from illuminated cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Phytochemistry, 12, 1149-1152.
- KRIKORIAN A. D. et BERQUAM D. L., (1969). Plant cell tissue cultures. The role of Haberlandt. Bot. Rev., 35, 59-88.
- KUC J., (1972). Phytoalexins. Annu. Rev. Phytopathol., 10, 207-232.

- KUHN D. N., CHAPPELL J., BOUDET A. et HAHLBROCK K., (1984). Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate : CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV-light or fungal elicitor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 1102-1106.
- KUROSAKI F., YUTAKA T. et NISHI A., (1985). Phytoalexin production in cultured carrot cells treated with pectinolytic enzymes. Phytochemistry, 24, 1479-1480.
- KURZ W.G.W. et CONSTABEL F., (1985). Aspects affecting biosynthesis and biotransformation of secondary metabolites in plant cell cultures. In : CRC Critical Reviews in Biotechnology., 2, 105-118.
- KUTNEY J. P., AWERYN B., CHATSON K. B., CHOI L. S. L. et KURZ W. G. W., (1985). Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell cultures. XIII. Effects of bioregulators on indole alkaloid biosynthesis. Plant Cell Reports., 4, 259-262.
- LAMB C. J. et DIXON R. A., (1978). Stimulation of *de novo* synthesis of L-phenylalanine ammonia-lyase during induction of phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. FEBS Lett., 94, 277-280.
- LAMB C. J., LAWTON M. A., TAYLOR S. J. et DIXON R. A., (1980). Elicitor modulation of phenylalanine ammonia-lyase in *Phaseolus vulgaris*. Ann. Phytopathol., 12, 423-433.
- LAMB C. J. et MERRIT T. K., (1979). Density labelling studies of the photocontrol of L-phenylalanine ammonia-lyase in discs of potato (*Solanum tuberosum*) tuber parenchyme. Biochem. Biophys. Acta, 588, 1-11.
- LAMB C. J. et RUBERY P. H., (1976). Photocontrol of chlorogenic acid biosynthesis in potato tuber discs. Phytochemistry, 15, 665-668.
- LAMBERT N., TROUSLOT M. F., CHRESTIN H. et MARIN B., (1988). Development of a tropical plant (*Tephrosia vogelii*) with insecticidal activities, using biotechnology : Production of rotenoids with cell cultures in bioreactors. 8th International Biotechnology Symposium. Paris 17-22 Juillet 1988.
- LA ROSA P. C., HASEGAWA P. M. et BRESSAN R. A., (1984). Photoautotrophic potato cells : transition from heterotrophic to autotrophic growth. Physiol. Plant., 61, 279-286.
- LAWTON M. A., DIXON R. A. et LAMB C. J., (1980). Elicitor modulation of the turnover of L-phenylalanine ammonia-lyase in french bean cell suspension cultures. Biochim. Biophys. Acta., 663, 162-175.
- LEGUAY J. J., (1979). Régulation de la division cellulaire par les auxines : Recherche du mode d'action du 2,4-D sur la division des cellules d'Erable (*Acer pseudoplatanus* L.) cultivées en suspension. Thèse Doctorat d'Etat, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.

- LERNER H. R. et REUVENI M., (1982). Induction of pore formation in the plasmalemma of plant cells by poly-L-lysine treatment : a method for the direct measurement of cytosol solutes in plant cells. *In* : Plasmalemma and Tonoplast : Their fonction in the plant cells. Marmé D. Marmé E. et Hertel R. Eds., Elsevier Biochemicals press, Amsterdam. 49-52.
- LEUBE J. et GRISEBACH H., (1983). Further studies on induction of enzymes of phytoalexin synthesis in soybean and cultured plant cells. Z. Naturforsch., C. : Biosc. 38 c, 730-735.
- LICHTENTHALER H. K. et WELLBRURN A. R., (1983). Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans., 603, 591-592.
- LOFFELHARDT W. et KINDL H., (1975). The conversion of L-phenylalanine into benzoic acid on the thylakoid membrane of higher plants. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 487-493.
- LOFFELHARDT W., LUDWIG B. et KINDL H., (1973). Thylakoid-gebundene L-phenylalanine-Ammoniak-Lyase. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 1006-1012.
- LOSCHKE D. C., HADWIGER L. A., SCHRODER J. et HAHLBROCK K., (1981). Effects of light and of *Fusarium solani* on synthesis and activity of phenylalanine ammonia-lyase in peas. Plant Physiol., 68, 680-685.
- MAC CARTHY J. J., RATCLIFFE D. et STREET H. E., (1980). The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don cells grown in batch culture. J. Exp. botany, 31, 1315-1325.
- MACHEIX J. J., SUEN R. et IBRAHIM R. K., (1981). Metabolism of phenylpropanoid compounds in apple fruit cell suspension culture. Biochem. Physiol. Pflanzen., 176, 195-205.
- MAC KINNEY G., (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem., 140, 315-322.
- MARGNA U., (1977). Control at the level of substrate supply on alternative in regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. Phytochemistry, 16, 419-426.
- MARME D., (1982). The role of calcium ion in signal transduction of higher plants. *In* : Plant Growth Subst. Proc. Int. Conf. 11 th., 427-437.
- MARSHALL J. G. et STABA E. J., (1976). Hormonal effects on diosgenin biosynthesis and growth in *Dioscorea deltoidea* tissue culture. Phytochemistry, 15, 53-57.
- MATSUMOTO T., NISHIDA K., NOGUSHI M. et TAMAKI E., (1973). Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension culture. Agric. Biol. Chem., 37, 561-567.

- MERILLON J. M., CHENIEUX J. C. et RIDEAU M., (1983). Cinétique de croissance, évolution du métabolisme glucido-azoté et accumulation alcaloïdique dans une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus*. Planta Med., *47*, 169-176.
- MINAMIKAWA T. et URITANI I., (1965). Phenylalanine ammonia-lyase in sliced sweet potato roots. J. Biochem., *57*, 678-688.
- MISAWA M., HAYASHI M. et TABATA S., (1983). Production of antineoplastic agents by plant tissue cultures. I - Induction of callus tissues and detection of the agents in cultures cells. Planta Med., *49*, 115-119.
- MIZUKAMI H., KONOSHIMA M. et TABATA M., (1977). Effects of nutritional factors on shikonin derivatives formation in *Lithospermum* callus cultures. Phytochemistry, *16*, 1183-1186.
- MOESTA P. et GRISEBACH H., (1981). Investigation of the mechanism of phytoalexin accumulation in soybean induced by glucanor mercuric chloride. Arch. Bioch. Biophys., *211*, 39-43.
- MOK M. C., GABELMAN W. H. et SKOOG F., (1976). Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota* L. J. Am. Soc. Hortic. Sci., *101*, 442-449.
- MONTIES B., (1974). Sur la présence de phénylalanine ammonia-lyase dans les chloroplastes. C. R. Acad. Sci., Paris, *278*, Série D, 1465-1467.
- MORING S. E. et MAC CHESNEY J. D., (1979). High pressure liquid chromatographic separation of rotenoids from plant extracts. J. Assoc. Off. Anal. Chem., *62*, 774-781.
- MUIR W. H., HILDEBRANDT A. C. et RICKER A. J., (1958). The preparation, isolation and growth in culture of single cells from higher plants. Am. J. Bot., *45*, 589-597.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., (1962). A revised medium for rapid growth and biomass assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., *15*, 473-497.
- NAKAGAWA K., FUKUI H. et TABATA M., (1986). Hormonal regulation of berberine production in cell cultures of *Thalictrum minus*. Plant Cell Rep., *5*, 69-71.
- NARI J., MOUTTET C., FOUYCHIER F. et RICARD J., (1974). Subunit interactions in enzyme catalysis. Kinetic analysis of subunit interactions in the enzyme L-phenylalanine ammonia-lyase. Eur. J. Biochem., *41*, 499-515.
- NATO A., BAZETOUX C. et MATHIEU Y., (1977). Photosynthetic capacities and growth characteristics of *Nicotiana tabacum* (cv. Xanthi) call suspension cultures. Physiol. Plant., *41*, 116-123.
- NATO A., HOARAU J. et BOURDU R., (1982). The contribution of photosynthesis activity in the growth of *Nicotiana tabacum* green cell suspension culture. In : Plant Tissue Culture. Fujiwara A. ed., Abe photo printig Co., Ltd., Tokyo, Japon, 253-254.

- NEF C., (1983). Accumulation et excrétion d'alcaloïdes indoliques par des cellules de *Catharanthus roseus* cultivées en milieu non renouvelé privé d'auxine. Influence de la modulation du pH externe. Thèse de 3^{ème} cycle, INP ; Toulouse, 150 p.
- NEF C., AMBID C. et FALLOT J., (1986). Influence of external pH on alkaloid production and excretion by *Catharanthus roseus* resting cell suspensions. *In* : Plant vacuoles. Their importance in solute compartmentation in cells and their application in Plant Biotechnology. B. Marin Ed. plenum Press New-york, London, 529-533.
- NEF C., LAMBERT N., TROUSLOT M.F., CHRESTIN H. et AMBID C., (1988). Production et excrétion d'alcaloïdes par des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* soumises à différents stress. Colloque APRIA. Paris Septembre 1988.
- NEUMANN K. H. et RAAFAT A., (1973). Further studies on the photosynthesis of carrot tissue cultures. Plant Physiol., 51, 685-690.
- NEUMANN D., KRAUSS G., HIEKE M. et GROGER D., (1983). Indole alkaloid formation and storage in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Planta Med., 48, 20-23.
- NEWSOME W. H. et SHIELDS B., (1980). Residues of rotenone and rotenolone on lettuce tomato fruit after treatment in the field with rotenone formulations. J. Agric. Food. Chem., 28, 722-724.
- NISHIZAWA A. N., WOLOSUK R. A. et BUCHANAN B. B., (1979). Chloroplast phenylalanine ammonia-lyase from spinach leaves. Evidence for light-mediated regulation via the ferredoxin-thioredoxin system. Planta, 145, 7-12.
- NITCH J. P., NITCH C. et HAMON S., (1968). Réalisation expérimentale de l'androgénèse chez divers *Nicotiana*. C. R. Scéances Soc. Biol. Paris, 162, 369-372.
- NOBECOURT P., (1940). Nouvelles recherches sur les cultures des tissus végétaux, Bull. Soc. Bot. Fr., 87, 117-120.
- NOE W., LANGEBARTELS C. et SEITZ H. U., (1980). Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension cultures of *Daucus carota* L.. Planta, 149, 283-287.
- NOGUCHI M., MATSUMOTO T., HIRATA V., YAMAMOTO K., KATSUYAMA A., KATO A., AZECHI A. et KATO K., (1977). Improvement of growth rates of plant cell cultures. *In* : Plant Tissue and its biotechnological application. W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk eds.. Springer Verlag, Berlin, 85-94.
- OKAZAKI M., HINO F., NAGASAWA K. et MIURA Y., (1982). Effects of nutritional factors on formation of scopoletin and scopolin in tobacco tissues cultures. Agric. Biol. Chem., 46, 601-607.
- OZEKI Y. et KOMAMINE A., (1981). Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture. Physiol. Plant., 53, 570-577.

- OZEKI Y. et KOMAMINE A., (1985). Effects of inoculum density, zeatin and sucrose on anthocyanin accumulation in a carrot suspension culture. Plant Cell Tissue Organ Cult., 5, 45-53.
- OZEKI Y. et KOMAMINE A., (1986). Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultures. Plant Cell Physiol., 27, 1361-1368.
- PAARDEKOOPE E. C. et SANIT SAMORSON, (1969). Clonal variation in latex flow pattern. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21, 264-273.
- PAREILLEUX A. et VINAS R., (1983). Influence of the aeration rate on the growth yield in suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.. J. of fermentation technology., 61, 429-433.
- PARIS R. R. et MOYSE H., (1967). Précis de matière médicale. Tome II. Pharmacognosie spéciale spermaphyte (suite) : Angiospermes monocotylédones - dicotylédones - apétales et dialypétales. Masson & Cie Ed., Paris. 386-390.
- PAXTON J. D., (1981). Phytoalexins. A working redefinition. Phytopathol. Z., 101, 106-109.
- PEEL E., (1982). Photoautotrophic growth of suspension cultures of *Asparagus officinalis* L.. Cells in turbidostats. Pl. Sci. Lett., 24, 147-155.
- PELLISSIER B., THIBAUD J. B., GRIGNON C. et ESQUERRE-TUGAYE M.T., (1986). Cell surfaces in plant-microorganism interactions. VII. Elicitor preparations from two fungal pathogen depolarize plant membranes. Plant Sci., 46, 103-109.
- PETIARD V. et COURTOIS D., (1983). Recent advances in research for novel alkaloids in Apocynaceae tissue cultures. Physiol. Veg., 21, 217-227.
- PETIARD V., COURTOIS D., GUERITTE F., LANGLOIS N. et MOMPON B., (1982). New alkaloids in plant tissue culture. In : Plant Tissue Culture. Fugiwara A. ed. Japanese Association for Plant Tissue Culture, Maruzen.Tokyo, 309-310.
- PHILLIPS R. et HENSHAW G. G., (1977). The regulation of synthesis of phenolics in stationnary phase cultures of *Acer pseudoplatanus* L.. J. Exp. Bot., 28, 785-794.
- PODSTOLSKI A. et FRELICH K., (1978). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity in barley seedlings. Factors influencing rythmic activity during continuous light. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Biol. CI II, 26, 123-127.
- RAO A. N., (1978). Tissue culture in the orchid industry. In : Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture. Reinert J. et Bajaj Y. P. S., eds.. Narosa publishing house. New Dehli, Madras, Bombay. 44-65.
- RAZZAKE A. et ELLIS B., (1977). Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. Planta., 137, 287-291.
- REBEILLE F., (1988). Photosynthesis and respiration in air-grown and CO₂-grown photoautotrophic cell suspension cultures of carnation. Plant Science, 54, 11-21.

- REBEILLE-BORGELLA F., (1983). Quelques observations sur le métabolisme du phosphate chez les cellules d'érable sycomore. Thèse de docteur es-Sciences Naturelles. Université Scientifique de Grenoble, 108 p.
- REINHARD E. et ALFERMANN A. W., (1980). Biotransformation by plant cell cultures. *In* : Advances in biochemical engineering, vol. 16, Fiechter A. ed.. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 49-83.
- RENAUDIN J. P., (1982). Etude des mécanismes de compartimentation des alcaloïdes indoliques dans des suspensions de cellules de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynacées). Thèse de Docteur Ingénieur. Institut National Agronomique Paris-Grignon, 173 p.
- RENAUDIN J. P. et GUERN J., (1982). Compartmentation mechanisms of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Physiol. Veg., 20, 533-547.
- RHODES M. J. C. et WOOLTORTON L. S. C., (1971). The effect of ethylene on the respiration and the activity of phenylalanine ammonia-lyase in swede and parsnip root tissue. Phytochemistry, 10, 1989-1997.
- RIOV J., MONSELISE S. P. et KAHN R. S., (1969). Ethylene-controlled induction of phenylalanine ammonia-lyase in *Citrus* fruit peel. Plant Physiol., 44, 631-635.
- RIVAL A., (1989). Etude cinétique de la nutrition minérale et métabolisme du carbone et de l'azote dans les suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes. Aspects physiologiques et biochimiques chez *Abrus precatorius* L. (Leguminosae). Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier II.
- ROKEM J. S., SCHWARZBERG J. et GOLDBERG I., (1984). Autoclaved fungal mycelia increase diosgenin production in cell suspension cultures of *Dioscorea deltoidea*. Plant Cell Rep., 3, 159-160.
- ROLLER U., (1978). *In* : Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods, Alfermann, A. W. et Reinhardt, E., eds., Gesellschaft für Strahlen und Umwelt forschung mbH, München, 95.
- ROUSTAN J. P., AMBID C. et FALLOT J., (1982). Influence de l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique sur l'accumulation de certains alcaloïdes indoliques dans les cellules quiescentes de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*. Physiol. Veg., 20, 523-532.
- RUIS H. et KINDL H., (1971). Formation of a,b-unsaturated carboxylic acids from amino acids in plant peroxisomes. Phytochemistry, 10, 2627-2631.
- SAHAI O. et SHULER M., (1984). Environnemental parameters influencing phenolic production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. Biotechnol. Bioeng., 26, 111-120.

- SAKUTA M., TAKAGI T. et KOMAMINE A., (1986). Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L.. J. Plant Physiol., 125, 337-343.
- SALSAC L., CHAILLOU S., MOROT-GAUDRY J. F., LESAIN C. et JOLIVET E., (1987). Nitrate and ammonium in plants. Plant Physiol. Biochem., 25, 805-812.
- SATO F., NAKAGAWA N., TANIO T. et YAMADA Y., (1981). An improved medium for the photoautotrophic culture of *Cytisus scoparius* Link cells. Agri. Biol. Chem., 45, 2463-2467.
- SAUNDERS J. A. et MAC CLURE W., (1975). Phytochrome controlled phenylalanine ammonia-lyase in *hordeum vulgare* plastids. Phytochemistry, 14, 1285-1289.
- SAVANT S., PARIKH N. et CHATPAR H. S., (1982). Phosphate mediated regulation of some of the enzyme of carbohydrate metabolism in *Neurospora crassa*. Experientia, 38, 310-312.
- SCHOPFER J., (1977). Phytochrome control of enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol., 28, 223-252.
- SCHOPFER J. et MOHR H., (1972). Phytochrome mediated induction of phenylalanine ammonia-lyase in mustard seedlings. A contribution to eliminate some misconceptions. Plant Physiol., 49, 8-10.
- SCHRODER J., (1977). Light-induced increase of messenger RNA for phenylalanine ammonia-lyase in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Arch. Bioch. Biophys., 182, 488-496.
- SCHRODER J., BETZ B. et HALHBROCK K., (1977). Messenger RNA-controlled increase of phenylalanine ammonia-lyase activity in parsley. Light independent induction by dilution of cell suspension cultures into water. Plant Physiol., 60, 440-445.
- SCHRODER J., KREUZALER F., SCHAFER E. et HALHBROCK K., (1979). Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavone synthase mRNAs in irradiated plant cells. J. Biol. Chem., 254, 57-65.
- SCHUMACHER H. M., GUNDLACH H., FIEDLER F. et ZENK M. H., (1987). Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. Plant Cell Reports., 6, 410-413.
- SCOTT A. I. A., MIZUKAMI H. et LEE S. L., (1979). Characterization of a 5-methyltryptophan resistant strain of *Catharanthus roseus* cultured cells. Phytochemistry, 18, 795-798.
- SEDMACK J. J. et GROSSBERG S. E., (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G 250. Anal. Biochem., 79, 544-552.
- SHEWRY P. R., PINFIELD N. J. et STOBART A. K., (1971). The effect of 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid and (2-chloroethyl)-trimethylammonium chloride on chlorophyll synthesis in barley leaves. Planta, 101, 352-359.

- SHIELDS S. E., WINGATE V. P. et LAMB C. J., (1982). Dual control of phenylalanine ammonia-lyase production and removal by its product cinnamic acid. Eur. J. Biochem., 123, 389-395.
- SMITH H., BILLET E. E. et GILES A. B., (1977). The photocontrol of gene expression in higher plants. *In* : Regulation of enzyme of synthesis and activity in higher plants. Smith H. ed. Academic press. 93-127.
- SMITH J. I., SMART N. J., MISAWA M., KURZ W. G. W., TALLEVI S. G. et DICOSMO F., (1987). Increased accumulation of indole alkaloids by some cell lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadyl sulphate. Plant Cell Reports., 6, 142-145.
- SNELL F. D. et SNELL C. T., (1949). Colorimetric methods of analysis, vol. 2, Van Nostrand, New York, 804.
- SOLORZANO L., (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite methods. Limnol. Ocean., 14, 799-801.
- STAFFORD H. A., (1969). Changes in phenolic compounds and related enzymes in young plants of *Sorghum*. Phytochemistry, 8, 743-752.
- STAFFORD H. A., (1981). Compartmentation in natural product biosynthesis by multienzyme complexes. *In* : The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise. vol. 7. P. K. Stumpf and E. E. Conn, eds., Academic Press, New York. ISBN 0-12-67407-1, 117-137.
- STECK P. et PETIARD V., (1985). Applications industrielles des cultures végétales : la production de métabolites. *In* : Aspects industriels des cultures cellulaires d'origine animale et végétale. 10ème colloque section de microbiologie industrielle et biotechnologie de la S.F.M. 275-303.
- STOCKIGT J., PFITZNER A. et FIRL J., (1981). Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth.. Plant Cell Reports, 1, 36-39.
- SUNDERLAND N., (1966). Pigmented plant tissue in culture. I. Auxins and pigmentation in chlorophyllous tissues. Ann. Bot., 30, 253,268.
- SUGANO N., IWATA R. et NISHI A., (1975). Formation of phenolic acids in carrot cell suspension culture. Phytochemistry, 14, 1205-1207.
- SUZUKI H., MATSUMOTO T., KISAKI T. et NOGUSHI M., (1981). Influence of cultural conditions on polyphenol formation and growth of Amache cells (*Hydrangea macrophylla*). Agric. Biol. Chem., 45, 1067-1077.
- TABATA M. et FUJITA Y., (1985). Production of shikonin by plant cell culture. *In* : Biotechnology in plant science. Relevance to agriculture in the eighties. Zaitlin M., Day P. et Hollaender A., eds.. Academic Press, Inc., 207-218.

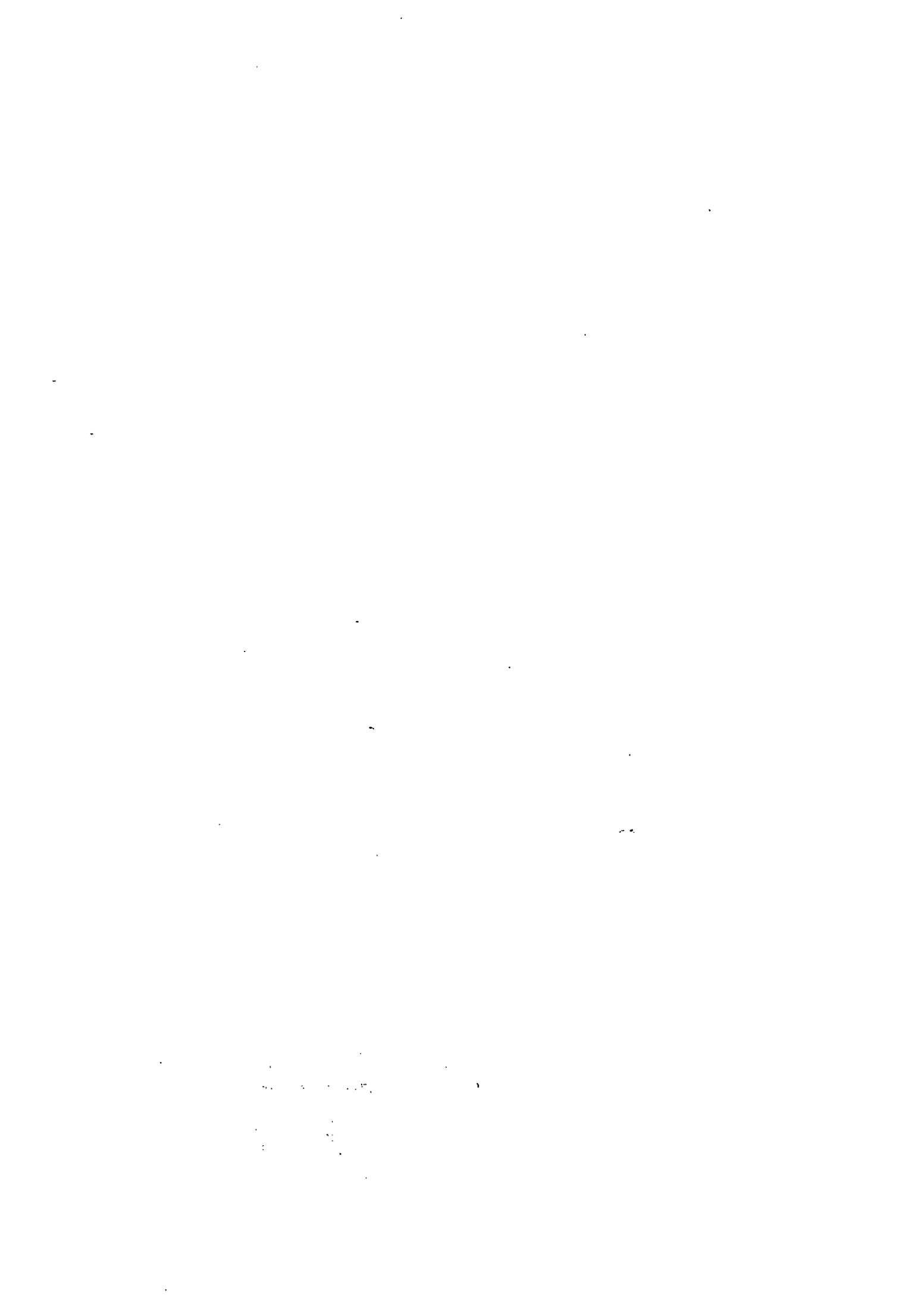
- TABATA M., MARUMOTO Y. et KONOSHIMA M., (1971 a). Regulation of nicotine production in tobacco tissue culture by plant growth regulators. Phytochemistry, 10, 723-729.
- TABATA M., MIZUKAMI H., HIRAOKA N. et KONOSHIMA M., (1974). Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Phytochemistry, 13, 927-932.
- TABATA M., MIZUKAMI H., HIRAOKA N. et KONOSHIMA M., (1976). The production and regulation of shikonin derivatives in cultured cells. Abst. 12th Phytochem. Symp. Japan, Kyoto, 1-8.
- TABATA M., YAMAMOTO H. et HIRAOKA N., (1971 b). Alkaloid production in the tissue cultures of some solanaceous plants. *In* : Les cultures de tissus de plantes. Paris, CNRS, 389-402.
- TABATA M., YOSHIKAWA N., TSUKADA M. et FUKUI H., (1982). Localisation and regulation of shikonin formation in the cultured cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *In* : Plant Tissue Culture, Fujiwara A. Ed., Japanese Association for Plant Tissue culture, Tokyo, 332-350.
- TAL B. et GOLDBERG I., (1982). Growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells in batch and continuous culture. Planta Med., 44, 107-110.
- TAL B., GRESSEL J. et GOLDBERG I., (1982). The effects of medium constituents on growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells grown in batch cultures. Planta Med., 44, 111-115.
- TANAKA Y. et URITANI I., (1976). Immunochemical studies on fluctuation of phenylalanine ammonia-lyase activity in sweet potato in response to cut injury. J. Biochem., 79, 217-219.
- TAUSSKY H. et SHOOR E., (1953). A micro-colorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem., 202, 675-685.
- THOM M., MARETZKI A., KOMER E. et SAKAI W. S., (1981). Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. Plant Cell Tissue Organ Culture., 1, 3-14.
- THORPE T. A., MAIER V. P. et HASEGAWA S., (1971). Phenylalanine ammonia-lyase activity in *Citrus* fruit tissue culture *in vitro*. Phytochemistry, 10, 711-718.
- TIETJEN K. G., HUNKLER D. et MATERN U., (1983). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi : 1. Identification of induced products as coumarin derivatives . Eur. J. Biochem., 131, 401-407.
- TIETJEN K. G. et MATERN U., (1983). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 2. Effects on enzyme activities. Eur. J. Biochem., 131, 409-413.

- TRISONTHI P., BACCOU J. C. et SAUVAIRE Y., (1980). Essai d'amélioration de la production de sapogénines stéroïdiques par les tissus de Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) cultivées *in vitro*. C. R. Acad. Sc. Paris, t. 291, série D, 357-360.
- TROUSLOT M. F., (1984). Prospection de quelques plantes médicinales en Côte d'Ivoire. Rapport de mission. ORSTOM.
- TYLER R. T., KURZ W. G. W. et PANCHUK B. D., (1986). Photoautotrophic cell suspension cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus* L. G. Don) : Transition from heterotrophic to photoautotrophic growth. Plant Cell Reports, 3, 195-198.
- TZUZUKI M., MIYACHI S., SATO F. et YAMADA Y., (1981). Photosynthetic characteristics and carbonic anhydrase activity in cells cultured photoautotrophically and mixotrophically and cells isolated from leaves. Plant Cell Physiol., 22, 51-57.
- UEDA Y., ISHIYAMA H., FUKUI M. et NISHI A., (1974). Invertase in cultured *Daucus carota* cells. Phytochemistry, 13, 383-387.
- UMETAMI Y., TANAKA S. et TABATA M., (1982). Glucosylation of extrinsic compounds by various plant cell culture. In : Plant Tissue Culture. A. Fugiwara Ed., Maruzen. Tokyo, 383-384.
- VAN DER HEIJDEN R., VERHEIJ E. R., SCHRIPEMA J., BAERHEIM SVENDSON A. et HARKES P. A. A., (1988). Induction of triterpene biosynthesis by elicitor in suspension cultures of *Tabernaemontana* species. Plant. Cell. Reports, 7, 51-54.
- VERMA D. P. et MARCUS A., (1974). Oxygen availability as a control factor in the density dependent regulation of protein synthesis in cell culture. J. of Cell Science., 41, 331-337.
- WALKER A. et SILLANS R., (1961). Les plantes utiles du Gabon. P. Lechevallier ed. Paris. 262.
- WALLER G., MACVEAN C. et SUZUKI T., (1983). High production of caffeine and related enzyme activities in callus cultures of *Coffea arabica* L.. Plant Cell Rep., 2, 109-112.
- WALTON D. C. et SONDEHEIMER E., (1968). Effects of abscisin II on phenylalanine NH₃-lyase activity in excised bean axes. Plant Physiol., 43, 467-469.
- WEISSENBOCK G., PLESSER A. et TRINKS K., (1976). Flavonoid content and enzyme activities in isolated oat chloroplasts (*Avena sativa* L.). Ber. Dtsch. Bot. Ges., 89, 457-472.
- WEISSENBOCK G. et SCHNEIDER V., (1974). Untersuchungen zur Lokalisation von Flavonoiden in Plastiden. III. Flavonoidgehalte der chloroplasten aus *Avena sativa* L. und das problem der Kontamination isolierter Plastiden durch Flavonoide. Z. Pflanzenphysiol., 72, 23-25.

- WELLMANN E., (1974). Regulation der Flavonoidbiosynthese durch ultraviolettes Licht und Phytochrom in Zellkulturen und keimlingen von Petersilie (*Petroselinum hortense* Hoffn.). Ber. Dtsch. Bot. Ges., 87, 267-273.
- WELLMANN E., (1975). UV Dose-dependent induction of enzymes related to flavonoid biosynthesis in cell suspension cultures of parsley. FEBS Lett., 51, 105-107.
- WELLMANN E. et SCHOPFER P., (1975). Phytochrome mediated de novo synthesis of Phenylalanine ammonia-lyase in cell suspension cultures of Parsley. Plant Physiol., 55, 822-827.
- WESTCOTT R. J. et HENSHAW G. G., (1974). Phenolic metabolism in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. . Abst. 3 rd. Intern. Congr. Pl. Tissue Cell Culture, Leicester N° 256.
- WESTCOTT R. J. et HENSHAW G. G., (1976). Phenolic synthesis and PAL activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus*. Planta, 131, 67-73.
- WHITE P. R., (1939 a). Potentially unlimited growth of exised plant callus in an artificial medium. Am. J. Bot., 26, 44-59.
- WHITE P. R., (1939 b). Potentially unlimited growth of exised plant callus in an artificial medium. Am. J. Bot., 26, 59-64.
- WIERMANN R., (1981). Secondary plant products and cell and tissue differentiation. *In* : The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. P. K. Stumpf and E. E. Conn, Eds., vol. 7. Academic Press, New York. ISBN 0-12-67407-1, 86-112.
- WILSON G. et BALAGUE C., (1985). Biosynthesis of anthraquinone by cells of *Galium mollugo* L. grown in a chemostat with limiting sucrose or phosphate. J. of Exp. Botany, 36, 485-493.
- WILSON G. et MARRON P., (1978). Growth and anthraquinone biosynthesis by *Galium mollugo* L. cells in batch and chemostat culture. J. of Exp. Botany, 29, 837-851.
- WINK M., (1987). Why do lupin cell cultures fail to produce alkaloids in large quantities ? Plant Cell tissue and Organ Culture, 8, 103-111.
- WINK M. et HARTMANN T., (1982). Physiological and biochemical aspects of quinolizidine alkaloid formation in cell suspension cultures. *In* : Plant Tissue Culture. Fugiwara A., ed., Abe Photo Printig Co., Ltd., Japon, 333-334.
- WOLTERS B. et EILERT U., (1982). Acridonepoxidgehalte in Kalluskulturen von *Ruta graveolens* und ihre Steigerung durch Mischkultur mit Pilzen. Z. Naturforsch. C. : Biosci., 37c, 575-583.
- YAMADA Y., (1984). *In* : Primary and Secondary metabolism of plant cell cultures. Springer-Verlag, Giessen, 228-242.
- YAMADA Y., IMAIZUMI K., SATO F. et YASUDA T., (1981). Photoautotrophic and photomixotrophic culture in green tobacco cells in a jar fermenter. Plant and Cell Physiol., 22, 917-922.

- YAMADA Y. et SATO F., (1978). The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. Plant Cell Physiol., 19, 691-699.
- YAMADA Y., SATO F. et HAGIMORI M., (1978). Photoautotrophism in green cultured cells. In : Frontiers of plant tissues culture. Thorpe T. A. , ed., Université de Calgary, Canada, 462-463.
- YAMAKAWA T., KATO S., ISHIDA K., KODAMA T. et MINODA Y., (1983). Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. Agric. Biol. Chem., 47, 2185-2191
- YEOMAN M. M., LINDSEY K., MIEDZYBRODZKA M. B. et MAC LAUHLAN W. R., (1982). Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant cell and tissue cultures. In : Differentiation in vitro British society for cell biology symposium, vol 4, Yeomann M. et Truman D. E. S., eds., Cambridge University press, 65-82.
- YOSHIKAWA N., (1978). Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexins elicitors. Nature (London), 275, 546-547.
- YOSHIKAWA N., FUKUI H. et TABATA M., (1986). Effect of gibberellin A on shikonin production in *Lithospermum* callus cultures. Phytochemistry, 25, 621-622.
- YOUNG D. H., KOHLE H. et KAUSS H., (1982). Effect of chitosan on membrane permeability of suspension cultured *Glycine max*- and *Phaseolus vulgaris* cells. Plant Physiol., 70, 1449-1454.
- ZAMSKI E. et WYSE R. E., (1985). Streospecificity of glucose in sugar beet taproot tissue. Plant Physiol., 81, 478-481.
- ZAPROMETOV M. N. et SHIPILOVA S., (1972). Phenylalanine ammonia-lyase and the formation of phenolic compounds in maize seedlings. Fiziol. Rasten, U.S.S.R., 19, 498-503.
- ZAHRINGER U., EBEL J. et GRISEBACH H., (1979). Induction of phytoalexin in soy bean. Elicitor-induced increase in enzyme activities of flavonoid biosynthesis and incorporation of mevalonate in glyceollin. Arch. Biochem. Biophys., 188, 450-455.
- ZENK M. H., EL-SHAGI H., ARENS H., STOCKIGT J., WEILER E. W. et DEUS B., (1977). Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In : Plant Tissue Culture and its Bio-technological application. Barz W., Reinhard E. et Zenk M.H., eds., Springer -Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 27-44.
- ZENK M. H., EL-SHAGI H. et SCHULTE U., (1975). Anthraquinones production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Planta Med. Suppl., 79-101.
- ZIMMERMANN A. et HAHLBROCK K., (1975). Light-induced changes in enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Purification and some properties of phenylalanine ammonia-lyase. Arch. Biochem. Biophys., 166, 54-62.

- ZUCKER M., (1965). Induction of Phenylalanine Deaminase by lights and its relation to chlorogenic acid synthesis in Potato tuber tissue. Plant Physiol., 40, 779-784.
- ZUCKER M., (1968). Sequential induction of phenylalanine NH₃-lyase and a lyase inactivating system in potato tuber disks. Plant Physiol., 43, 365-374.
- ZUCKER M., (1971). Induction of phenylalanine ammonia-lyase in Xanthium leaf discs. Increased inactivation in darkness. Plant Physiol., 47, 442-444.



PLANCHES HORS-TEXTES

PLANCHE I:

A) et B) Plants de *Tephrosia vogelii* Hook f. sur les parcelles expérimentales du centre ORSTOM d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire).
(Photo N. LAMBERT)

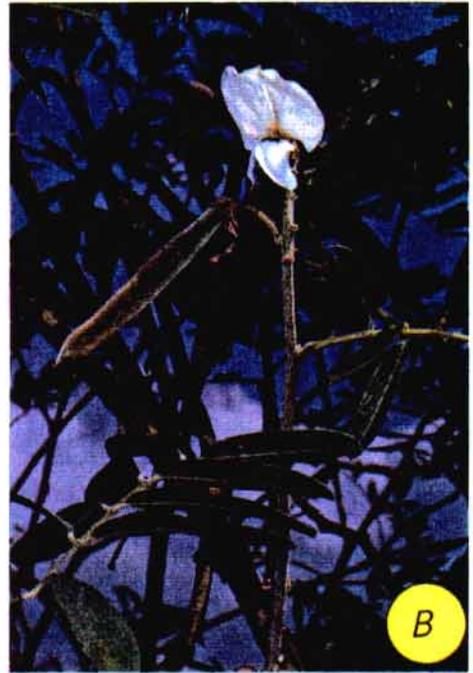
C) Microboutures enracinées de *Tephrosia vogelii* sur milieu KNOP
(Photo A. RIVAL)

D) Germinations de *Tephrosia vogelii* sur de l'H₂O bidistillée
(Photo N. LAMBERT)

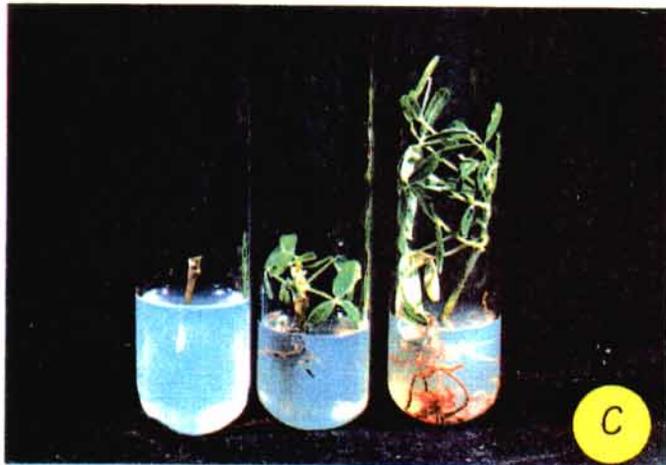
E) Culture en bioréacteur expérimental de 2 litres (Biolafitte) de suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* .
(Photo N. LAMBERT)



A



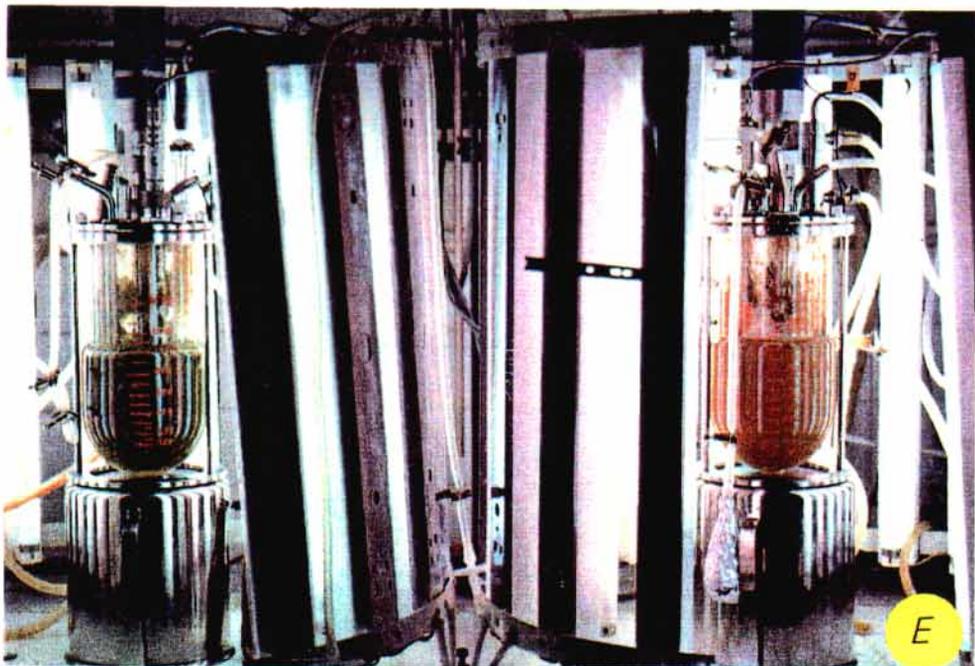
B



C



D



E

PLANCHE II :

F) Comparaison de cals hétérotrophes et chlorophylliens de *Tephrosia vogelii* : souche B cultivés en boîtes de Pétri.

(Photo A. RIVAL)

G) Cal chlorophyllien de souche B. (Photo A. RIVAL)

H) Cal hétérotrophe de souche B. (Photo A. RIVAL)

I) Cal chlorophyllien de souche B cultivé en Erlenmeyer. (Photo A. RIVAL)

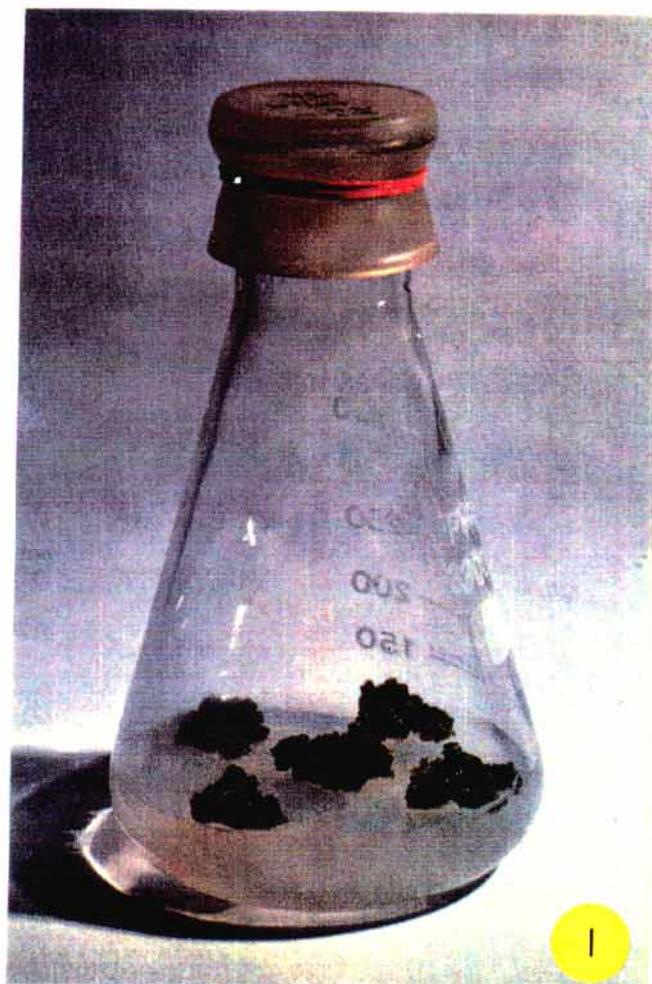
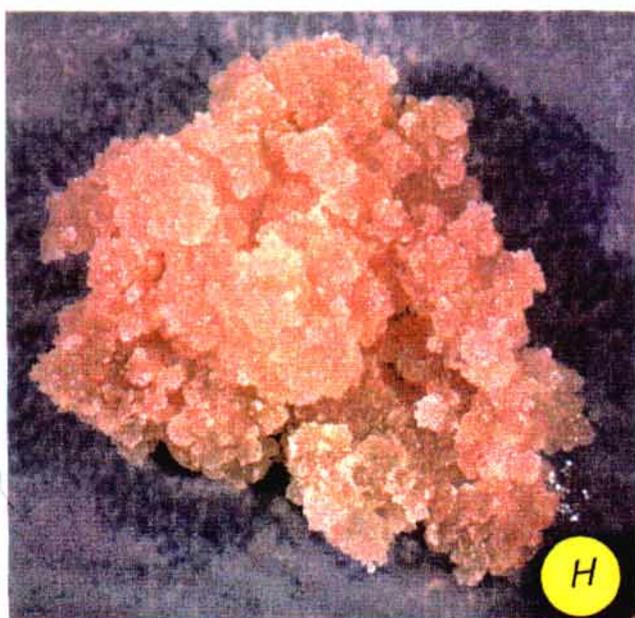
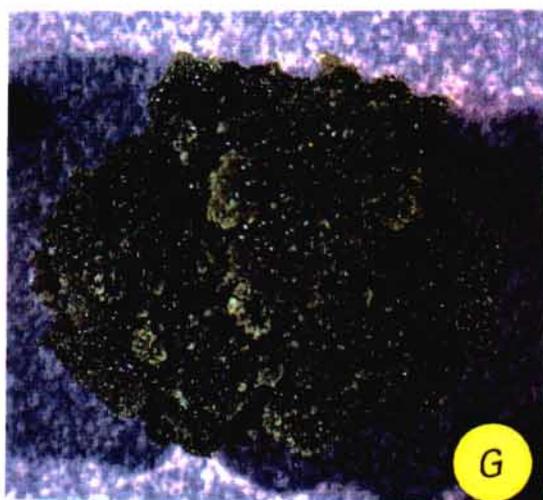


PLANCHE III :

J) Culture en Bioréacteur expérimental de 2 litres (BiolaFitte) de suspensions cellulaires photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* : souche β .

(Photo N. LAMBERT)

K) Suspensions cellulaires hétérotrophes de souche β en début de phase stationnaire (10^{ème} jour de culture).

(Photo N. LAMBERT)

L) Suspensions cellulaires photomixotrophes de souche β âgées de 15 jours.

(Photo N. LAMBERT)

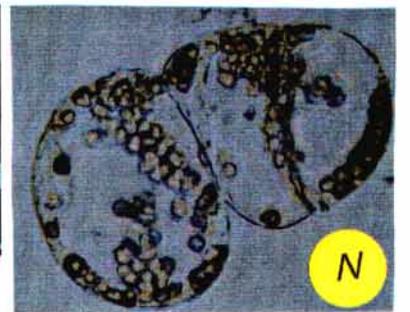
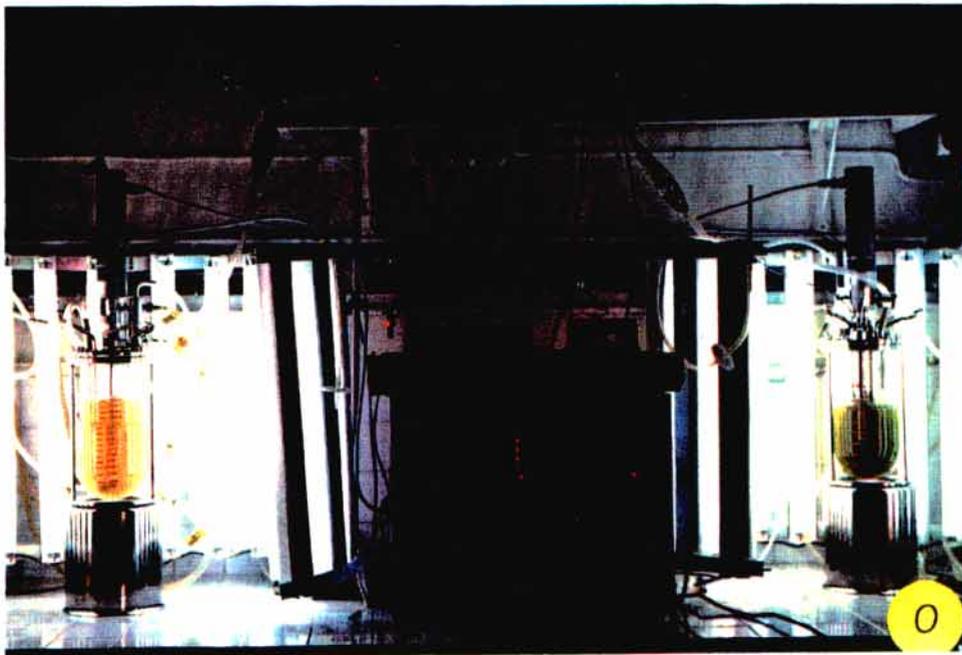
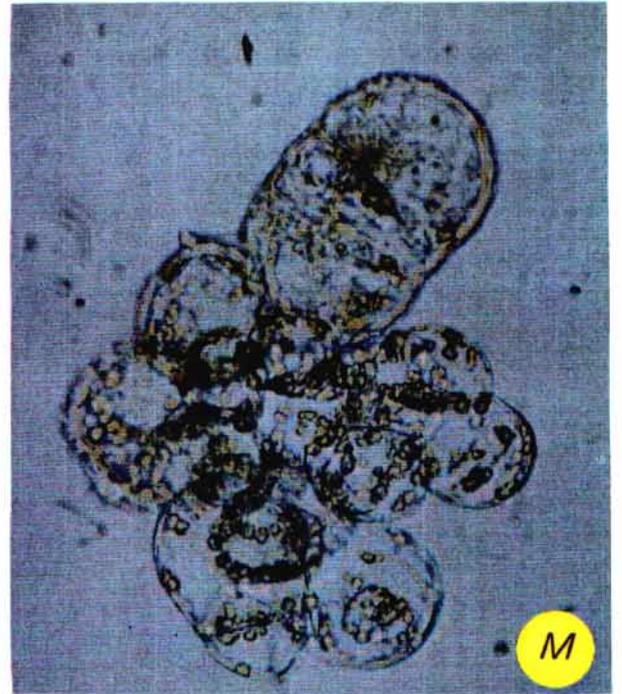
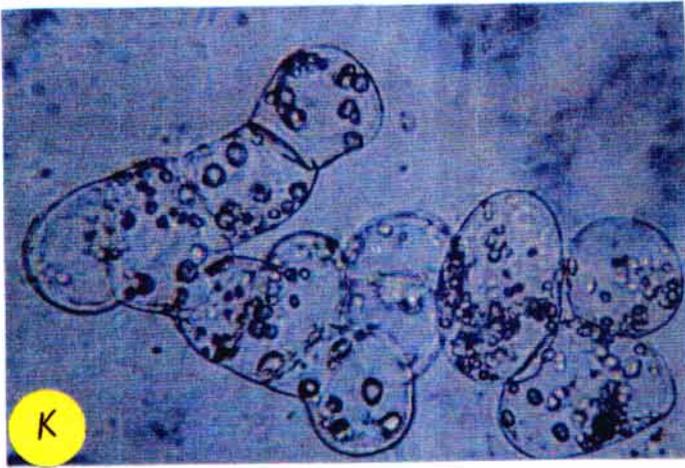
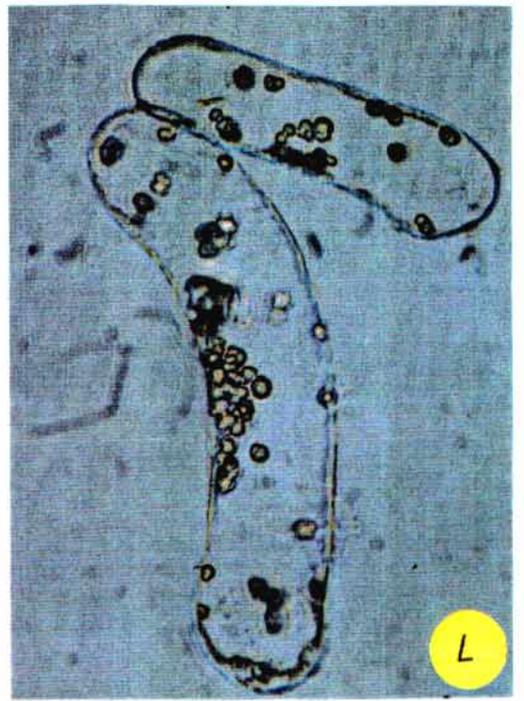
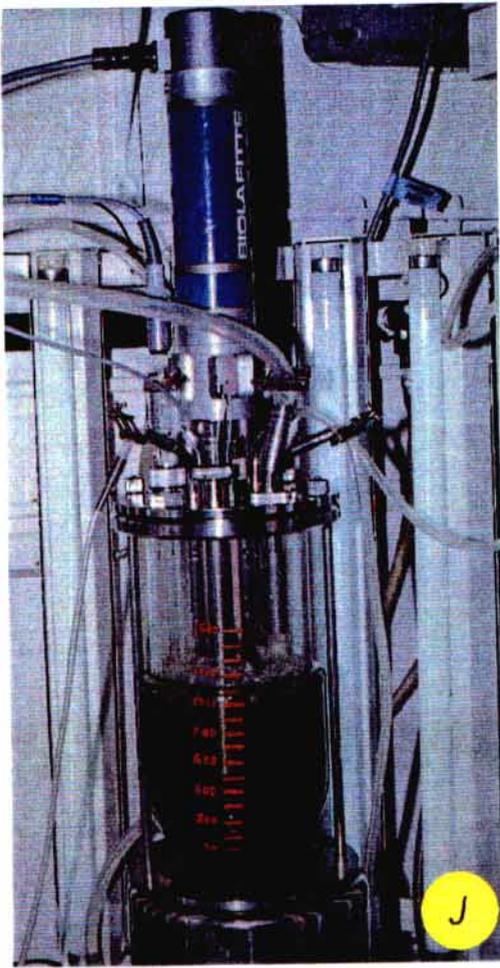
M) et N) Suspensions cellulaires photomixotrophes de souche β en début de culture.

(Photo N. LAMBERT)

O) Système de régulation utilisée pour la culture en bioréacteur de 2 litres (BiolaFitte).

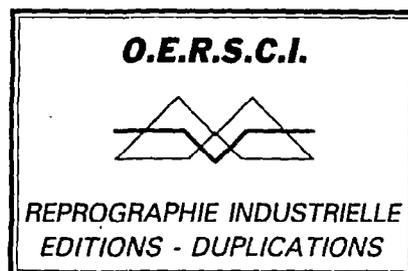
(Photo N. LAMBERT)

PLANCHE III :



50 μ

*Office d'Édition de la Recherche Scientifique
et Coopération Internationale*



*Parc Modulopolis H 1 Zone Euromédecine
Montpellier 67.52.20.05*

RÉSUMÉ

Une souche hétérotrophe et une souche photomixotrophe de *Tephrosia vogelii* Hook f., *Papilionaceae* tropicale accumulant dans ses feuilles des roténoïdes (insecticides biodégradables) ont été étudiées dans le but de cerner l'impact de la lumière sur la production de métabolites secondaires *in vitro*. Deux systèmes de culture ont été employés : culture en Erlenmeyer de 250 ml et culture en bioréacteur de 2 litres (Biolafitte).

Les cinétiques de production de biomasse, d'accumulation et d'excrétion de roténoïdes, l'évolution de la teneur en chlorophylles et de l'activité respiratoire et photosynthétique ainsi que les modifications intra et extracellulaires en certains constituants glucidiques, azotés et phosphatés ont été comparés. Des différences importantes de comportement en fonction des potentialités photosynthétiques de la souche considérée et du système de culture employé ont été mises en évidence.

Dans tous les cas, la production de roténoïdes est améliorée en condition de photomixotrophie et est maximale en fin de phase exponentielle.

Des essais d'optimisation de la production ont été réalisés : incorporation de précurseurs (L-Phénylalanine), stimulation par différents stress (éliciteur pathogène, salin, pH, éthylène...). Les résultats de ces manipulations se sont avérés positifs et très prometteurs : dans certains cas, la production est multipliée par un facteur 7,5).

Cette étude est complétée par une caractérisation partielle de la Phénylalanine Ammonia-lyase, enzyme clé de la voie de biosynthèse des roténoïdes. Son évolution au cours du cycle de culture des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes et lors de traitements différents a été suivi. Le rôle de la PAL dans les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des roténoïdes est discuté.

MOTS-CLÉS :

Culture *in vitro*

Tephrosia vogelii

Roténoïdes

Hétérotrophie

Photomixotrophie

Incorporation de L-Phénylalanine

Stress : pathogène, salin, éthylène

Phénylalanine Ammonia-lyase