

Résumé.....	1
Abstract.....	3
Liste des abréviations.....	5
Introduction générale.....	9
Partie 1 : Bibliographie.....	13
I. Etat des connaissances concernant le resvératrol.....	14
i. Présence dans le monde végétal.....	14
ii. Voie de biosynthèse.....	15
1. Description de la voie métabolique.....	15
2. Liens entre pathogènes et synthèse des stilbènes.....	18
iii. Le resvératrol : une molécule d'intérêt pour l'homme.....	19
1. Utilisations en cosmétique.....	20
2. Utilisations dans les compléments alimentaires.....	20
3. Propriétés biologiques.....	21
a. Activité contre l'athérosclérose.....	21
b. Activité contre le vieillissement cellulaire.....	22
c. Activité contre certains cancers.....	23
d. Activité contre les infections virales.....	23
e. Activité contre l'obésité et le diabète.....	24
f. Activité contre la dégénérescence des neurones.....	24
4. Molécule de défense végétale.....	25
a. Mécanismes de défense chez les plantes.....	25
b. Perspectives d'applications.....	31
iv. Dérivés du resvératrol et autres stilbènes présents chez les plantes.....	32
II. Production conventionnelle du resvératrol.....	35
i. Extraction végétale par solvant.....	35
ii. Synthèse chimique.....	37
iii. Utilisation des bactéries ou des levures génétiquement modifiées.....	43
III. Production alternative du resvératrol : biotechnologies végétales.....	43
i. Conditions de culture.....	43
ii. Avantages de l'emploi des cultures végétales <i>in vitro</i>	45
iii. Induction de la biosynthèse en suspensions cellulaires.....	47
iv. Induction de la biosynthèse dans des cultures de racines transformées.....	49
Partie 2 : Matériel et méthodes analytiques.....	53
I. Matériel végétal.....	54
II. Milieu de culture.....	54
III. Stérilisation du milieu et du matériel.....	55
IV. Incubation.....	55
V. Elicitation.....	55

VI.	Mesure de la biomasse.....	56
VII.	Extraction des stilbènes.....	56
VIII.	Analyse par chromatographie sur couche mince.....	57
IX.	Analyse des stilbènes.....	58
X.	Mise en œuvre des cultures.....	60
	i. Expérimentations en fioles.....	60
	ii. Expérimentations en bioréacteur.....	62
Partie 3 : Etude en fioles d'Erlenmeyer de 300 mL.....		67
I.	Introduction.....	68
II.	Description de la mise en culture.....	68
III.	Premiers essais sur les souches 41B et Concord.....	68
	i. Protocole expérimental.....	68
	ii. Résultats obtenus sur la souche 41B.....	70
	iii. Résultats obtenus sur la souche Concord.....	74
IV.	Cinétique de croissance en fiole de la souche Concord.....	77
V.	Etude de l'influence de différents paramètres.....	78
	i. Détermination des intervalles de concentration adéquats pour la production de resvératrol.....	79
	ii. Influence de la durée d'exposition au MeJA.....	81
	iii. Influence du rapport [MeJA]/MF.....	84
	iv. Interprétations.....	86
	v. Influence de la présence de la méthyl- β -cyclodextrine.....	89
VI.	Exploration d'une méthode d'extraction alternative des stilbènes par résines.....	93
VII.	Conclusion et perspectives.....	99
Partie 4 : Etude en bioréacteur agité de 5 L.....		101
Publication : Bioproduction of resveratrol: optimisation of cell suspension culture from <i>Vitis labrusca</i> in bioreactor		
Partie 5 : Discussion générale.....		131
I.	Croissance cellulaire.....	133
II.	Elicitation au méthyljasmonate (MeJA)	147
III.	Etude de la localisation de la biosynthèse du resvératrol.....	150
	i. Etude préliminaire par vidéomicroscopie.....	151
	ii. Observation par microscopie confocale.....	152
Conclusion générale.....		157
Références.....		161

Résumé

Le travail effectué au cours de cette thèse a permis une avancée importante dans la connaissance de l'élicitation des cellules de vigne. Nous avons étudié les effets de deux éliciteurs, le méthyljasmonate et la méthyl- β -cyclodextrine, employés seuls et en élicitation croisée sur des suspensions de cellules de vigne (*porte-greffe 41B* et *Vitis labrusca*), pour la production de stilbènes (resvératrol et viniférines). Ceci a permis d'atteindre des concentrations de resvératrol très élevées pour un métabolite secondaire et les relations entre la concentration d'éliciteur, la biomasse à l'inoculum et la durée de l'élicitation ont été étudiées. D'autre part, le travail a également porté sur le changement d'échelle quant à la culture cellulaire et son élicitation et sur le suivi de plusieurs phénomènes et paramètres (croissance cellulaire, consommation des sucres, production du resvératrol, suivi du taux d'oxygène dissous et du pH). Des essais en bioréacteur clos de 5L ont ainsi abouti à une production significative de resvératrol à cette échelle et ont permis l'élaboration de modèles cinétiques rendant compte de la croissance de la biomasse et de la production du resvératrol. Un autre aspect de l'étude s'est intéressé à la localisation intracellulaire de la synthèse du resvératrol. Les résultats obtenus par microscopie confocale ont confirmé que le resvératrol s'accumulait majoritairement dans la paroi de la cellule et dans des vésicules cytoplasmiques (organites sphériques présents à proximité de la paroi), avant d'être excrété dans le milieu de culture. Enfin, une démarche a été initiée en vue de la production d'autres métabolites à partir du resvératrol notamment l' ϵ -viniférine.

Abstract

The work presented here addressed two main subjects, namely that of grapevine cells elicitation for the production of stilbenes (resveratrol and viniferins) and the scale up of such culture in bioreactors.

Shake-flask cultures of grapevine (*rootstock 41B* and *Vitis labrusca*) were elicited with methyl jasmonate or methyl- β -cyclodextrin, alone or in combination. This resulted in a significant accumulation of resveratrol in the medium. The relationship between the production of resveratrol and factors such as the elicitor concentration, inoculation rate and the duration of elicitation phase were studied.

The second part of this work was concerned with scale up of the culture from shake-flask to 5 L bioreactor. Several parameters were monitored such as cell growth, sugars consumption, resveratrol production, dissolved oxygen concentration and pH. Kinetic models explaining growth and resveratrol production were developed using the results from three bioreactor batches. Preliminary work was performed to initiate the study of metabolites related to resveratrol such as ϵ -viniferin.

The study also completed previous work that looked at the localisation of resveratrol synthesis within the cells using confocal microscopy. The results confirmed that resveratrol was accumulated mainly in the cell wall and in the cytoplasmic vesicles before being excreted/secreted into the culture medium.

Liste des abréviations

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
3-O-GT	3-Glucosyl-O-transférase
4CL	4-Coumarate-CoA ligase
ABC	ATP binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAP	Benzylaminopurine
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD	Cyclodextrine
CHS	Chalcone synthase
C:N	Rapport molaire atomique carbone vs. azote
cv.	Cultivar
DMH	Diméthylhydrazine
dO ₂	Oxygène dissous
DW	Dry weight
ET	Ethylène
[ε-vinif]	Concentration molaire de l'ε-viniférine
FCA	Foyers de cryptes aberrantes
FW	Filtered weight
GC	Gas chromatography
GSH	Glutathion
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	High performance liquid chromatography
HR	Réponse hypersensible
HSCCC	High-speed countercurrent chromatography
JA	Acide jasmonique
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
MeJA	Méthyljasmonate
MeSA	Salicylate de méthyle
MF	Masse fraîche
MIMP	Microbe-Induced Molecular Pattern
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NO	Monoxyde d'azote
OGM	Organisme génétiquement modifié
OMT	O-méthyl-transférase
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
PCV	Packed cell volume
PER	Peroxydase
PPR	Pattern Recognition Receptor
PR	Pathogenesis related
[resv]	Concentration molaire du resvératrol
R _f	Rapport au front de solvant
rpm	Rotations par minute
RSD	Relative standard deviation

SA	Acide salicylique
SAR	Réponse systémique acquise
STS	Stilbène synthase
TAL	Tyrosine ammonia-lyase
T _d	Temps de doublement
TMV	Virus de la mosaïque du tabac
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
v/v	Volume par volume
VVM	Volume d'air introduit dans le bioréacteur par volume de travail par minute
WW	Wet weight

Introduction générale

Le resvératrol et ses dérivés appartiennent à une catégorie de métabolites secondaires végétaux particuliers appelés stilbènes ou stilbénoloïdes. Leur structure chimique les classe parmi les polyphénols, substances qui possèdent des propriétés anti-oxydantes. Les stilbènes sont présents dans de nombreuses plantes aussi variées que des fruits rouges, les arachides, certains pins, la renouée du Japon mais encore la vigne. Ils interviennent tout particulièrement dans les mécanismes de défense actifs chez les plantes. Leur synthèse dans le monde végétal est généralement déclenchée par la détection d'un agent pathogène par le phénomène dit d'élicitation. C'est ce processus qui en a permis l'étude en laboratoire et la voie de biosynthèse du resvératrol en lui-même est aujourd'hui connue, même s'il reste un certain nombre d'interrogations quant à celle de ses dérivés, notamment celle des viniférines.

Par leur pouvoir anti-oxydant, les stilbènes ont éveillé de nombreux intérêts depuis quelques décennies. En effet, la découverte du resvératrol dans le vin a contribué à porter un regard nouveau sur la molécule. Le rôle majeur qu'il semble jouer dans les effets bénéfiques sur la santé que confère une consommation modérée de vin rouge est désormais largement connu sous le nom de « *French Paradox* ». Cette publicité a trouvé des résonances dans plusieurs secteurs, comme ceux des produits cosmétiques et des compléments alimentaires et même le domaine pharmaceutique. Plusieurs produits formulés à partir du resvératrol sont aujourd'hui couramment commercialisés, ce qui montre la concrétisation d'un tel succès. Les effets protecteurs du resvératrol contre de nombreuses affections (maladies cardiovasculaires, cancers, obésité, diabète, infections virales, maladies neurodégénératives) sont l'objet d'études prometteuses quant à de possibles applications comme médicament.

L'intérêt porté au resvératrol a posé la question de sa production à l'échelle industrielle. Actuellement, celui-ci est extrait à l'aide de solvants à partir des sarments de vigne ou des rhizomes de la renouée du Japon. Mais ces procédés posent de sérieux problèmes écologiques. Il est donc intéressant de se tourner vers des voies alternatives pour la production à grande échelle. Comme nous le verrons dans la présentation de ce travail, l'obtention des stilbènes par la culture et l'élicitation de suspensions de cellules de vigne s'est révélé être un moyen particulièrement avantageux pour cela. Tous ces éléments sont détaillés dans une première partie.

La deuxième partie du présent manuscrit décrit le matériel et les méthodes que nous avons utilisés pour l'étude des suspensions cellulaires, tandis qu'une troisième partie aborde cette étude dans le cadre de la culture en fioles d'Erlenmeyer de 300 mL, qui est habituellement utilisée en laboratoire. Nous avons étudié deux souches différentes : la variété 41 B et la variété Concord, dont nous évoquerons les caractéristiques. Les suspensions ont été élicitées grâce au jasmonate de méthyle, molécule qui a prouvé son efficacité pour induire la synthèse des stilbènes chez la vigne. Nous avons également eu l'occasion d'examiner l'influence d'un autre éliciteur, la méthyl- β -cyclodextrine, qui permet d'atteindre des concentrations très élevées de resvératrol dans le milieu de culture. En cela, son étude paraît très intéressante pour s'orienter vers la bioproduction, particulièrement en utilisation combinée avec le jasmonate de méthyle. Plusieurs hypothèses sont avancées dans cette partie pour tenter d'expliquer l'ampleur inhabituelle que prend la synthèse, en présence de la cyclodextrine. En raison des avantages qu'elle présente, la souche Concord a finalement été retenue pour une étude plus

approfondie. Nous avons observé l'influence de différents paramètres sur la production, tels que les concentrations de la biomasse à l'inoculum, du jasmonate de méthyle et de la méthyl- β -cyclodextrine, mais encore la durée en présence de l'éliciteur. L'étude en fioles se conclut par l'examen d'un procédé alternatif pour l'extraction du resvératrol, à savoir l'emploi de résines extractives.

Dans une quatrième partie, l'étude est transposée à l'échelle de la culture en bioréacteur de 5L, premier pas vers la bioproduction. Ceci a permis un suivi détaillé, sur une plus longue durée (800 h = 33 j) de la croissance de la biomasse, de la consommation des sucres du milieu de culture, de la production du resvératrol ainsi que des variations du taux d'oxygène dissous et du pH. Le tracé des cinétiques de ces divers paramètres a permis l'élaboration de modèles que nous présenterons dans cette partie.

L'ensemble de ces travaux donne ainsi un éclairage sur les pistes à suivre pour obtenir des concentrations élevées de resvératrol, et pose les bases théoriques nécessaires au changement d'échelle vers la production industrielle.

Partie 1 : Bibliographie

I. Etat des connaissances concernant le resvératrol

i. Présence dans le monde végétal

Du point de vue chimique, le *trans*-resvératrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbène) est un composé phénolique de la famille des stilbènes (Figure 1). Au plan biochimique, il est à rapprocher des phytoalexines et phytoanticipines des *Vitaceae*.

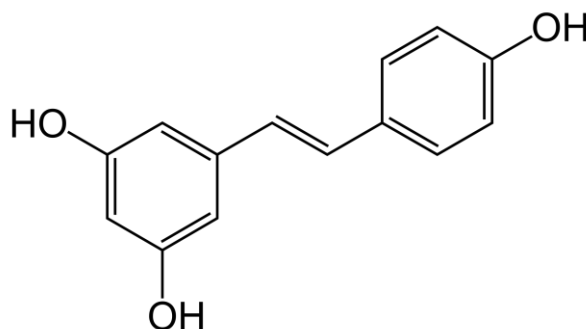


Figure 1 : Structure chimique du *trans*-resvératrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbène).

Le resvératrol est assez largement répandu dans le règne végétal. On le trouve notamment dans certains fruits rouges (framboises, mûres), dans les baies du genre *Vaccinium* (*i.e.* myrtilles et canneberges), les arachides, certains pins comme le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et le pin blanc (*Pinus strobus*) et surtout chez la vigne, particulièrement dans les baies, ce qui l'a rendu célèbre par les propriétés bénéfiques qu'il confère au vin rouge (*French paradox*).

Le resvératrol a d'abord été découvert dans l'hellébore blanche (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) en 1940 par Takaoka. C'est d'ailleurs cette découverte qui est à l'origine de son nom (Takaoka, 1940). Par la suite, il a été identifié dans les racines de la renouée du Japon (*Fallopia Japonica* ou *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.), qui contient surtout des dérivés glycosylés du resvératrol comme le picéide. Pour cette raison, il est un des principes actifs du thé Itadori (ou Ko-jo-kon), une infusion des racines de la renouée, utilisée en Asie pour ses vertus médicinales (Nonomura *et al.*, 1963).

Pour mieux comprendre l'importance et la fonction du resvératrol dans le règne végétal, il faut préciser sa place dans le métabolisme de la plante. C'est en fait un métabolite secondaire, c'est-à-dire, par définition, une molécule qui n'est pas produite par le métabolisme primaire. Le métabolisme primaire assure les fonctions de base de la plante telles que la nutrition, la respiration, la croissance, le développement ou la reproduction. Il est responsable de la synthèse des principales macromolécules qui forment l'unité du monde vivant : glucides, lipides, acides aminés et protéines, bases puriques, pyrimidiques et acides nucléiques, etc. A

l'inverse, le métabolisme secondaire est plus spécifique à des circonstances particulières rencontrées par la plante ; il lui confère ainsi des capacités d'adaptation à son environnement. Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires finaux ont souvent un poids moléculaire beaucoup plus faible mais de structures extrêmement complexes, variées et spécifiques, même s'ils sont dérivés, en réalité, des mêmes voies de biosynthèse que les premiers (Kliebenstein, 2004). Les métabolites secondaires peuvent avoir des fonctions très variées et interviennent souvent lors de moments spécifiques de la vie de la plante. Ils jouent un rôle prépondérant dans les rapports que la plante entretient avec les espèces animales, les microorganismes et les autres végétaux. Ils peuvent, par exemple, servir à éloigner les prédateurs comme les herbivores et les microorganismes pathogènes par la constitution de défenses passives (épines, cuticule...) ou la sécrétion de substances amères ou toxiques. A l'inverse, ils vont, dans d'autres circonstances, chercher à attirer certaines catégories d'animaux dans le cadre d'une relation symbiotique comme la pollinisation (pigments, arômes). Leur biosynthèse est soit constitutive du métabolisme de base, soit liée aux différents stress auxquels la plante est soumise (van Etten *et al.*, 1994). Ces stress, outre ceux liés aux autres espèces évoquées précédemment, sont encore abiotiques. On peut citer ainsi les caroténoïdes, une classe de pigments permettant de lutter contre le stress oxydant dû au froid ou à la sécheresse ou encore l'adaptation à la salinité (Shulaev *et al.*, 2008).

ii. Voie de biosynthèse

1. Description de la voie métabolique

La synthèse des stilbènes chez les plantes se fait à partir de deux acides aminés aromatiques, la phénylalanine et la tyrosine, tous deux issus de la voie des shikimates. La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) catalyse, d'une part, la réaction qui transforme la phénylalanine en acide cinnamique. Celui-ci est ensuite hydroxylé en acide *parahydroxycinnamique* (ou acide *paracoumarique*) par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H). La tyrosine est, d'autre part, directement transformée en acide *paracoumarique* par la tyrosine ammonia-lyase (TAL). Après avoir été activé en coumaroyl-CoA par la 4-coumarate-CoA ligase (4CL), l'acide *paracoumarique* peut alors réagir avec trois molécules de malonyl-CoA, issues de la voie des polymalonates. Cette dernière réaction, catalysée par la stilbène synthase (STS), aboutit à la formation du *trans*-resvératrol (Jeandet *et al.*, 2010). La voie métabolique des stilbènes a été décrite dans Donnez *et al.*, 2009 (Figure 2).

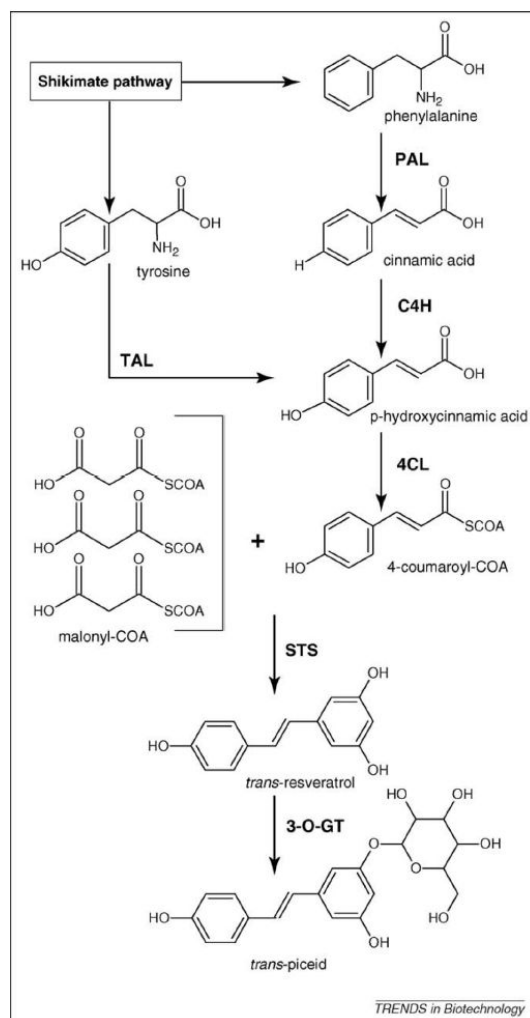


Figure 2 : Voie de biosynthèse du *trans*-resvératrol (d'après Donnez *et al.*, 2009).

Le resvératrol est le premier maillon de la synthèse de tous les autres stilbènes (Figure 3). Certaines enzymes formant ces dérivés sont déjà connues, d'autres restent à caractériser. On peut citer la 3-glucosyl-O-transférase (3-O-GT), qui produit le *trans*-picéide par glycosylation et l'O-méthyl-transférase (OMT) qui synthétise le *trans*-ptérostilbène par méthylation. D'autres enzymes restent à caractériser, les peroxydases (PER), catalysent la formation des viniférines, oligomères du resvératrol (*trans*- ϵ -viniférine, *trans*- δ -viniférine, α -viniférine). Enfin, une hydroxylation donne le *trans*-picéatannol. Même si plusieurs de ces dérivés ont été mis en évidence chez la vigne, le resvératrol reste la forme majoritaire chez cette plante (Jeandet *et al.*, 2010). Les proportions respectives des différents stilbènes peuvent varier selon la localisation dans la plante.

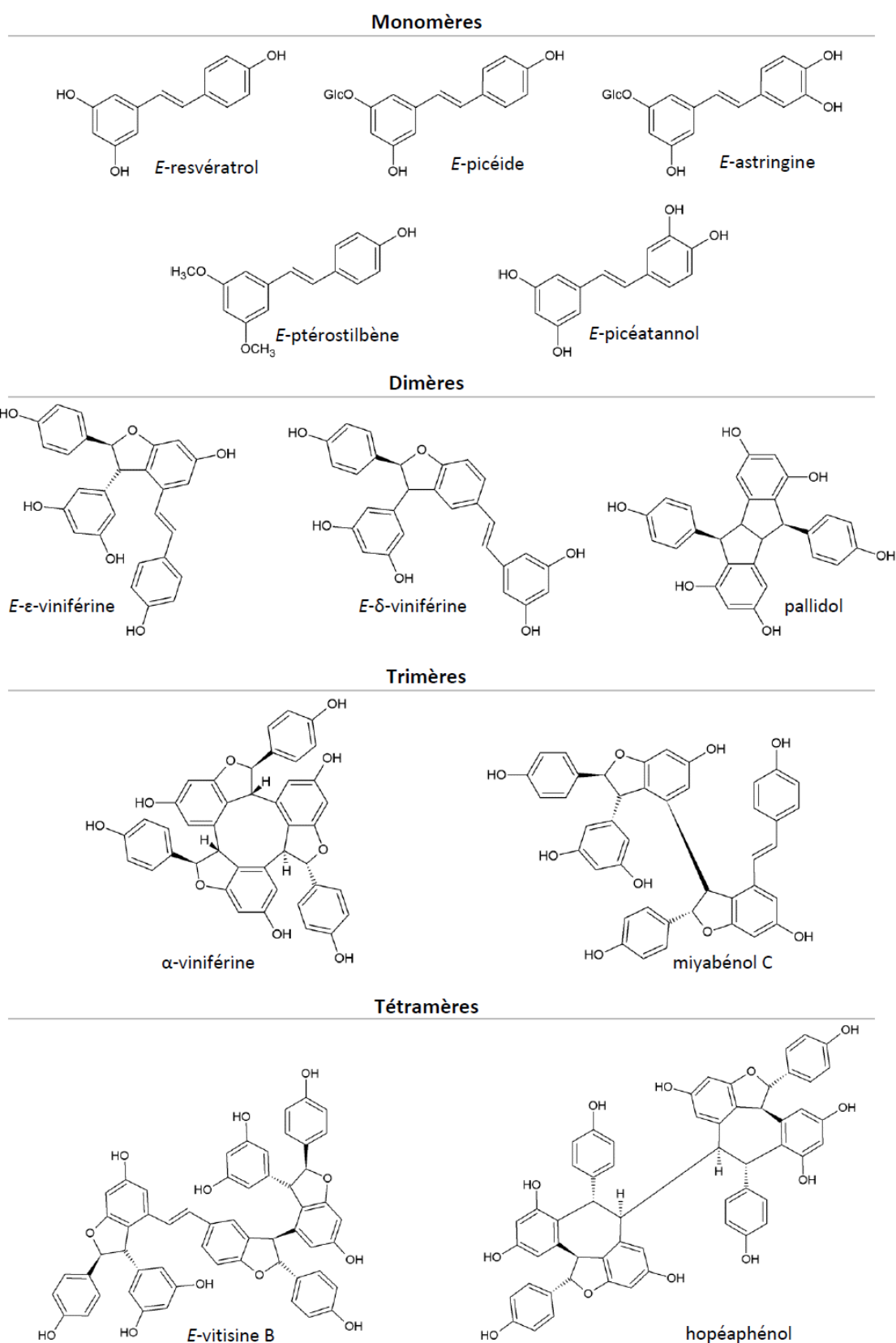


Figure 3 : Structures chimiques de quelques dérivés du resvératrol.

N. B. : Le préfixe *E*- est ici équivalent au préfixe *trans*-.

2. Liens entre pathogènes et synthèse des stilbènes

La voie de biosynthèse des stilbènes et les enzymes qu'elle met en jeu ont une importance de premier ordre pour la vigne puisque les composés qui en résultent assurent la défense de cette plante contre ses agresseurs.

Des travaux ont montré que certaines molécules issues de pathogènes déclenchent une cascade de signaux de défense qui aboutit à la synthèse des stilbènes chez la vigne (Vandelle *et al.*, 2006). Ce mécanisme passe par l'activation et l'expression des gènes de la PAL et de la STS (Jeandet *et al.*, 2010). D'autres études mettent en évidence, chez la vigne, un nombre particulièrement élevé de gènes codant pour la STS. 43 gènes ont ainsi été identifiés dont 20 au moins sont exprimés après infection par des pathogènes, ce qui tend à montrer que ces copies sont fonctionnelles (Jaillon *et al.*, 2007). Ceci semble indiquer que les mécanismes d'induction de la synthèse du resvératrol sont très complexes et qu'en réduire l'examen à l'activation des gènes de la STS n'est pas réaliste.

On peut noter que la STS, qui joue un rôle capital dans la synthèse du resvératrol, est en compétition avec la chalcone synthase (CHS). En effet, cette dernière, dont la structure est très similaire, utilise exactement les mêmes substrats (Chong *et al.*, 2009 ; Jeandet *et al.*, 2010). Le produit de la réaction, la chalcone, est en revanche bien différent des stilbènes ; c'est un composé en C15 précurseur d'une autre classe de métabolites, les flavonoïdes. La STS est ainsi un pivot essentiel qui permet d'orienter le métabolisme secondaire des polyphénols vers l'une de ces deux voies (stilbènes *vs.* flavonoïdes).

Le nombre élevé de gènes de la STS n'est pas la seule particularité de cette enzyme chez la vigne. L'expression des gènes semble aussi se produire en deux temps : les ARNm de la STS apparaissent d'abord 6 à 12 heures après la mise en présence de l'éliciteur, puis une deuxième accumulation se manifeste quelques heures après (Jeandet *et al.*, 2010). Dans certaines conditions, le resvératrol, lui-aussi, s'accumule dans la plante en deux vagues successives (Wang *et al.*, 2010). L'éllicitation des cellules de vigne en laboratoire montre que la première accumulation du métabolite ne survient qu'une dizaine d'heures après la mise en présence de l'éliciteur. Une synthèse aussi précoce ne peut être expliquée par la synthèse *de novo* de la STS. Celle-ci serait plutôt réalisée par l'enzyme déjà présente dans la plante auparavant. Le resvératrol serait donc produit chez la vigne en deux phases : d'abord par une faible quantité d'enzyme perpétuellement présente dans les tissus et activée par la détection de l'agresseur, puis une production beaucoup plus massive interviendrait grâce à la STS synthétisée par éllicitation. Nous verrons que ces remarques cinétiques sont d'un grand intérêt pour mieux maîtriser la production des stilbènes en laboratoire.

Outre les aspects cinétiques de la synthèse du resvératrol, on peut chercher à connaître sa localisation dans la plante. On sait que le resvératrol est principalement présent dans le phloème de la tige, dans les bourgeons axillaires et dans les racines (Wang *et al.*, 2010). Concernant la localisation de la STS, on la retrouve surtout dans les feuilles, dans le pétiole et dans la tige autour des vaisseaux conducteurs de phloème et de xylème et dans le mésocarpe et l'exocarpe des baies (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). Le resvératrol serait

synthétisé dans la partie aérienne puis acheminé par le phloème dans toute la plante, jusqu'aux racines (Wang *et al.*, 2010).

Au niveau cellulaire, la STS est présente dans la paroi, dans des vésicules cytoplasmiques de différentes tailles, dans la vacuole, dans le cytoplasme et même dans le noyau (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). Quant au resvératrol, on le trouve aussi dans la paroi cellulaire et dans le cytoplasme. Sa présence dans des structures particulières, « les vésicules cytoplasmiques » décrites par Donnez (2010), à l'instar de la STS, laisse penser que c'est dans ces structures qu'aurait lieu sa synthèse, ou du moins son accumulation active avant l'excrétion hors de la cellule par transporteurs actifs. Des quantités importantes de resvératrol seraient ainsi mises en réserve dans ces « vésicules » attendant l'instant propice pour déclencher la réaction de défense effective. Le resvératrol est en revanche absent de la vacuole, ce qui est cohérent non seulement avec sa nature plutôt apolaire, mais encore avec sa fonction de défense qui le rend utile essentiellement à l'extérieur de la cellule ou en périphérie de celle-ci. Ce n'est pas le cas du picéide, dérivé glucosylé, donc plus hydrophile, qui se trouve dans la vacuole et semble être une forme de stockage.

iii. Le resvératrol : une molécule d'intérêt pour l'homme

L'identification du resvératrol dans le vin rouge (Siemann et Creasy, 1992) a lancé la carrière prometteuse de la molécule. Son succès est devenu grandissant, particulièrement par la découverte de son implication très probable dans ce qu'il est convenu d'appeler le « French paradox » (Frankel *et al.*, 1993). Cette énigme du paradoxe français est le résultat d'une étude américaine des années 1980, comparant une population américaine à une population du Sud-Ouest de la France (Renaud et de Lorgeril, 1992). Ces populations avaient toutes les deux un régime riche en graisses animales ; pourtant, paradoxalement, la population française présentait un taux de maladies cardiaques beaucoup plus bas. A l'époque, cette différence a été expliquée par la consommation régulière de vin rouge de la population française. La mise en évidence d'une corrélation entre la concentration en resvératrol dans le vin rouge et ses supposés effets sur la santé a été publiée (Jeandet *et al.*, 1995 a, b ; Stervbo *et al.*, 2007). Le resvératrol a, depuis, éveillé un tel enthousiasme que de très nombreuses études ont été publiées concernant ses propriétés médicales, notamment sur la santé animale (Kopp, 1998). Même si les recherches restent à poursuivre, la démonstration de son efficacité dans la prévention de nombreuses maladies en fait également une molécule de premier plan dans le domaine de la santé humaine.

1. Utilisations en cosmétique

L'approche marketing, concernant l'utilisation du resvératrol dans le domaine cosmétique, est essentiellement fondée sur son origine naturelle comme constituant de la vigne et sur la réputation que lui confère le « French paradox ». Au niveau industriel, le resvératrol est actuellement obtenu par extraction par solvant, à partir des sarments de vigne. Parmi les sociétés qui le commercialisent dans leurs produits, on peut citer Dior, du groupe LVMH, et Caudalie. Celles-ci ont développé un important savoir-faire autour des procédés d'extraction, de purification et de stabilisation de la molécule et ont ainsi déposé un certain nombre de brevets dans ce domaine (Vercauteren *et al.*, 2003 (Caudalie); Andre et Renimel, 2010 (LVMH Recherche)). Au plan international, la société américaine Estée Lauder a aussi misé sur le succès du resvératrol en l'incluant dans la formulation de ses produits. On peut remarquer que, si l'extraction à partir de sarment permet l'obtention de quantités satisfaisantes, elle consomme en revanche beaucoup d'énergie et surtout de grandes quantités de solvants, substances très polluantes (Andre et Renimel, 2010). C'est là, la principale critique que l'on peut opposer à ces procédés, ce qui devrait encourager les sociétés industrielles, par souci de leur image, à s'orienter à l'avenir vers des alternatives plus respectueuses de l'environnement (Donnez *et al.*, 2009).

2. Utilisations dans les compléments alimentaires

Dans le domaine nutraceutique, la promotion des vertus du resvératrol s'appuie également sur ses propriétés comme molécule naturelle de la vigne et sur les bienfaits qu'il apporte par sa présence dans le vin rouge. Pourtant, pour cet usage, le resvératrol n'est généralement pas extrait de la vigne mais de la renouée du Japon (*Fallopia Japonica* ou *Polygonum cuspidatum*) (Beerling *et al.*, 1994), de laquelle il a été isolé en 1963, soit bien avant d'être découvert chez la vigne (1976) et dans le vin (1992). Cette plante en contient de très grandes quantités dans ses racines qui ont la forme de longs rhizomes extrêmement vivaces. Les propriétés médicinales de cette plante sont d'ailleurs connues depuis des siècles en Asie, particulièrement en Chine et au Japon où ses racines sont utilisées sous forme d'infusion dans le traitement des maladies cardio-vasculaires et comme anti-inflammatoire (thé d'itadori).

En revanche, le resvératrol est loin de constituer la majeure partie des stilbènes présents dans la renouée du Japon. Celle-ci contient surtout des dérivés glycosylés comme le picéide. La quantification du resvératrol et du picéide dans des extraits secs de renouée montre que ceux-ci contiennent moins de 0,2 % (m/m) de resvératrol et plus de 1,3 % (m/m) de picéide (Zhao *et al.*, 2005). Il est alors intéressant de se poser la question de l'hydrolyse des dérivés glycosylés du resvératrol, réalisable par digestion enzymatique par des β -glucosidases (Waterhouse *et al.*, 1994). Il existe d'autres méthodes d'hydrolyse comme la fermentation de la renouée par *Rhizopus microsporus* qui permet de transformer le picéide en resvératrol (Tian *et al.*, 2008) ou l'hydrolyse alcaline. Par ailleurs, des études ont montré qu'on pouvait séparer et purifier le resvératrol et le picéide de la renouée par chromatographie, en utilisant une

combinaison de solvants constituée de pétrole brut léger, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau. On obtient alors des extraits avec une pureté supérieure à 95 % (Chu *et al.*, 2005). Si l'on veut comparer toutes ces techniques, il faut bien considérer que d'une part la digestion enzymatique est un procédé très coûteux et lourd à mettre en place à une échelle industrielle et que d'autre part l'hydrolyse alcaline est très polluante et se confronte ainsi au respect des normes écologiques.

La renouée du Japon possède un autre inconvénient, non négligeable. Cette plante originaire d'Asie a été introduite en Europe au XIX^{ème} siècle pour le fourrage et l'ornement, mais elle s'est rapidement naturalisée et a envahi de larges zones géographiques, particulièrement sur les rives des cours d'eau. Dans les écosystèmes où elle s'implante, sa croissance très rapide et son feuillage large et sombre lui permettent de prendre le dessus sur les espèces endémiques ; ceci est accentué par le fait qu'elle ne possède, en Europe et en Amérique, aucun prédateur naturel. Son introduction constitue aujourd'hui une véritable catastrophe écologique puisque son éradication semble quasiment impossible. Ses rhizomes sont en effet extrêmement vivaces et très difficiles à arracher. La moindre partie laissée en terre (quelques cm) lui permet de contaminer de nouveau un territoire. De plus, les rhizomes peuvent rester en dormance et survivre en profondeur sans faire de rejet pendant plus de dix ans. Ceci l'a classé par l'Union internationale pour la conservation de la nature parmi les cent espèces les plus préoccupantes.

Pourtant, la renouée reste, pour le moment, la principale source de resvératrol. Il paraît donc judicieux de se tourner vers d'autres alternatives si l'on veut envisager la production du resvératrol à grande échelle.

3. Propriétés biologiques

a. Activité contre l'athérosclérose

L'athérosclérose ou athérome (encore appelée artériosclérose) est une atteinte des grosses artères. Dans cette maladie, des accumulations complexes (lipides, tissus adipeux, composants du sang, dépôts calcaires et d'autres minéraux) viennent se former sur la paroi des vaisseaux et peuvent, à terme, provoquer leur obstruction ou du moins gêner considérablement la circulation sanguine et favoriser le risque d'embolie (Lusis, 2000). Les artères les plus touchées sont l'aorte, les artères coronaires, les carotides et les artères fémorales. Le premier stade de la maladie est un simple dépôt lipidique dans la paroi de l'artère. Si les conditions sont favorables (alimentation, mode de vie, facteurs génétiques ou autres maladies), ce premier dépôt peut grossir par accumulation de graisse, de fibrinogène (protéine permettant la coagulation sanguine), de cellules sanguines et de calcium. Ceci aboutit à la formation de ce qu'on appelle « plaque d'athérome ».

Ce processus peut avoir des conséquences dramatiques si on le laisse évoluer sans surveillance. Le ralentissement de la circulation sanguine, qu'il finit par produire, conduit

inévitablement à des problèmes d'insuffisance cardiaque. Par ailleurs, la possible formation d'un caillot – coagulation anormale du sang causée par les plaquettes et le fibrinogène – peut considérablement augmenter le risque d'accident vasculaire cérébral, d'infarctus du myocarde ou d'embolie pulmonaire (Lusis, 2000).

L'athérosclérose est un véritable problème de santé publique puisqu'elle est la première cause de mortalité dans les pays occidentalisés, la première cause responsable des maladies coronariennes et une cause majeure d'invalidité. Toute possibilité de réduire son apparition constitue donc l'objet de recherches assidues. Le resvératrol pourrait se présenter, dans ce domaine, comme une molécule particulièrement intéressante car des travaux ont montré le lien entre sa présence dans le vin rouge et son influence cardioprotectrice, ce qui tend à expliquer le « French paradox ». En effet, le resvératrol permettrait une régulation de la synthèse des molécules qui induisent l'agrégation plaquettaire, ce qui enrayerait le processus de coagulation anormale dont il a été question ci-dessus. Il a aussi la capacité de favoriser la vasodilatation, diminuant ainsi les problèmes d'hypertension ou d'obstruction des vaisseaux. Une étude le cite aussi comme un facteur qui inhibe l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), souvent qualifiées de *mauvais cholestérol* (Frankel *et al.*, 1993).

b. Activité contre le vieillissement cellulaire

En 2004, certains travaux ont mis en évidence le lien entre le resvératrol et le ralentissement du vieillissement cellulaire. On savait qu'une restriction calorique dans le régime alimentaire tend à accroître l'espérance de vie, mais le phénomène mis en cause est longtemps resté mystérieux. Chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, on a constaté que cela nécessitait la présence d'une enzyme particulière, nommée Sir2, membre de la famille des sirtuines. Ces dernières sont une classe d'enzymes qui agissent sur les histones, protéines autour desquelles l'ADN est compacté dans les chromosomes. En retirant un groupement acétyle sur les histones, elles leur permettent d'embobiner plus étroitement l'ADN. Ceci a une grande importance car l'expression de l'ADN est régulée par son acétylation et sa désacétylation. Les sirtuines régulent ainsi l'expression des gènes, influençant par ce biais le métabolisme cellulaire. Leur nom provient de *Silent mating type Information Regulation Two*, le gène responsable de la régulation cellulaire chez les levures. En 2005, Bordone et Guarente ont fait le lien entre restriction calorique, sirtuines et longévité. De plus, il a été montré que le resvératrol permet l'activation des sirtuines chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* et allonge ainsi l'espérance de vie de ces animaux sans réduire leur fécondité (Wood *et al.*, 2004). Par cette propriété, le resvératrol peut allonger la durée de vie des levures et pourrait favoriser la survie des cellules humaines.

De nombreuses autres études ont été menées à ce sujet : Howitz *et al.* en 2003 chez *Saccharomyces cerevisiae*, Bauer *et al.* en 2004 chez *Drosophila melanogaster* ou encore chez les vertébrés de courte durée de vie comme la souris (Baur *et al.*, 2006 ; Valenzano *et al.*, 2006 ; Pearson *et al.*, 2008 ; Barger *et al.*, 2008). Plus précisément, le resvératrol pourrait retarder les effets du vieillissement (Baur et Sinclair, 2008).

c. Activité contre certains cancers

La lutte contre le cancer apparaît aussi comme une perspective d'application pour le resvératrol. Ses effets inhibiteurs sur la cancérogénèse sont maintenant prouvés sur plusieurs modèles animaux (Delmas *et al.*, 2006). Il empêche la prolifération des cellules (études *in vitro* sur des lignées cellulaires dérivées de tumeurs) et intervient à différents stades de la maladie. En effet, la cancérogénèse se développe généralement en trois phases : premièrement la formation de la tumeur, processus par lequel une cellule saine se transforme en cellule tumorale, favorisé par les agents mutagènes ; deuxièmement la promotion de la tumeur, au cours de laquelle différents facteurs permettent aux cellules-filles de la cellule tumorale initiale de résister à leur élimination normale et de se multiplier ; troisièmement la progression de la tumeur qui voit augmenter la vitesse de répllication des cellules cancéreuses et l'invasion de l'organisme hôte. Le resvératrol est en fait capable de faire obstacle à chacune de ces étapes. Il prévient la formation de la tumeur en fixant les radicaux libres responsables de l'altération de l'ADN et en activant des enzymes détoxifiantes (Delmas *et al.*, 2006). Il inhibe aussi la promotion de la tumeur en régulant le métabolisme des polyamines et, enfin, la progression de la tumeur par la régulation du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Delmas *et al.*, 2006).

L'action du resvératrol contre le cancer a aussi été précisée ailleurs dans la littérature (Kundu et Surh, 2008). Il a pour cible plusieurs composants du réseau de signalisation intracellulaire comme des médiateurs pro-inflammatoires, des régulateurs de la mort cellulaire et des inducteurs de l'angiogénèse et des métastases. Son influence s'exerce en modifiant, en amont, la combinaison des kinases (messagers cellulaires) et des facteurs de transcription (molécules permettant la copie de l'ADN en ARN).

Une administration intratumorale, péri-tumorale ou intrapéritonéale de resvératrol bloque significativement la croissance de la tumeur *in vivo* et entraîne l'apoptose chez des souris ayant subi la greffe d'une tumeur. L'administration de resvératrol par sonde alimentaire réduit la formation de foyers de cryptes aberrantes (FCA) et de tumeurs dans le colon de rats traités à la diméthylhydrazine (DMH). Le resvératrol administré dans l'eau de boisson (0.1 %) entraîne 70 % de réduction de la cancérogénèse dans l'intestin de la souris. Tous ces exemples montrent à quel point l'influence bénéfique du resvératrol contre le cancer est déjà démontrée, ce jusqu'au modèle animal (Kundu et Surh, 2008).

d. Activité contre les infections virales

La lutte contre les infections virales est un autre domaine où le resvératrol est impliqué. Là encore, les effets protecteurs de celui-ci sont liés aux modulations qu'il exerce sur les mécanismes de signalisation cellulaire (cf. I.iii.3.c). Lors d'une infection par le virus de la

grippe, une série d'activation en chaîne des kinases se produit, ceci transmettant des signaux à l'intérieur de la cellule. Dans ce processus, le resvératrol interviendrait de la même manière que des inhibiteurs de kinase, couramment employés. Ceci a pour effet de bloquer le transport, entre le noyau et le cytoplasme, du matériel nécessaire à la synthèse des protéines virales par la cellule hôte, enrayant ainsi le cycle de réplication du virus (Palamara *et al.*, 2005).

Les travaux menés sur ce sujet ont cherché à corréler ces effets avec l'activité anti-oxydante du resvératrol. Dans cette perspective, on réalise le suivi de la concentration en glutathion, une molécule intervenant dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme. La diminution de la forme réduite du glutathion (GSH) dans la cellule-hôte est souvent une conséquence directe des infections virales. Pour cette raison, beaucoup de substances anti-oxydantes procurent de puissants effets antiviraux. Le resvératrol, qui permet par ailleurs l'élimination des radicaux libres, aurait pu être un bon candidat pour préserver le capital réducteur (GSH). L'étude montre cependant qu'il a plutôt l'effet inverse dans ce cas puisque ce serait la forme oxydée du resvératrol qui réagirait avec le GSH. Ce constat indique que la régulation redox de la cellule par le resvératrol est plus complexe qu'on l'avait imaginé au départ et doit faire l'objet d'une recherche plus poussée. (Palamara *et al.*, 2005).

L'intérêt s'est porté tout particulièrement sur la lutte contre le VIH. En augmentant le taux intracellulaire de NAD⁺ et en activant les sirtuines (cf. I.iii.3.b), le resvératrol permettrait de freiner la réplication du VIH (Zhang *et al.*, 2009).

e. Activité contre l'obésité et le diabète

Le resvératrol a aussi une activité protectrice contre les maladies alimentaires que sont l'obésité et le diabète. C'est de nouveau son influence sur les sirtuines qui entre en jeu. L'activation de gènes de régulation du métabolisme accroît l'oxydation des acides gras dans les mitochondries. Par ce biais, il ralentit la formation des tissus adipeux et favorise même la dégradation des lipides (Pillarsetti, 2008).

f. Activité contre la dégénérescence des neurones

D'autres bienfaits sont apportés par le resvératrol contre les maladies nerveuses. Il a montré une efficacité dans des modèles *in vitro* contre l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique et les lésions nerveuses. Cependant, ceci reste à prouver *in vivo* et sur l'homme (Rocha-Gonzalez *et al.*, 2008).

4. Molécule de défense végétale

a. Mécanismes de défense chez les plantes

Les moyens de défense que les plantes ont développés sont nombreux et très diversifiés. La cause principale de ce phénomène réside dans la co-évolution qui a eu lieu entre les végétaux et leurs agresseurs, à savoir les virus, les champignons, les bactéries, les vers, les insectes ou encore les mammifères. Le processus de co-évolution est une interaction réciproque entre l'évolution des plantes et celle des pathogènes qui advient par cycles (Rausher, 2001). Ainsi, différentes étapes ont été franchies dans l'élaboration de la réponse aux agresseurs et l'appareil de défense des végétaux s'est sophistiqué au cours des millions d'années.

Parmi tous les mécanismes existants, on peut distinguer d'une part des mécanismes de défense passifs qui se rapportent à la constitution physique (perméabilité, digestibilité) ou chimique (répulsion, toxicité) de la plante et d'autre part des mécanismes de défense actifs qui déclenchent chez la plante une série de réactions suite à la détection d'une présence nuisible. L'avantage de ces dernières est qu'elles ne se produisent qu'en cas de nécessité et sont donc moins coûteuses pour les végétaux. Ces réactions peuvent être d'ordre morphologique ou d'ordre métabolique ; elles peuvent encore être locales ou systémiques.

- Défenses constitutives

Défenses physiques

La cuticule

La première barrière que les plantes opposent à leurs agresseurs est leur épiderme. Celui-ci est le tissu le plus externe des parties aériennes de la plante. Il permet au végétal de prévenir les dommages mécaniques et de lutter contre la déshydratation. Les cellules qui le composent forment un tissu très serré. Leur paroi est épaisse et recouverte de cires, composés fortement hydrophobes (mélange d'alcane, d'esters, d'acides, alcools et aldéhydes gras), enrobées de cutine, un polyester de nature lipidique en C16 ou C18, également hydrophobe. Cette matrice extracellulaire forme ce qu'on appelle la cuticule. Très efficace pour limiter les pertes d'eau, la cuticule n'est cependant pas complètement imperméable et des travaux ont montré que sa perméabilité à certaines substances émises par les pathogènes (*Botrytis cinerea*) peut favoriser une réponse adaptée de la plante chez *Arabidopsis thaliana* (Bessire *et al.*, 2007). Cette première barrière naturelle est donc déjà très sélective et interagit avec les mécanismes de défense induits que nous allons aborder par la suite.

Les trichomes

Les trichomes sont de fines excroissances présentes sur l'épiderme des plantes. Ils peuvent être de types variés, les plus habituels étant l'écaille ou le poil (Esau, 1965). C'est la présence ou l'absence de ces structures sur l'épiderme qui fait dire qu'il est respectivement pubescent ou glabre. Leur présence peut conférer plusieurs avantages à la plante : ils gênent les herbivores dans leur consommation des végétaux par les blessures ou l'irritation qu'ils provoquent. Leur protection ne se limite pas aux stress causés par les espèces animales : ils permettent aussi de se défendre contre de nombreux stress abiotiques (Esau, 1965). Ils peuvent ainsi protéger la plante du gel en formant une couche d'air entre les cellules de l'épiderme et l'eau gelée. De la même manière, ils peuvent aider à lutter contre la sécheresse en limitant les phénomènes de convection de l'air à la surface de la plante. Leur densité peut encore être suffisamment couvrante pour protéger les tissus superficiels des dégâts engendrés par les rayons UV. Enfin, ils peuvent aussi favoriser la rétention de l'eau de pluie à la surface des feuilles pour permettre à la plante de multiplier ses ressources en eau. Les trichomes peuvent être glandulaires ou simples, selon qu'ils produisent ou non des sécrétions. Les trichomes glandulaires accumulent de grandes quantités de métabolites dans l'espace situé entre la paroi de leurs cellules glandulaires et la cuticule (Wagner, 1991). Ceci permet à la plante de former une réserve de sécrétions dans un compartiment qui est virtuellement à l'extérieur de l'organisme. Ces structures accumulent non seulement des composés huileux phytotoxiques (terpénoïdes) mais ils exposent encore ces substances sur la première ligne de défense de la plante (Wagner, 1991). Les terpénoïdes, par exemple, ont souvent des propriétés antibactériennes. Ils peuvent aussi, selon leur nature, attirer, repousser, intoxiquer ou déclencher l'alarme chez les insectes. Ces substances peuvent être relarguées suite à un contact perçu comme hostile par la plante. Ceci montre les liens entre les structures physiques végétales, d'une part, et la défense chimique et les défenses induites d'autre part, qui seront abordées ensuite. Les trichomes simples permettent aussi une défense efficace contre les maladies cryptogamiques. Ils empêchent la germination des spores et le contact du tube germinatif avec la surface de la feuille chez *Uromyces appendiculatus* (agent responsable de la rouille du haricot). Les spores de ce dernier sont très hydrophobes et lorsqu'elles sont immergées dans l'eau, elles tendent à flotter à la surface. Si la germination a lieu, le tube ne pourra jamais atteindre et ainsi pénétrer la feuille (Stenglein *et al.*, 2005).

La paroi cellulaire

Les cellules végétales sont protégées extérieurement par une paroi pectocellulosique. Cette paroi se compose d'une armature de fibres de cellulose et d'hémicellulose, comblée par un ciment de pectines, des glycoprotéines, des enzymes, de l'eau, des ions en solution ou associés à la cellulose et des protéines riches en hydroxyproline qui la rendent moins extensible. Elle est à la fois rigide pour structurer les tissus et élastique pour autoriser la croissance et la division cellulaire. Les constituants de la paroi varient selon l'espèce, le type cellulaire et même les cellules avoisinantes. En outre, le stade de développement et l'exposition à l'un des nombreux stress abiotiques ou biotiques accroissent ces variations dans

sa composition ou sa structure. La nature dynamique de la paroi peut s'adapter aux différentes fonctions élémentaires, comme la croissance, le développement, la perception de l'environnement, la signalisation, la communication intercellulaire et le transport sélectif des métabolites aux interfaces. Elle joue un rôle important dans la cicatrisation, notamment via une glycoprotéine, l'extensine : lorsqu'une plante est blessée, une production accrue de cette protéine et son haut degré de réticulation conduiraient à rendre la paroi plus impénétrable, empêchant ainsi l'infection par des pathogènes (Showalter, 1993). Par ailleurs, les macromolécules de la paroi sont pour une bonne part difficiles à dégrader (cellulose, lignine, silice) car les enzymes permettant leur hydrolyse sont peu répandues. Cet aspect complique la digestion et réduit le nombre ou l'appétit des ennemis de la plante (Massey *et al.*, 2007).

Défenses chimiques

Au-delà des structures physiques opposant un premier obstacle aux pathogènes, les plantes ont développé tout un arsenal de molécules, produites par le métabolisme secondaire et assurant une défense d'ordre chimique. Parmi ces métabolites, on trouve principalement les phytoalexines et les phytoanticipines. Les phytoalexines sont définies généralement comme des composés antibiotiques de faible poids moléculaire, qui sont à la fois synthétisés et accumulés par la plante après exposition à des micro-organismes (Paxton, 1980, 1981). Les phytoanticipines se distinguent des phytoalexines en ce qu'elles sont présentes dans les tissus avant l'infection microbienne ou produites pendant l'infection à partir de constituants préexistants (van Etten *et al.*, 1994).

Les molécules de défense incluent des substances toxiques comme les polyphénols, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Des exemples sont donnés par les plantes vénéneuses les plus connues : la cigüe, la digitale, l'aconit ou la belladone démontrent à quel point les substances naturelles peuvent défendre les plantes, au moins contre les mammifères (Wittstock et Gershenzon, 2002). Mais la synthèse de ces molécules présente plusieurs inconvénients pour la plante : elle est d'abord coûteuse en ressources qui ne seront pas utilisées pour assurer les fonctions primaires ; la plante accumule des toxiques qui représentent un danger pour elle-même ou pour l'écosystème qui l'entoure (Wittstock et Gershenzon, 2002). Nous verrons dans la partie qui suit que les plantes ont développé des stratégies pour contourner ces inconvénients, notamment en ne déclenchant la synthèse qu'au moment de l'attaque. Mais ceci représente un risque pour le végétal : celui d'être détruit avant d'avoir eu le temps d'assurer sa défense. Pour cette raison, les défenses constitutives restent un complément indispensable aux défenses induites.

- Défenses induites

Pour optimiser leurs défenses et les rendre plus pertinentes devant l'attaque des agresseurs, les plantes ont mis en place des mécanismes plus délimités dans le temps, plus localisés et plus spécifiques du pathogène. Ce type de défense se déroule en trois phases : la reconnaissance, la signalisation et la défense.

La reconnaissance

C'est l'étape clef pour la mise en œuvre d'une résistance. La plante repère des molécules correspondant à une infection avant que le pathogène ne deviennent virulent, c'est-à-dire avant sa multiplication dans l'organisme végétal. Ces molécules correspondent soit à des constituants du pathogène lui-même (MAMP pour Microbe-Associated Molecular Pattern), soit à des produits de dégradation des tissus de la plante par le pathogène (MIMP pour Microbe-Induced Molecular Pattern). Les MAMPs correspondent donc au non-soi et les MIMPs au soi modifié. Les MAMPs sont des molécules structurales issues de la surface de la plupart des pathogènes ; on peut citer comme exemples les constituants de la paroi cellulaire des champignons (chitine, glucanes, protéines ou glycoprotéines), les lipopolysaccharides des bactéries (LPS) ou la flagelline, protéine majoritaire structurale du flagelle des bactéries (Jones et Takemoto, 2004). Les MAMPs et les MIMPs sont aussi appelés éliciteurs généraux. Ce type de reconnaissance est appelé immunité non-spécifique ou immunité innée primaire et permet d'avoir pour cible de nombreux pathogènes.

L'efficacité de la reconnaissance dépend de sa rapidité. Pour cette raison, les plantes possèdent un système de surveillance formé de protéines postées à différents niveaux cellulaires : paroi, membrane cellulaire, cytoplasme, noyau. La détection doit se faire à de très faibles concentrations en éliciteur ; pour cela, les récepteurs doivent avoir une très forte affinité avec les éliciteurs, d'où l'importance de la structure tridimensionnelle de ces molécules. Ces récepteurs sont appelés PPRs (Pattern Recognition Receptors).

Nous avons déjà évoqué la co-évolution qui a eu lieu entre plantes et pathogènes et qui a permis la complexification du processus de défense. Par ce phénomène, les pathogènes ont à leur tour, cherché à contourner les systèmes de protection de la plante. Certains parviennent à les bloquer par des effecteurs, depuis les voies de signalisation jusqu'à l'activation des gènes de défense, exposant la plante à l'infection. Par un nouveau cycle co-évolutif, la plante contre-attaque en mettant cette fois en œuvre une reconnaissance exacte de l'effecteur. Cette reconnaissance est appelée immunité spécifique ou immunité innée secondaire. Un autre cycle co-évolutif peut suivre et ainsi de suite.

La signalisation

La reconnaissance de l'éliciteur est immédiatement suivie d'une cascade de mécanismes qui vont permettre la transmission de l'information au sein de la cellule, puis de toute la plante. Ceci inclut la phosphorylation réversible de protéines, des changements dans l'activité des protéines de la membrane plasmique, des modulations dans les concentrations du calcium libre dans le cytoplasme et le noyau et la production de monoxyde d'azote et de dérivés réactifs de l'oxygène qui régulent de nombreux processus. Ces événements surviennent de quelques minutes à quelques heures après la détection de l'éliciteur. Les voies de signalisation peuvent différer par leur cinétique et leur intensité selon la nature du stimulus. L'enchaînement des processus permet une amplification du signal et assure la spécificité de la réponse. Les espèces chimiques, ainsi produites ou mobilisées, vont permettre l'interconnection des fonctions cellulaires. Il s'ensuit l'activation de gènes, la synthèse d'hormones et des changements métaboliques.

Les phytohormones produites n'ont pas toutes le même rôle. Des études sur différents systèmes plante-pathogène ont montré que les plantes activaient des voies de défenses distinctes impliquant différents régulateurs selon le type de parasite (Ton *et al.*, 2002). Les réactions de défense associées à l'éthylène (ET), à l'acide jasmonique (JA) et à son dérivé méthylé, le méthyljasmonate (MeJA) semblent être activées par les nécrotrophes tandis que celles qui mettent en jeu l'acide salicylique (SA) sont déclenchées par les biotrophes (Thomma *et al.*, 2001). D'autres études indiquent que les voies correspondant à ET ou JA et SA s'inhibent l'une l'autre, suggérant qu'elles interfèrent et permettent l'adaptation de la réponse au type de pathogène (Reymond et Farmer, 1998 ; Spoel *et al.*, 2003).

Hormis l'immunité innée, il existe un autre mécanisme qui permet à la plante d'améliorer sa propre défense au fil des attaques. Dans les années 1960, Ross montra que des plants de tabac, attaqués par le virus de la mosaïque du tabac (TMV), développèrent par la suite une résistance accrue aux infections secondaires dans d'autres tissus. Cette expansion de la résistance à travers les tissus fut nommée réponse systémique acquise (SAR) (Ross *et al.*, 1961). La résistance conférée par ce phénomène est durable, parfois acquise à vie par la plante, et efficace contre un large éventail de pathogènes incluant virus, bactéries, champignons et oomycètes (Ryals *et al.*, 1996 ; Sticher *et al.*, 1997).

Cette première découverte fut le début d'une longue série de recherches pour élucider les mécanismes de la SAR. Chez le tabac, il fut montré que des injections de SA amélioraient la résistance au TMV (van Loon et Antoniw, 1982 ; White, 1979), amenant à penser que le SA pourrait agir comme un signal endogène. Dans de nombreuses espèces de plantes, le SA joue un rôle indubitable, aussi bien dans la réponse locale que dans la SAR (Durrant et Dong, 2004). La SAR est particulièrement efficace contre les pathogènes sensibles aux réactions de défense associées au SA (Ton *et al.*, 2002), ce qui conduit à penser que la SAR constitue une amélioration systémique de la résistance liée au SA. Selon une opinion couramment répandue, le SA est principalement transporté sous la forme de son ester méthylique, le salicylate de méthyle (MeSA). Cette possibilité a longtemps été ignorée, bien que suggérée au départ par Vladimir Shulaev et ses collaborateurs en 1997 (Shulaev *et al.*, 1997). En fait le MeSA est

beaucoup plus volatile que le SA. C'est pour cette raison qu'il a été proposé comme médiateur de la résistance induite sur de longues distances. Contrairement au SA qui régule la résistance à travers le système vasculaire, le MeSA est relargué par les feuilles endommagées et s'échappe dans la phase gazeuse. Il en est exactement de même pour le MeJA, comparativement au JA. Le principal bénéfice de cette voie de signalisation est qu'elle s'affranchit des restrictions spatiale et temporelle du système vasculaire. A des doses aussi faibles, les signaux aéroportés peuvent préparer les organes à distance pour une réaction ultérieure, sans pour autant induire tout de suite la défense. Cet amorçage ajoute une dimension supplémentaire à l'équilibre subtil qui existe entre la réaction de défense et des processus concurrents comme la croissance et la reproduction.

Les réponses de défense

La réponse hypersensible

L'une des solutions les plus radicales que trouve la plante pour parer l'attaque de l'agresseur est la réponse hypersensible (HR). Celle-ci consiste à déclencher la mort rapide des cellules voisines du point d'infection. Elle a pour but d'éviter la croissance de l'agent infectieux au niveau local et sa propagation dans le reste de la plante. Différents médiateurs sont impliqués dans le déclenchement de cette mort cellulaire sous des conditions bien définies, parmi lesquels le SA, le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Le NO coopère avec le SA pour induire la mort cellulaire programmée et activer les défenses (Durner *et al.*, 1998). Une augmentation de la production du NO est suffisante pour induire la mort cellulaire chez des cultures d'*Arabidopsis thaliana* (Clarke *et al.*, 2000). L'hypothèse a été émise que l'équilibre entre les concentrations en NO intracellulaire et en H₂O₂ était le facteur clef pour déclencher la réponse hypersensible (Delledonne *et al.*, 2001).

Les protéines liées à la pathogénèse

Les protéines liées à la pathogénèse (PR pour « Pathogenesis-Related ») sont mises en œuvre dans le cadre de la SAR, par l'activation des gènes qui conduisent à leur biosynthèse (Loon, 1985). Certaines d'entre elles sont antibiotiques par une action sur les molécules constitutantes de la paroi des bactéries et des champignons. D'autres peuvent jouer le rôle de signaux qui apportent aux cellules voisines des informations concernant l'infection. On peut noter que de nombreuses protéines présentes dans le vin et le raisin sont des protéines PR (Waters *et al.*, 1996).

Elles ont été décrites dans de nombreuses espèces de plantes à propos d'infections par des oomycètes, des champignons, des bactéries, des virus ou des insectes (van Loon *et al.*, 2006). Certaines sont très répandues dans le monde végétal ; d'autres sont présentes plus spécifiquement chez certaines espèces de plantes. La biosynthèse de la plupart des protéines PR est activée par l'intermédiaire de phytohormones comme le SA, le JA ou l'éthylène (van

Loon *et al.*, 2006). Plusieurs d'entre elles sont induites au cours de la sénescence ou à l'occasion de blessures ou du stress lié au froid ; en effet certaines possèdent une activité antigél. Beaucoup sont présentes dans les tissus floraux et la présence de leurs analogues dans le pollen, les fruits et les légumes peut provoquer des allergies chez l'être humain (van Loon *et al.*, 2006). Ceci suggérerait un rôle dans l'éloignement des mammifères herbivores.

L'organisation spatiale de la défense : réponse locale et réponse systémique

En portant un regard global sur toutes les considérations précédentes, on peut finalement dire que la plante va élaborer une double stratégie, très organisée. D'une part, elle développe, autour du point d'infection, une réaction non spécifique mais très intense qui permet d'opposer un rempart efficace à tous les micro-organismes opportunistes (Klarzynski et Fritig, 2001). En effet, l'attaque des tissus de la plante par un seul pathogène ouvre une porte d'entrée par laquelle de nombreux autres types d'agresseurs peuvent pénétrer. Cette forme de résistance est la réponse locale.

Pour des raisons d'économie évidentes, le reste de la plante n'est pas concerné par cette réponse qui nécessite des ressources importantes, voire le sacrifice de certains tissus. En revanche, les parties non infectées, parfois très éloignées du site de l'attaque, sont engagées dans une forme de résistance de bien moindre intensité, mais les préparant à affronter une nouvelle attaque (Klarzynski et Fritig, 2001). C'est la réponse systémique. Ce qui est remarquable dans ce phénomène de sensibilisation est qu'il rend les futures réponses plus efficaces non seulement contre le premier agresseur, mais encore contre n'importe quel autre (Klarzynski et Fritig, 2001).

b. Perspectives d'applications

Une meilleure connaissance des mécanismes de défense des plantes peut permettre d'envisager le développement de nouvelles techniques phytosanitaires, par la stimulation de ces défenses naturelles.

Plusieurs stratégies sont actuellement explorées. L'introduction de gènes de résistance est une première possibilité et offre l'avantage d'aboutir beaucoup plus rapidement que la sélection traditionnelle. En outre elle peut avoir lieu entre espèces éloignées, ce que ne permet pas le croisement. Elle est aussi plus souple quant aux modifications qu'on peut faire subir au gène concerné pour le rendre efficace contre un plus grand nombre de pathogènes. Mais le principal inconvénient reste la résistance du public face à ce type de manipulations. De plus les pathogènes peuvent à leur tour développer des résistances face aux gènes introduits, rendant parfois rapidement caduques de longs efforts de recherche.

Une autre possibilité consiste à stimuler les défenses en aval en mimant les messagers qui activent les voies de signalisation de la plante. Des essais avec l'acide salicylique ou des oligosaccharides ont déjà donné des résultats prometteurs (Klarzynski et Fritig, 2001).

iv. Dérivés du resvératrol et autres stilbènes présents chez les plantes

trans-picéide

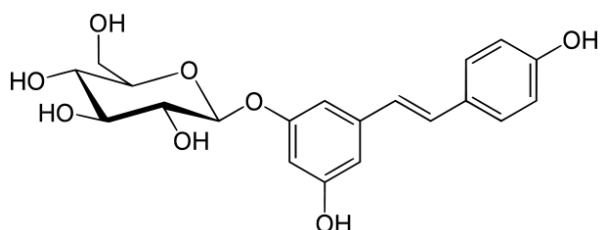


Figure 4 : Structure chimique du *trans*-picéide.

Le *trans*-picéide (Figure 4) est un dérivé glycosylé du resvératrol dans lequel un des groupements phénols du resvératrol est engagé dans une liaison acétal avec une molécule de glucose. C'est l'un des dérivés du resvératrol qui est le plus présent dans le jus de raisin (Romero-Perez *et al.*, 1999). Le MeJA induit sa synthèse dans les cellules épidermiques des feuilles de vigne (Schnee *et al.*, 2008). On le trouve aussi dans l'écorce de certains épicéas (épicéa de Sitka, *Picea stichensis*) (Aritomi et Donnelly, 1976). Il est aussi majoritairement présent dans la renouée du Japon (Wang *et al.*, 2007). Contrairement au resvératrol, il n'entraîne pas de résistance à l'oïdium chez la vigne (Schnee *et al.*, 2008). Ceci serait dû à sa nature glycosylée qui le rend beaucoup plus hydrophile que son aglycone et permet sa mise en réserve dans la vacuole. Ceci l'éloigne donc de la périphérie cellulaire, siège des mécanismes de défense.

trans-ptérostilbène

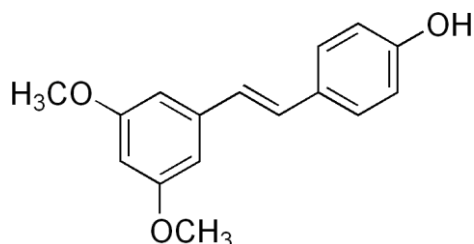


Figure 5 : Structure chimique du *trans*-ptérostilbène.

On le trouve dans les myrtilles et le raisin. Selon des études sur modèle animal, il aurait une activité contre le cancer, l'hypercholestérolémie et l'hyperlipémie (Rimando, 2006 ; Mikstacka *et al.*, 2007). Il permettrait encore de lutter contre le déclin des fonctions cognitives, voire de l'inverser (Joseph *et al.*, 2008). C'est un dérivé du resvératrol dans lequel deux fonctions phénols du même noyau aromatique sont méthylées (Figure 5). Cette nature chimique le rend mieux assimilable par l'organisme et plus disponible puisqu'il entre plus facilement dans la cellule et qu'il est plus résistant à la dégradation et à son élimination (Lin *et al.*, 2009).

trans- ϵ -viniférine

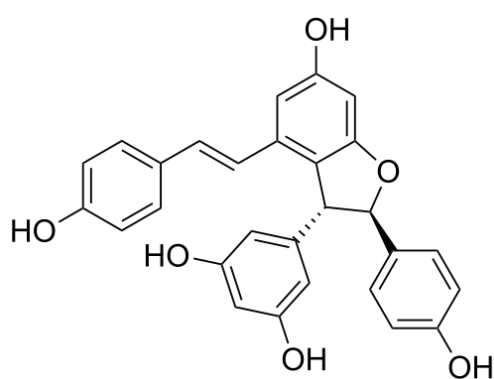


Figure 6 : Structure chimique de la *trans*- ϵ -viniférine.

L' ϵ -viniférine est présente dans les vignes de l'espèce *Vitis vinifera* (Langcake et Pryce, 1977), dans le vin (Vitrac *et al.*, 2005), dans la vigne du Japon (*Vitis coignetiae*), une plante médicinale orientale et dans l'écorce de *Dryobalanops aromatica*, un arbre originaire de Malaisie (Wibowo *et al.*, 2011). C'est un dimère du resvératrol (Figure 6). Elle s'est révélé inhibitrice de certains cytochromes impliqués dans l'activation de substances cancérigènes. Des travaux ont montré qu'elle était encore plus efficace dans ce domaine que le resvératrol (Piver *et al.*, 2003).

trans- δ -viniférine

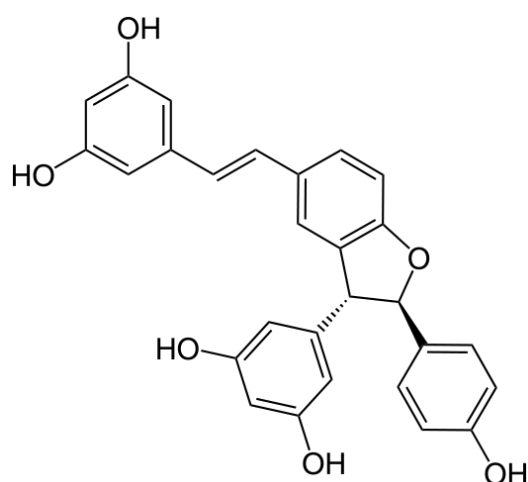


Figure 7 : Structure chimique de la *trans*- δ -viniférine.

On la trouve également dans la vigne (Pezet *et al.*, 2003) et le vin (Vitrac *et al.*, 2005), mais encore chez *Rheum maximowiczii*, une espèce de rhubarbe (Shikishima *et al.*, 2001). C'est un dimère du resvératrol, isomère de la précédente (Figure 7). Elle peut être synthétisée à partir du resvératrol par certaines enzymes chez l'homme (Szewczuk *et al.*, 2005) ou encore à partir du resvératrol et de l' ϵ -viniférine par la peroxydase de raifort (Wilkens *et al.*, 2010).

α -viniférine

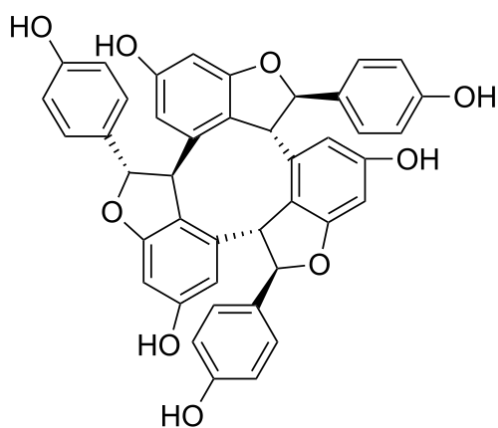


Figure 8 : Structure chimique de l' α -viniférine.

C'est un trimère du resvératrol (Figure 8). Elle a pu être isolée à partir de *Caragana chamlagu* (Sung *et al.*, 2002) et de *Caragana sinica* (Shu *et al.*, 2006). Tout comme l' ϵ -viniférine, on la retrouve dans *Dryobalanops aromatica* (Wibowo *et al.*, 2011). Des travaux ont montré qu'elle

inhibait l'acétylcholine-estérase, une enzyme permettant à certains neurones de revenir à leur état de repos après l'activation (Sung *et al.*, 2002).

trans-picéatannol

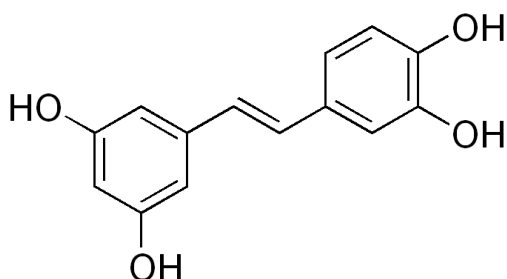


Figure 9 : Structure chimique du *trans*-picéatannol.

C'est un composé présent dans les racines micorhiziennes et non-micorhiziennes de l'épicéa commun (*Picea abies*) (Münzenberger *et al.*, 1990). On le trouve encore dans les graines du palmier *Aiphanes horrida* (Lee *et al.*, 2001), dans *Gnetum cleistostachyum* (Yao *et al.*, 2005), une liane originaire de Chine méridionale et dans le vin rouge. Seul un groupement phénol supplémentaire, en *ortho* du groupement 4', le distingue du resvératrol (Figure 9). Des études *in vitro* ont mis en évidence qu'il bloquait une enzyme virale impliquée dans la leucémie, le lymphome non hodgkinien et d'autres maladies associées au virus de l'herpès (Geahlen et McLaughlin, 1989). En revanche, injecté chez le rat, le picéatannol subit rapidement une conjugaison à l'acide glucuronique provoquant sa solubilisation et son élimination dans les urines. Ceci diminuerait sa biodisponibilité (Roupe *et al.*, 2006). D'autres travaux sur cellules adipeuses prouvent qu'il modifie l'expression des gènes et l'activité de l'insuline, retardant ainsi ou inhibant complètement l'adipogénèse (Kwon *et al.*, 2012).

II. Production conventionnelle du resvératrol

i. Extraction végétale par solvant

Extraction à partir des sarments de vigne

En 2008, le bois de taille de la vigne a été étudié comme source potentielle de resvératrol et d'autres stilbènes à l'échelle industrielle. Les taux d'extraction qu'on peut atteindre, à partir de *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, pour le *trans*-resvératrol et la *trans*- ϵ -viniférine sont supérieurs à 0,3 % et 0,1 % (m/m) de la masse sèche, respectivement. Un travail de recherche fit l'examen du rendement d'extraction par différents type de solvants, protiques (donneurs de protons) ou aprotiques (non donneurs de protons). Les résultats révélèrent que les taux

d'extraction variaient d'un facteur 22 sur toute la gamme des systèmes de solvants utilisés, démontrant par là l'importance pour une extraction efficace, de la polarité du solvant et de sa capacité à former des liaisons hydrogènes (Rayne *et al.*, 2008).

Un brevet fut ensuite publié en 2010 par le groupe LVMH. Les sarments de vigne sont d'abord récoltés sur le vignoble puis séchés jusqu'à contenir moins de 5 % (m/m) d'humidité, favorisant ainsi l'extraction des stilbènes. Le séchage des sarments se fait à l'air libre, pendant une période de 3 à 4 mois. Ils peuvent également être séchés au four à une température qui n'excède pas 40°C. L'extraction se fait à l'aide d'un solvant organique polaire, comme un alcool à courte chaîne (C1 à C6) ou une cétone (acétone), ce solvant pouvant être pur ou mélangé à l'eau. On obtient un premier extrait qui est ensuite lavé à l'aide d'un solvant organique apolaire non miscible au précédent comme l'hexane, pour obtenir un second extrait. Afin d'améliorer la pureté de ce dernier extrait, on peut le passer sur une colonne de silice qui permet la fixation des stilbènes. L'élution se fait à l'aide d'un mélange approprié comme un mélange acétate d'éthyle : hexane (80:20, v:v). Une dernière étape d'évaporation élimine l'éluant pour donner une poudre beige. Les extraits obtenus peuvent être 1000 fois plus concentrés en resvératrol que les extraits commerciaux préparés à partir du vin. Ceci permet le développement de produits (liquides, poudres, comprimés) contenant un taux élevé de resvératrol et répondant à des applications commerciales dans les domaines cosmétique, diététique et pharmaceutique (Andre et Renimel, 2010).

Un autre brevet a également été déposé, permettant la stabilisation des formulations cosmétiques contenant du resvératrol (Vercauteren *et al.*, 2003).

Extraction à partir de la renouée

L'autre source possible de resvératrol et de stilbènes est la renouée du Japon. Dans ce cas, la technique utilisée est la chromatographie à contre-courant à grande vitesse (HSCCC), dans laquelle la phase stationnaire et la phase mobile sont toutes deux liquides et non miscibles.

Les racines séchées de la renouée sont réduites en poudre, puis extraites au méthanol à température ambiante, pendant 24h. Cette extraction est répétée trois fois. Le méthanol est ensuite éliminé par évaporation et l'extrait sec est dissous dans un mélange de solvants contenant du pétrole brut léger, de l'acétate d'éthyle, du méthanol et de l'eau. Après décantation, on récupère la phase aqueuse pour la laver une seconde fois avec le même mélange. L'extrait obtenu est enfin traité par HSCCC pour séparer et purifier les constituants. Il en résulte une pureté supérieure à 95 % en stilbènes totaux (Chu *et al.*, 2005).

L'inconvénient de ce procédé est que l'extrait obtenu contient en revanche peu de resvératrol en proportion des stilbènes totaux et qu'il est majoritairement composé de picéide. Pour obtenir le resvératrol à partir de cette forme, une hydrolyse est nécessaire.

ii. Synthèse chimique

De nombreuses voies de synthèse du resvératrol ont déjà été proposées. En voici quelques-unes.

Réaction de Perkin

La première synthèse chimique du resvératrol a été réalisée en 1941 en utilisant la réaction de Perkin. Celle-ci est une réaction de condensation entre un aldéhyde aromatique et un acide carboxylique, utilisée habituellement pour synthétiser l'acide cinnamique. Mais celle-ci présente deux principaux inconvénients : l'étape de décarboxylation nécessite une quantité importante de cuivre et une température élevée (220°C) (Figure 10) ; l'étape de déprotection des phénols est délicate et nécessite l'emploi d'un acide de Lewis comme BCl_3 , BBr_3 ou AlI_3 (Nicks *et al.*, 2009).

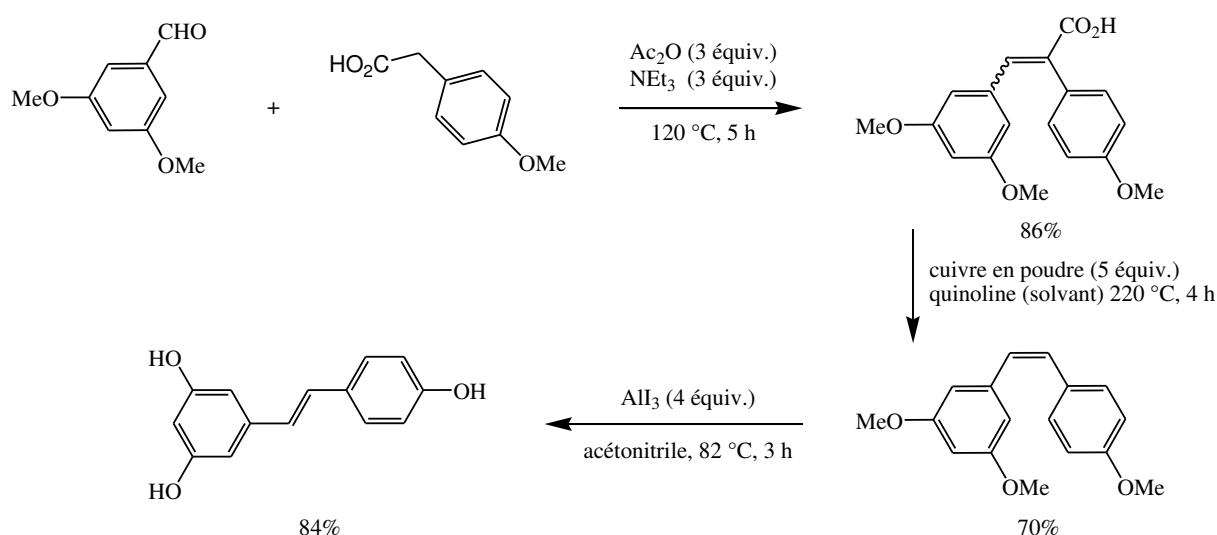


Figure 10 : Synthèse multi-étapes du resvératrol avec une réaction de Perkin comme étape clé (d'après Nicks *et al.*, 2009).

En 2007, une alternative a permis de contourner ces deux inconvénients et de simplifier la réaction (Figure 11).

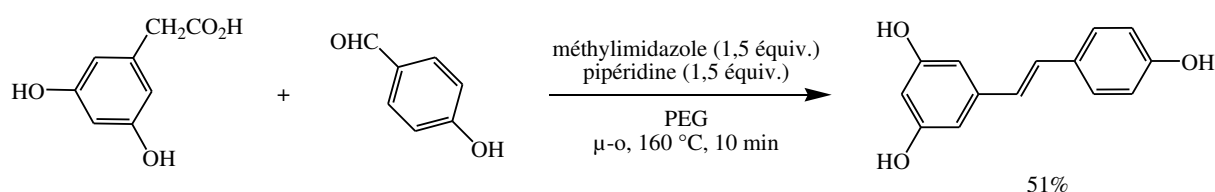


Figure 11 : Synthèse du resvératrol par la réaction de Perkin (d'après Nicks *et al.*, 2009).

Mais le rendement de ce procédé n'atteint que 51%.

Réaction de Wittig

La réaction de Wittig est la plus utilisée et la plus étudiée dans le cadre de la synthèse du resvératrol et de ses dérivés (Figure 12). C'est une réaction d'addition d'un composé organophosphoré sur un composé carbonylé (aldéhyde ou cétone). Sa limite est qu'elle produit un mélange d'isomères *cis* et *trans* mais le *cis*-resvératrol peut être converti en *trans*-resvératrol à l'aide d'un catalyseur au palladium. Des améliorations récentes augmentent toutefois la sélectivité de la réaction, permettant ainsi d'éviter l'utilisation de catalyseurs d'isomérisation souvent coûteux. Un désavantage de cette méthode reste le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention du resvératrol et la quantité de déchets produits. La réaction de Wittig ne constitue en effet qu'une partie du processus de synthèse qui s'étale sur un minimum de six étapes. De plus, l'utilisation de groupements protecteurs de type méthyle est requise et conduit dès lors à une étape de déprotection en présence d'un acide de Lewis comme pour la réaction de Perkin (Nicks *et al.*, 2009).

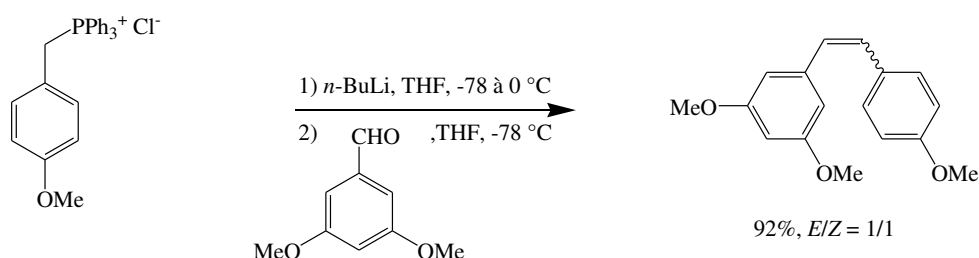


Figure 12 : Etape principale de la synthèse du resvératrol par la réaction de Wittig (d'après Nicks *et al.*, 2009).

Réaction de Claisen

La synthèse du resvératrol par la réaction de Claisen est basée sur une condensation entre deux esters (Figure 13). Cette synthèse est caractérisée par les mêmes avantages et inconvénients que la réaction de Wittig et fait également l'objet de plusieurs brevets (Nicks *et al.*, 2009).

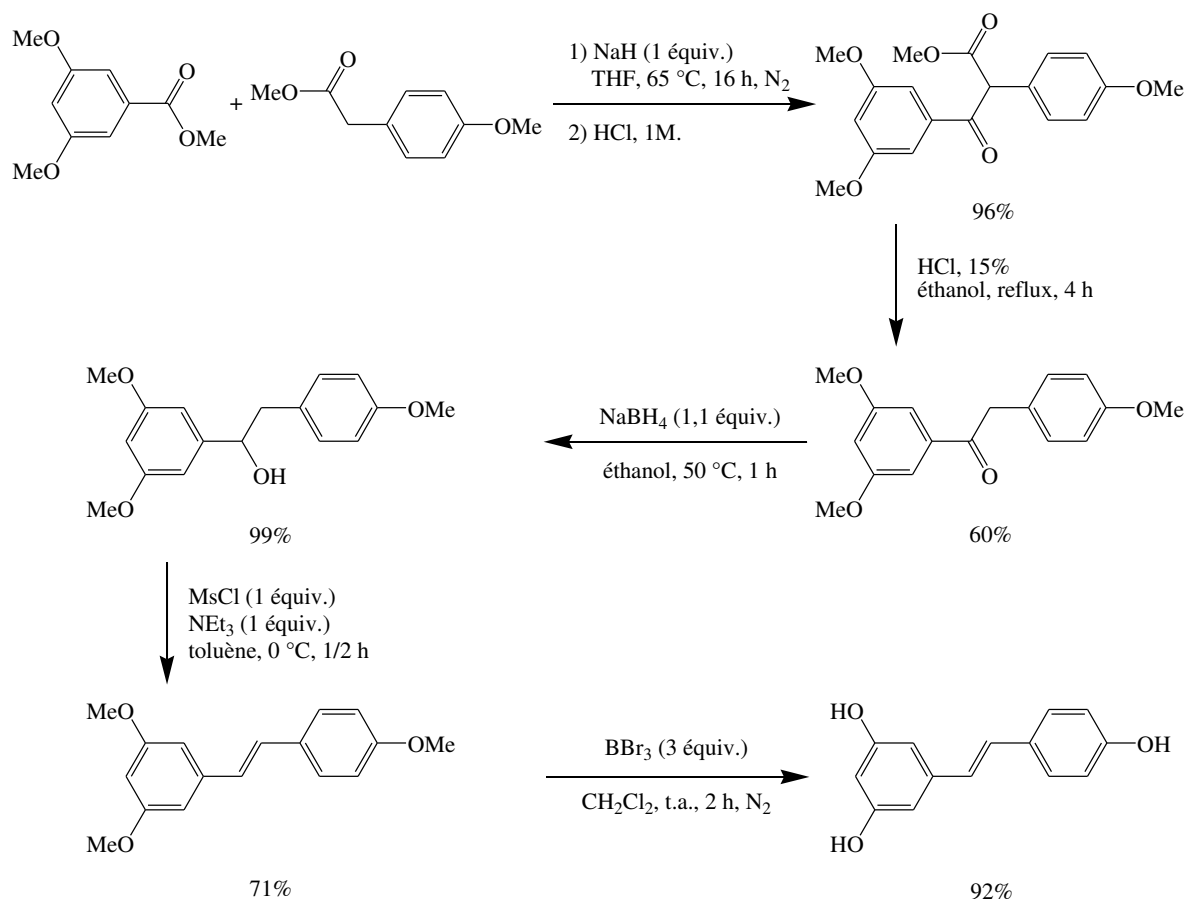


Figure 13 : Synthèse du resvératrol avec une réaction de Claisen comme étape clé (d'après Nicks *et al.*, 2009).

Métathèse croisée

Elle consiste en la rupture et le réarrangement de deux doubles liaisons (Figure 14). Son avantage réside dans le fait que l'éthylène est le seul sous-produit de la réaction. En revanche, la synthèse des réactifs nécessite plusieurs étapes. L'autre point faible est la formation des produits d'homocouplage de chacun des deux réactifs. Mais le recyclage de ces produits peut néanmoins être envisagé (Nicks *et al.*, 2009).

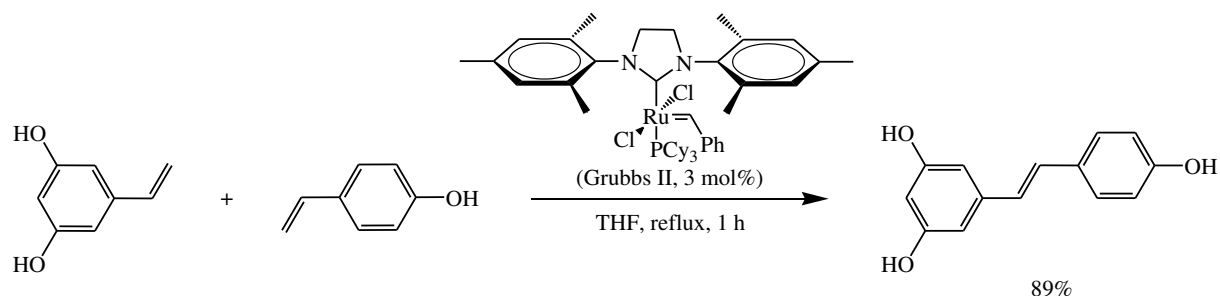


Figure 14 : Synthèse du resvératrol par métathèse croisée entre deux dérivés hydroxylés du styrène (d'après Nicks *et al.*, 2009).

Réaction de Heck-Mizoroki

C'est une réaction entre un dérivé halogéné et un alcène (Figure 15). Elle a été découverte séparément par Mizoroki en 1971 et par Heck en 1972. Grâce à certaines améliorations, on a pu réduire la quantité de palladium utilisé et obtenir un rendement de 95 %. Elle présente cependant deux inconvénients majeurs : elle forme un halogénure difficile à recycler et ses réactifs sont difficiles à synthétiser. Cela peut être partiellement contourné par l'emploi d'un chlorure d'acide au lieu du dérivé halogéné (Nicks *et al.*, 2009).

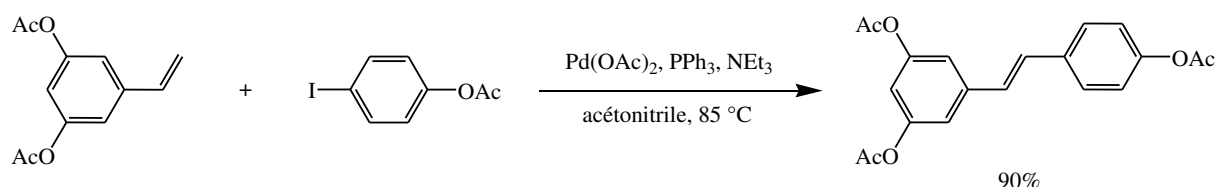


Figure 15 : Synthèse du resvératrol par couplage de Heck-Mizoroki (d'après Nicks *et al.*, 2009).

Couplage décarbonylatif de Heck appliqué aux esters d'énol

Une nouvelle voie de synthèse économique du resvératrol et de ses dérivés pourrait être envisagée mais elle requiert encore une étude de faisabilité. Cette nouvelle approche synthétique comporte deux étapes principales : d'abord, l'addition d'un dérivé de l'acide benzoïque à du propyne et ensuite un couplage décarbonylatif de Heck entre cet ester d'énol et un dérivé du styrène (Figure 16).

Cette technique a récemment été développée par L.J. Goossen et J. Paetzold pour des précurseurs non phénoliques. Elle possède plusieurs avantages par rapport au couplage traditionnel de Heck-Mizoroki. L'utilisation d'un dérivé de l'acide benzoïque en tant que précurseur est d'un intérêt remarquable, étant donné la vaste gamme de ces dérivés accessibles à bas prix. De plus, cette réaction libère de l'acétone et du monoxyde de carbone comme uniques sous-produits. Aucun acide n'étant généré, la présence d'une quantité stœchiométrique de base n'est plus nécessaire (Nicks *et al.*, 2009).

Par contre, le propyne a un coût plus important.

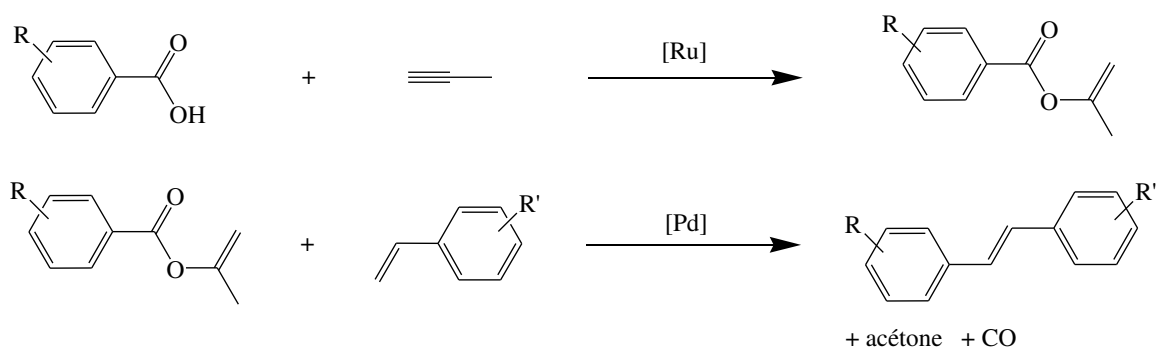


Figure 16 : Addition d'un dérivé de l'acide benzoïque au propyne en présence d'un complexe de ruthénium puis couplage décarbonylatif de Heck entre un dérivé du benzoate d'isopropényle et un dérivé du styrène en présence d'un complexe de palladium (d'après Nicks *et al.*, 2009).

Le tableau 1 récapitule les avantages et les inconvénients de ces diverses voies de synthèse.

Tableau 1. Comparaison des différentes voies de synthèse chimique du resvératrol

Voie de synthèse	Avantages	Inconvénients
Réaction de Perkin	-	Quantité importante de cuivre Température élevée (220°C) Emploi d'un acide de Lewis (BCl ₃ , BBr ₃ ou AlI ₃) pour la déprotection des phénols Complexité de la réaction (trois étapes)
Alternative simplifiée de la réaction de Perkin	Pas de cuivre Pas de protection des phénols Simplicité de la réaction (une étape)	Rendement faible (51%)
Réaction de Wittig	-	Production d'un mélange d'isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> Nombre d'étapes important (six au minimum) Quantité de déchets produits Emploi d'un acide de Lewis (BCl ₃ , BBr ₃ ou AlI ₃) pour la déprotection des phénols
Réaction de Claisen	-	Nombre d'étapes important Emploi d'un acide de Lewis (BCl ₃ , BBr ₃ ou AlI ₃) pour la déprotection des phénols
Métathèse croisée	Ethylène : seul sous-produit de la réaction	Synthèse des réactifs en plusieurs étapes Formation de produits d'homocouplage de chacun des deux réactifs
Réaction de Heck-Mizoroki	Rendement de 95%	Formation d'un halogénure difficile à recycler Synthèse des réactifs difficile
Couplage décarbonylatif de Heck appliqué aux esters d'énol	Un des précurseurs accessible à bas prix Acétone et monoxyde de carbone comme uniques sous-produits Pas de production d'acide : base non nécessaire	Requiert une étude de faisabilité L'autre précurseur a un coût plus important

iii. Utilisation des bactéries ou des levures génétiquement modifiées

L'emploi de micro-organismes modifiés génétiquement est une alternative permettant de s'affranchir de l'utilisation des solvants. De tels procédés sont déjà bien connus, se basant tout aussi bien sur la culture des bactéries que sur celle des levures (Donnez *et al.*, 2009 ; Jeandet *et al.*, 2012). Ainsi, *Saccharomyces cerevisiae* présente des caractéristiques qui ont fait de lui un outil incontournable dans l'expression de protéines transgéniques, à des fins de recherche, industrielles ou médicales. Etant un constituant alimentaire (pain, bière...), il est parfaitement acceptable pour la production de substances à usage cosmétique, diététique ou pharmaceutique. Au contraire, *Escherichia coli* renferme des pyrogènes toxiques et les cellules de mammifères peuvent contenir de l'ADN oncogénique (favorisant l'apparition de cancers) ou viral, si bien que les produits issus de leur culture doivent subir des tests très exigeants. Les levures ont une croissance rapide, sur milieu simple, qui donne des densités cellulaires élevées. *S. cerevisiae* peut être manipulé presque aussi aisément qu'*E. coli*. Les levures sont donc tout à fait appropriées pour produire de grande quantité de métabolites (Romanos *et al.*, 1992).

La société Fluxome a récemment mis au point un procédé permettant la synthèse directe du resvératrol par des levures génétiquement modifiées.

III. Production alternative du resvératrol : biotechnologies végétales

i. Conditions de culture

Macroéléments, microéléments et vitamines

Les milieux liquides utilisés pour la culture des cellules végétales sont généralement issus des premiers milieux décrits comme ceux de Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962) ou de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968). Le choix de l'un ou l'autre de ces milieux dépend surtout de la souche cultivée. Ils renferment les mêmes constituants fondamentaux. Les principaux sont les macroéléments, surtout impliqués dans la structure des molécules et nécessaires en grande quantité pour assurer la croissance et la multiplication des cellules (N, P, K, Ca, Mg, S). D'autres éléments jouent un rôle de catalyseur ou de régulateur dans les cellules, comme celui d'activateur enzymatique ; ce sont les microéléments (Co, Cu, Fe, B, I, Mn, Mo, Zn). Sont ajoutées aussi des vitamines qui activent la croissance des cellules végétales (myo-inositol, acide nicotinique, pyridoxine, thiamine). Seule la concentration relative de ces éléments varie entre les différents milieux. L'azote est souvent apporté sous deux formes

différentes : les ions nitrates (NO_3^-) et les ions ammonium (NH_4^+). Le rapport molaire entre ces deux espèces ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) peut varier de façon importante dans les milieux, allant de 2 à 12 selon les cas.

Régulateurs de croissance

L'autre apport, essentiel cette fois pour la culture des suspensions, est un jeu de régulateurs de croissance (phytohormones), une auxine et une cytokinine, indispensables pour permettre le maintien de la dé-différenciation, la division et l'élongation cellulaires. Il s'agit principalement de composés de synthèse. Les auxines principalement utilisées sont l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4D), et l'acide naphthalène 1-acétique (ANA). Les cytokinines utilisées en combinaison sont la benzylaminopurine (BAP) et la kinétine majoritairement. Le rapport entre les concentrations de ces deux types de phytohormones joue un rôle fondamental dans la présence ou l'absence de différenciation chez les cellules et dans l'orientation de cette différenciation vers la formation de tiges ou de racines. Il peut aussi influencer sur le métabolisme secondaire, notamment sur la production de resvératrol, par exemple sur des cals de *Vitis thunbergii* cv. Sieb. et Zucc. (Ho et Kuo, 2008). A noter que pour la culture de racines transformées, l'apport exogène de régulateurs de croissance n'est pas nécessaire.

Source de carbone

Si les suspensions sont cultivées à la lumière, le dioxyde de carbone de l'air apportera, au moins en partie, le carbone nécessaire au développement cellulaire. Dans le cas d'une culture à l'obscurité en revanche, il faut supplémenter le milieu en carbone organique. Ceci se fait la plupart du temps sous forme de glucides comme le saccharose, le glucose, le fructose, mais d'autres substrats sont possibles comme le glycérol. La concentration en glucides doit être modérée car ceux-ci peuvent engendrer des stress osmotiques sur les cellules. Le rapport molaire atomique carbone vs. azote (C:N) est un paramètre important à prendre en considération. Il est habituellement égal à 5 pour une croissance équilibrée, mais on peut rencontrer des valeurs beaucoup plus élevées, dépassant parfois 70 ; de tels déséquilibres dans le dosage C:N peuvent favoriser la synthèse des métabolites secondaires. Des modifications sans transition et délibérées de la concentration en glucides peuvent aussi déclencher la synthèse de ces métabolites, dont le resvératrol (Belhadj *et al.*, 2008).

pH

Le pH est généralement ajusté autour de 5,8. Les cellules régulent ensuite elles-mêmes le pH du milieu.

Conditions d'incubation

Les conditions d'incubation peuvent aussi différer selon l'éclairage, la température, le type de contenant (fioles d'Erlenmeyer, bioréacteur, etc.), son volume, le volume de suspension (volume de travail), le type d'agitation (orbitale, hélice), la vitesse d'agitation ou encore la fréquence et le taux des dilutions par ajout de milieu (repiquages).

Dans le cas d'une culture en fioles, le volume des fioles est généralement 250 à 300 mL et le volume de suspension peut varier de 50 à 100 mL. L'agitation orbitale est de l'ordre de 100-110 rpm. Quant au repiquage, il peut se faire toutes les semaines (Donnez *et al.*, 2011) ou toutes les deux semaines (Ferri *et al.*, 2011).

Dans le cas de volumes de cultures plus importants, deux paramètres deviennent particulièrement critiques : l'agitation et l'aération. En bioréacteur, l'agitation peut être assurée par différents types d'hélices. Les hélices à pales marines permettent une agitation plus douce. Le choix d'autres types d'hélices, couramment employés pour les cultures de bactéries ou de levures, comme les hélices « rushton » ou « pitchblade », est beaucoup plus risqué car les cellules végétales sont très sensibles au stress engendré par le cisaillement. Ceci est dû à leur grande taille et à la finesse de leur paroi (Kieran *et al.*, 1997). De même, la vitesse d'agitation doit être modérée. L'aération se fait soit par bullage au fond de la cuve, soit par renouvellement de la phase gazeuse au-dessus de la suspension. Le gaz apporté peut être de l'air, de l'oxygène pur, du dioxyde de carbone ou un mélange selon que les conditions sont hétérotrophiques ou non. L'ajustement de ce paramètre est également délicat car un excès d'oxygène peut créer un stress oxydatif et même dégrader par oxydation les métabolites secondaires que l'on cherche à produire.

Le taux d'ensemencement est encore un paramètre important. Suite à l'inoculation de milieu vierge par des cellules végétales, celles-ci le conditionnent en y relarguant certains métabolites. Si les cellules sont présentes en trop faible quantité dans la suspension, le conditionnement ne peut pas s'opérer et on n'observe aucune croissance cellulaire.

Concernant l'éclairage, les cellules peuvent être maintenues sous lumière fluorescente continue (Aumont *et al.*, 2004) ou cultivées à l'obscurité (Donnez *et al.*, 2011). Cette deuxième solution est à privilégier si l'on envisage un transfert d'échelle vers de grands volumes. La température de culture est généralement comprise entre 23 et 25°C.

ii. Avantages de l'emploi des cultures végétales *in vitro*

Culture axénique

La culture des suspensions cellulaires présente tous les avantages d'une culture axénique, c'est-à-dire qu'elle est exempte de tout germe saprophyte ou pathogène. Ceci a plusieurs conséquences intéressantes. Tout d'abord, le traitement de la suspension en aval du procédé est peu exigeant, contrairement aux cultures de microorganismes pour lesquels des normes de sécurité compliquent leur élimination. Ensuite, ce type de culture ne nécessite l'emploi d'aucun pesticide puisque les conditions sont stériles, par définition ; comparativement à une culture de vigne en plein champ qui consomme une grande quantité de phytosanitaires, ceci représente un énorme avantage écologique (Donnez, 2010).

Culture contrôlée

Un autre avantage des suspensions est leur caractère contrôlé. En effet, un grand nombre de paramètres sont parfaitement maîtrisés comme l'apport en nutriments (milieu), mais encore la température, l'agitation et la photopériode. Sur tous ces aspects, ces cultures ne sont plus soumises aux aléas des conditions naturelles, comme dans le cas des cultures en plein champ (Donnez, 2010).

Production continue de biomasse

Contrairement à la culture en vignoble, la production de biomasse en suspension est continue : elle se fait jour et nuit, et quelle que soit la saison. Ce type de production est un avantage considérable si l'on envisage l'industrialisation. En effet, les variations saisonnières sont souvent une contrainte majeure des procédés industriels qu'il faut alors ajuster et prévoir longuement à l'avance (Donnez, 2010).

Un système biphasique qui présente des facilités d'extraction

L'une des étapes délicates dans le domaine de la bioproduction est la phase d'extraction du composé d'intérêt. On a vu que l'extraction à partir de matières brutes comme les sarments de vigne ou les rhizomes de renouée du Japon est difficile et nécessite leur broyage et plusieurs lavages si l'on veut un rendement optimal. Dans le cas de la production de resvératrol par les suspensions de certaines lignées de cellules de vigne (41 B et Concord notamment), le composé est relargué directement dans la phase liquide, ce qui rend réalisable par une simple filtration, sa séparation d'avec la phase solide (Donnez, 2010).

Large gamme de volumes envisageables

Ce procédé est aussi d'une grande souplesse au plan quantitatif puisqu'il est concevable sur une très large gamme de volumes. Ceux-ci peuvent s'étendre de 100 mL pour l'étude en laboratoire à 75000 L pour l'unité industrielle, en passant par des essais en bioréacteurs de quelques litres. Il permet ainsi le transfert progressif d'échelle de l'étude amont à l'industrialisation. Il faut ajouter que le caractère exponentiel de la croissance cellulaire permet d'atteindre, à partir d'un faible inoculum, de grandes quantités de biomasse en peu de temps, avantage que ne présente pas la culture en vignoble (Donnez, 2010).

Facilité d'induction de la biosynthèse par élicitation

Enfin, le procédé utilisé pour déclencher la synthèse est extrêmement simple (ajout d'une substance dans le milieu de culture) et permet une grande maîtrise du moment précis auquel on souhaite déclencher la production (Donnez, 2010).

iii. Induction de la biosynthèse en suspensions cellulaires

De nombreuses études ont été réalisées pour la bioproduction du resvératrol et des stilbènes. Elles varient sur différents points comme la lignée cellulaire cultivée, le type de culture ou encore l'éliciteur. Ces différents systèmes donnent des résultats variables quant aux concentrations de resvératrol obtenues, tant à l'extérieur qu'à l'intérieur des cellules.

Plusieurs types d'éliciteurs peuvent être employés. Ce sont souvent des macromolécules issues de la plante hôte (éliciteurs endogènes) ou du pathogène (éliciteurs exogènes). Celles-ci regroupent des oligosaccharides, des glycoprotéines, des peptides et des phospholipides des champignons. Ce peut être encore de petites molécules comme l'acide arachidonique, l'acide jasmonique et l'acide salicylique qui jouent souvent un rôle dans la signalisation de la défense (Benhamou, 1996). Les plus couramment employés pour la production du resvératrol sont le méthyljasmonate, les cyclodextrines et le chitosan (Larronde *et al.*, 1998 ; Ferri *et al.*, 2009).

Quant à la lignée cellulaire cultivée, la littérature fait état de l'utilisation d'espèces diverses. Ainsi, des suspensions de cellules de coton (*Gossypium hirsutum* L.) ont pu produire, en conditions témoins, 7,2 µg de *trans*-resvératrol par gramme de masse sèche (Kouakou *et al.*, 2006). Mais les lignées cellulaires les plus couramment utilisées pour la production de stilbènes restent celles de cellules de vigne. *Vitis vinifera* cv. Gamay Fréaux var. Teinturier a été cultivée en suspension pour produire du picéide et plusieurs autres dérivés glucosylés du resvératrol (Larronde *et al.*, 1998). On peut exploiter ces dérivés en réalisant une hydrolyse par des glucosidases. Les niveaux de production atteints sont de 34 mg/L de picéide en conditions témoins et 57 mg/L par l'ajustement de la composition en sucres du milieu de culture. Comparativement à des concentrations de stilbènes totaux de l'ordre de 390 mg/L en conditions témoins, l'élicitation de cette même lignée par le méthyljasmonate (10 µM) a permis d'atteindre un maximum de 840 mg/L, 8 jours après l'élicitation (Vitrac *et al.*, 2002) mais cette production reste majoritairement constituée de picéide et contient peu de *trans*-resvératrol (6 mg/L). Le méthyljasmonate a encore été utilisé sur *Vitis vinifera* cv. Limberger (50 µM) (Repka *et al.*, 2004) et sur *Vitis vinifera* cv. Barbera (10 µM) (Tassoni *et al.*, 2005). Cette dernière lignée a permis d'obtenir 13 µg de *trans*-resvératrol extracellulaire et 39 µg de *trans*-resvératrol intracellulaire par gramme de masse sèche. Une autre étude a cherché à produire des stilbènes marqués au carbone 13, dans le but de caractériser la biodisponibilité du resvératrol dans les organismes animaux. A cette fin, de la phénylalanine marquée au carbone 13 a été ajoutée comme précurseur dans le milieu de culture. L'élicitation au méthyljasmonate (10 à 50 µM) a conduit à la production de plus de 231 mg/L de stilbènes marqués (Krisa *et al.*, 1999). Un changement d'échelle en bioréacteur de 2 L avec une hélice Rushton, a vu la concentration des stilbènes marqués dépasser 280 mg/L, majoritairement du picéide (Aumont *et al.*, 2004). La principale limite de cette méthode réside dans la nécessité de la lumière pour le maintien de la culture, ce qui empêche le changement d'échelle vers des volumes plus élevés, couramment utilisés en bioréacteur inox. De plus, la culture cellulaire à la lumière ne semble pas être le meilleur choix puisque la lumière peut aussi induire la

synthèse de pigments comme les anthocyanines ou celle du *cis*-resvératrol, des co-produits qui devront être séparés lors du processus d'extraction. Le méthyljasmonate et l'accroissement de la concentration en sucre dans le milieu de culture ont aussi été utilisés sur des suspensions de *Vitis vinifera* cv. Gamay, induisant la production de 27 mg de *trans*-resvératrol par gramme de masse fraîche (Belhadj *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que la L-alanine activait, par une réponse de mort cellulaire programmée, l'expression des gènes de la voie métabolique des stilbènes, et ainsi leur biosynthèse, dans des suspensions de *Vitis labrusca* cv. Concord. La concentration obtenue dans ce cas était de 0,54 mg/L (Chen *et al.*, 2006). D'autres travaux sur des suspensions cellulaires du porte-greffe 41B (*Vitis vinifera* cv. Chasselas x *Vitis berlandieri*), cultivées en bioréacteur de 2L et élicitées au méthyljasmonate, ont permis d'atteindre 209 mg/L de resvératrol dans le milieu de culture (Donnez *et al.*, 2011).

La méthyl- β -cyclodextrine s'est révélé présenter des effets éliciteurs sur les cellules de vigne (Bru et Pedreño, 2006 ; Donnez *et al.*, 2009). De manière générale, les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités α -D-glucopyranose reliées entre elles en 1,4. Ce sont des produits naturels découverts en 1891, qui résultent de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*. Elles sont très étudiées et trouvent des applications dans de nombreux domaines comme la formulation des médicaments, l'industrie agro-alimentaire, la chimie analytique, la dépollution des sols ou encore la métallurgie (Liu *et al.*, 2013). Il en existe différents types, se distinguant principalement par le nombre de résidus glucoses que contient la molécule et par la substitution de leurs groupements hydroxyles. La méthyl- β -cyclodextrine renferme sept sous-unités glucose et certains de ses groupements hydroxyles sont méthylés. Elle a notamment été utilisée avec des suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* cv. Gamay. En conditions témoins, cette souche ne produisait pas de *trans*-resvératrol, mais uniquement des picéides (93 mg/L). La diméthyl- β -cyclodextrine (5 mM) permet d'obtenir plus de 100 mg/L de *trans*-resvératrol. En plus de la présence de cyclodextrine, l'inoculation par *Xylophilus ampelinus* fit monter la concentration du *trans*-resvératrol à 203 mg/L et celle des *trans*-picéides à 202 mg/L (Morales *et al.*, 1998). Il existe d'autres types de cyclodextrines donnant d'excellents résultats : les β -cyclodextrines DIMED, RAMED et CAVASOL®W7 ont engendré une production de plus de 3000 mg/L de *trans*-resvératrol chez *Vitis vinifera* cv. Gamay rouge en suspension. Des suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* cv. Monastrell ont même dépassé les 4000 mg/L avec les cyclodextrines DIMED et HYPROB et les 5000 mg/L avec les types RAMED et CAVASOL®W7 (Bru et Pedreño, 2006). Cependant, de tels résultats ont été obtenus sur de petits volumes (fioles de 50 mL contenant 10 mL de suspension). D'autres travaux sur les mêmes lignées, en fioles de 250 mL contenant 100 mL de suspension, ont publié des concentrations de *trans*-resvératrol de l'ordre de 680 mg/L, en présence de cyclodextrine DIMED. Ces mêmes travaux ont montré un effet synergique entre le méthyljasmonate et cette cyclodextrine, responsable d'une production de 4000 mg/L de *trans*-resvératrol (Lijavetzky *et al.*, 2008).

Les propriétés essentielles des cyclodextrines seraient principalement dues à leur capacité à encapsuler la molécule de resvératrol (Morales *et al.*, 1998), comme nous l'aborderons dans la suite (Figure 17) et à leur caractère d'éliciteur, notamment via l'implication du calcium, la

phosphorylation/déphosphorylation des protéines (Belchi-Navarro *et al.*, 2013). Leur utilisation pourrait donc se révéler prometteuse dans l'optique d'une industrialisation du procédé.

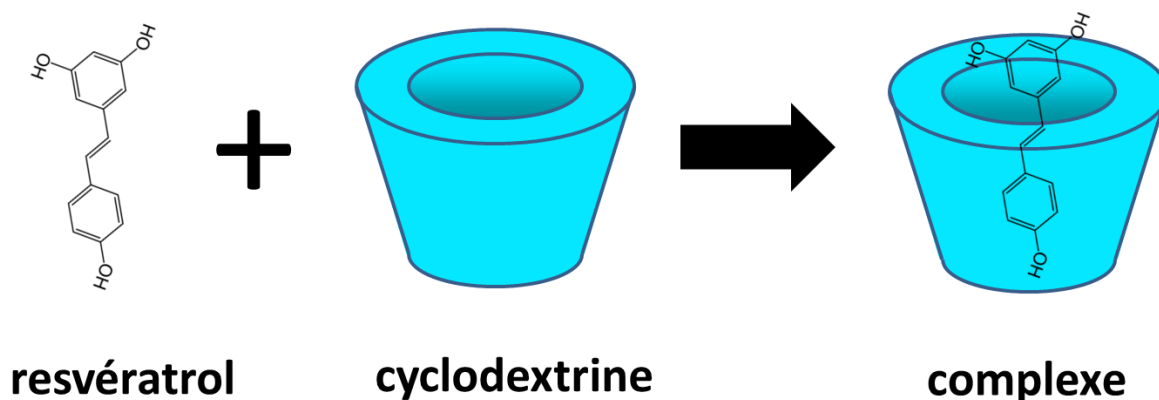


Figure 17 : Encapsulation du resvératrol par la méthyl- β -cyclodextrine

iv. Induction de la biosynthèse dans des cultures de racines transformées

Un deuxième système végétal est également efficace à produire des métabolites secondaires. Il s'agit des cultures de racines transformées (Guillon *et al.*, 2006). Elles sont obtenues en transférant le plasmide bactérien Ri T-DNA de *Agrobacterium rhizogenes* dans des tissus végétaux. Ce procédé est à l'origine d'une modification génétique des cellules végétales qui engendre le développement de racines. Ces racines peuvent croître en milieu liquide et produire des métabolites secondaires. Des cultures de racines transformées d'arachide (*Arachis hypogea*) ont été utilisées pour produire du *trans*-resvératrol par élicitation à l'acétate de sodium (98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de résidu sec du milieu) (Medina-Bolivar *et al.*, 2007). La sélection de la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* est critique dans une optique de production de stilbènes car elle détermine la fréquence de l'infection bactérienne (de 27,1 à 75,8 %), la croissance (de 4,3 à 7,6 g masse sèche/L) et la production des stilbènes (de 0,8 à 1,5 mg/g masse sèche) (Kim *et al.*, 2008). Plus récemment, des cultures de racines transformées de vigne (*Vitis rotundifolia*) ont été décrites et ont permis de mettre en évidence la production de resvératrol, de picéide et d' ϵ -viniférine par élicitation avec du méthyljasmonate et du peroxyde d'hydrogène. La production de ces trois stilbènes est majoritairement retrouvée dans les tissus racinaires avec des productions maximales

d'environ 0,1 mg/g DW pour le resvératrol, 0,3 mg/g DW pour le picéide et 0,4 mg/g DW pour l' ϵ -viniférine (Nopo-Olazabal *et al.*, 2014). La culture de racines transformées apparaît également comme un mode de culture intéressant pour l'étude de la bioproduction des stilbènes.

Tous ces résultats sont rassemblés dans le tableau 2.

Tableau 2. Utilisation des cultures cellulaires pour la production des stilbènes

Lignée cellulaire	Type de culture	Éliciteur / inducteur	Production extracellulaire	Production intracellulaire	Références
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Suspension cellulaire	Témoin	-	7,2 µg/g DW <i>trans</i> -resvératrol	Kouakou <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Teinturier	Suspension cellulaire	Témoin	-	34 mg/L picéide	Larronde <i>et al.</i> , 1998
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Teinturier	Suspension cellulaire	Sucre	-	57 mg/L picéide	Larronde <i>et al.</i> , 1998
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Teinturier	Suspension cellulaire	Témoin	-	390 mg/L stilbènes totaux	Vitrac <i>et al.</i> , 2002
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Teinturier	Suspension cellulaire	MeJA	-	840 mg/L stilbènes totaux 6 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	Vitrac <i>et al.</i> , 2002
<i>Vitis vinifera</i> cv. Barbera	Suspension cellulaire	MeJA	13 µg/g DW <i>trans</i> -resvératrol	39 µg/g DW <i>trans</i> -resvératrol	Tassoni <i>et al.</i> , 2005
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Teinturier	Suspension cellulaire	Phényl-alanine et MeJA	-	231 mg/L stilbènes totaux	Krisa <i>et al.</i> , 1999
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Teinturier	Suspension cellulaire	Phényl-alanine	-	280 mg/L stilbènes totaux	Aumont <i>et al.</i> , 2004
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Teinturier	Suspension cellulaire	Concentration du sucre et MeJA	27 mg/g FW <i>trans</i> -resvératrol	-	Belhadj <i>et al.</i> , 2008
<i>Vitis labrusca</i> cv. Concord	Suspension cellulaire	L-alanine	0,54 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Chasselas x <i>Vitis berlandieri</i> (41B)	Suspension cellulaire	MeJA	209 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Donnez <i>et al.</i> , 2011
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay	Suspension cellulaire	Témoin	-	93 mg/L picéide	Morales <i>et al.</i> , 1998
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay	Suspension cellulaire	Diméthyl-β-cyclodextrine	100 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Morales <i>et al.</i> , 1998
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay	Suspension cellulaire	Diméthyl-β-cyclodextrine et inoculation par <i>Xylophilus ampelinus</i>	203 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	202 mg/L picéide	Morales <i>et al.</i> , 1998

Tableau 2 (suite). Utilisation des cultures cellulaires pour la production des stilbènes

Lignée cellulaire	Type de culture	Éliciteur / inducteur	Production extracellulaire	Production intracellulaire	Références
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay rouge	Suspension cellulaire	DIMED	3060 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Bru et Pedreño, 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay rouge	Suspension cellulaire	RAMED	3320 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Bru et Pedreño, 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay rouge	Suspension cellulaire	CAVASOL® W7	3280 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Bru et Pedreño, 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Monastrell Albino	Suspension cellulaire	DIMED	4680 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Bru et Pedreño, 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Monastrell Albino	Suspension cellulaire	HYPROB	4110 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Bru et Pedreño, 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Monastrell Albino	Suspension cellulaire	RAMED	5027 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Bru et Pedreño, 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Monastrell Albino	Suspension cellulaire	CAVASOL® W7	4963 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Bru et Pedreño, 2006
<i>Vitis vinifera</i> cv. Monastrell Albino	Suspension cellulaire	DIMED	680 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Lijavetzky <i>et al.</i> , 2008
<i>Vitis vinifera</i> cv. Monastrell Albino	Suspension cellulaire	DIMED et MeJA	4000 mg/L <i>trans</i> -resvératrol	-	Lijavetzky <i>et al.</i> , 2008
<i>Arachis hypogea</i>	Racines transformées	Acétate de sodium	98 µg <i>trans</i> -resvératrol /mg de résidu sec du milieu	-	Medina-Bolivar <i>et al.</i> , 2007
<i>Arachis hypogea</i>	Racines transformées	Témoin	0,8-1,5 mg/g DW <i>trans</i> -resvératrol	-	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>Vitis rotundifolia</i>	Racines transformées	MeJA et H ₂ O ₂	-	0,1 mg/g DW <i>trans</i> -resvératrol 0,3 mg/g DW picéide 0,4 mg/g DW ε-viniférine	Nopo-Olazabal <i>et al.</i> , 2014

Partie 2 : Matériel et méthodes analytiques

I. Matériel végétal

Deux souches cellulaires de vigne ont été étudiées dans le cadre des expérimentations en fioles. La lignée 41 B, hybride de *Vitis berlandieri* et *Vitis vinifera*, cultivar Chasselas, avait déjà fait l'objet d'une étude qui a précédé les présents travaux (Donnez 2010, Donnez *et al.* 2011). Celle-ci avait permis de caractériser cette souche concernant sa croissance et sa production de stilbènes. Les travaux actuels se sont donc d'abord appuyés sur cette connaissance de la souche 41 B. De manière générale, la variété 41 B est couramment utilisée comme porte-greffe car elle possède une bonne résistance au phylloxéra et supporte très bien les sols calcaires. Elle a été obtenue en 1885, en hybridant *Vitis vinifera*, variété Chasselas et *Vitis berlianderi*. Les avantages qu'elle apporte en suspension cellulaire sont : une vitesse de croissance satisfaisante (temps de doublement de 4 jours avec une phase de latence de 2 jours) et une production satisfaisante de resvératrol. En revanche, elle est assez sensible au cisaillement et la réussite de sa culture en bioréacteur est très aléatoire. Une seconde souche de suspension cellulaire de *Vitis labrusca*, cultivar Concord établie à partir de cals gracieusement obtenu auprès du Pr Vincenzo De Luca (Brock University, Canada) a été développée. De par ses propriétés de croissance, de production de stilbènes et de par sa robustesse à être cultivée en bioréacteur, cette souche a remplacé avec succès la souche 41B dans le cadre de notre travail. La variété Concord est originaire de l'Est des Etats-Unis et appartient à l'espèce *Vitis labrusca* ou serait un hybride entre *Vitis labrusca* et *Vitis vinifera* (Tukey, 1966).

II. Milieu de culture

Les suspensions cellulaires sont cultivées en routine dans des fioles de 300 mL contenant 100 mL de suspension. La variété 41 B est cultivée dans un milieu liquide Murashige et Skoog modifié (Murashige et Skoog, 1962), additionné de saccharose (30 g/L), d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4D ; 0,2 mg/L) et de benzylaminopurine (BAP ; 0,5 mg/L). La variété Concord est cultivée dans un milieu liquide Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968), additionné de saccharose (30 g/L), d'acide naphthalène 1-acétique (ANA ; 0,1 mg/L) et de kinétine (0,2 mg/L). Le pH du milieu Murashige et Skoog modifié est ajusté à 5,75 et celui du milieu Gamborg B5 à 5,8 par l'ajout d'hydroxyde de sodium (0,1-2,0 M) ou d'acide chlorhydrique (0,1 M) avant l'inoculation par les cellules végétales. Le milieu utilisé pour mener les expérimentations est le même que le milieu de routine.

III. Stérilisation du milieu et du matériel

Les fioles vides sont stérilisées au four (stérilisation sèche ; 160°C ; 2h). Les flacons de milieu ou les fioles remplies de milieu sont stérilisés à l'autoclave (stérilisation humide ; 121°C ; 20 min ; 1,1 bar).

IV. Incubation

Les suspensions cellulaires sont incubées à l'obscurité sur un agitateur magnétique orbital à une température de 23°C (SHKE 8000 ; Thermo scientific, 110 rpm ; 25,4 mm/orbite) et leur croissance est maintenue par une dilution dans du milieu frais chaque semaine : 50 % (v/v) pour la variété 41 B et 33 % (v/v) pour la variété Concord.

V. Elicitation

Une solution éthanolique de méthyljasmonate à 40 mM est préparée à partir de la solution commerciale (Sigma-Aldrich, pureté de 95 %). Les cellules sont ensuite élicitées par l'addition de cette solution. L'éthanol a été décrit comme n'entraînant pas d'effet éliciteur en lui-même, aux concentrations utilisées (Donnez *et al.*, 2011).

L'autre éliciteur employé est la méthyl- β -cyclodextrine CAVASOL®W7 M (Wacker). C'est un oligosaccharide cyclique formé de sept résidus α -D-glucopyrannose reliés entre eux par une liaison glucosidique $\alpha 1 - 4$. Les groupements hydroxyles des résidus glucose sont aléatoirement méthylés (Figure 18). La masse molaire est 1310 g/mol. La solubilité dans l'eau à 25°C est 800 g/L.

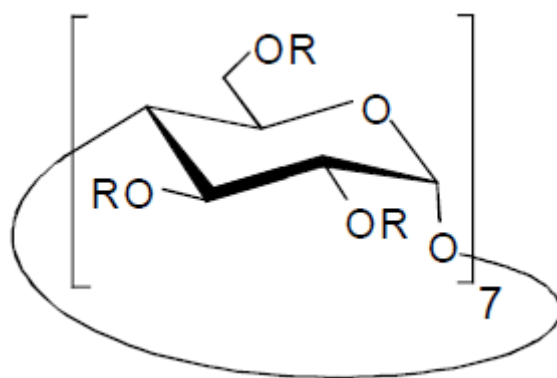


Figure 18 : Structure chimique de la méthyl- β -cyclodextrine CAVASOL®W7 M. Sur cette figure, le radical R est aléatoirement H ou CH₃.

VI. Mesure de la biomasse

La croissance de la biomasse est suivie par mesure de la masse fraîche. Celle-ci est déterminée après filtration à l'aide d'une pompe à vide, sur verre fritté de porosité n°1 (100 à 160 μ m). La biomasse humide est ensuite pesée.

Dans l'étude en bioréacteur, on mesure également la masse sèche (DW) : après centrifugation de 15 mL d'échantillon (5000 g ; 20 min ; 18°C), le culot de centrifugation est rincé deux fois à l'eau désionisée (Millipore) pour éliminer les sucres et les autres composants solubles du milieu. Le culot rincé une première fois est ensuite resuspendu dans l'eau désionisée (15 mL environ) et centrifugé de nouveau comme décrit précédemment. Enfin, ce dernier culot est resuspendu dans l'eau désionisée et la suspension cellulaire obtenue est versée dans une coupelle en aluminium ($\varnothing$ = 100 mm), préalablement pesée. La coupelle et son contenu sont placés dans un four à 105°C, pendant sept jours. Les coupelles contenant la biomasse sèche sont refroidies dans un dessiccateur, en présence de sulfate de calcium anhydre, avant d'être pesées.

VII. Extraction des stilbènes

La production de resvératrol est suivie par mesure de sa concentration dans le milieu de culture car près de 90 % du resvératrol produit par les cellules est excrété (Donnez *et al.*, 2011). Le resvératrol est une molécule de polarité intermédiaire : sa structure renferme deux noyaux benzéniques, fortement hydrophobes, mais substitués par trois groupements phénols, hydrophiles. Il présente donc une affinité particulière pour les solvants se situant dans la même gamme de polarité comme l'acétate d'éthyle. Suite à la filtration, 20 mL de milieu sont

lavés à l'aide de 40 mL d'acétate d'éthyle. L'extraction est complète, comme cela a été vérifié par Donnez en 2010. Après récupération de la phase organique, on élimine le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi, Rotavapor RII), en chauffant au bain-marie à 45°C. L'extrait sec est resuspendu dans 1 mL de méthanol avant quantification par HPLC.

VIII. Analyse par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince est réalisée sur feuille d'aluminium recouverte de silice (gel de silice 60 F₂₅₄ ; Merck). 5 µL d'extrait sont déposés sur la feuille. Le système de solvants utilisé a la composition suivante : chloroforme / acétate d'éthyle / acide formique 50/40/10 (v/v/v) (Donnez, 2010). Après migration, la feuille est observée directement sous lumière UV à 365 nm, les composés étudiés étant auto-fluorescents en lumière UV. On observe un spot spécifique du resvératrol en haut de la feuille (rapport au front de solvant : $R_f = 0,73$) ; dans certains cas apparaissent aussi deux spots au-dessous de celui du resvératrol, attribués aux viniférines ($R_{f1} = 0,60$ et $R_{f2} = 0,64$) (Figure 19).

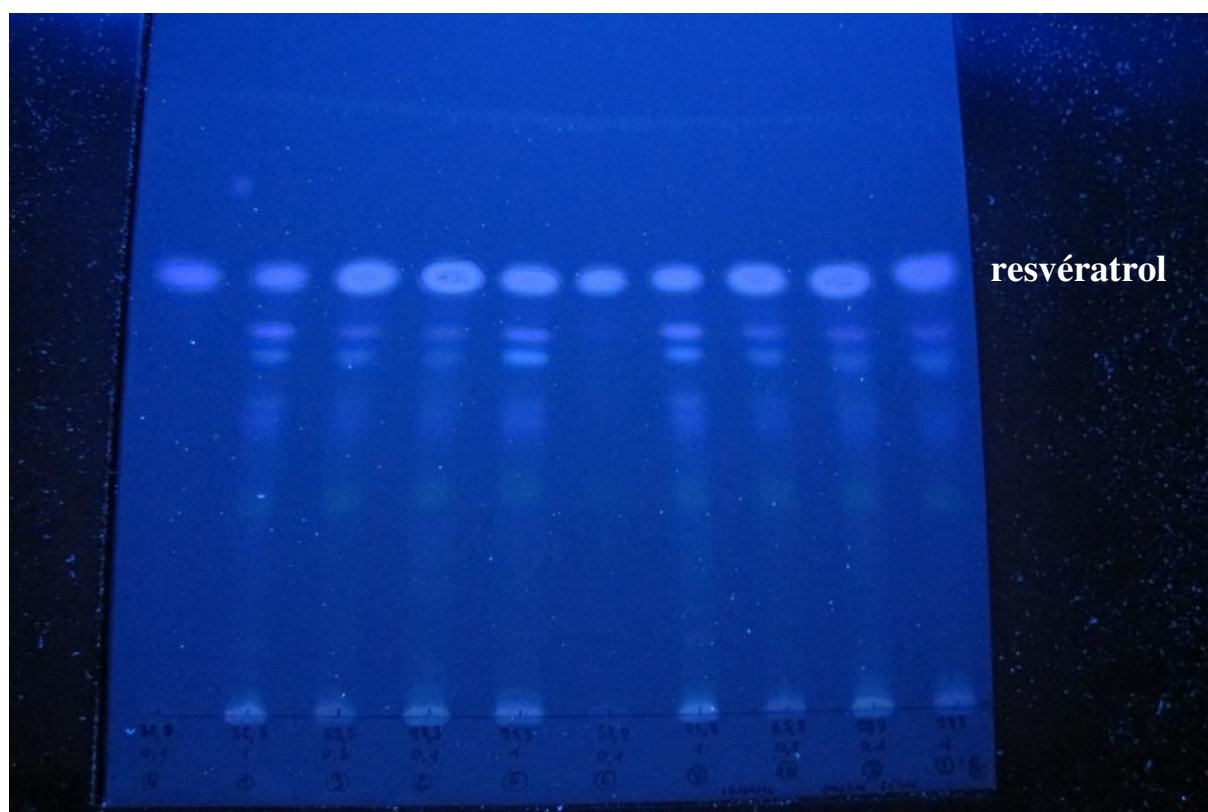


Figure 19 : Chromatographie sur couche mince réalisée sur des extraits de milieu de culture (suspensions de cellules Concord).

IX. Analyse des stilbènes

Le *trans*-resvératrol et la *trans*- ϵ -viniférine sont quantifiés par HPLC (Ultimate 3000, pression maximale 620 bar ; Thermofisher) incluant une pompe (LGP 3400 SD), un passeur d'échantillons (WPS 3000 TSL Analytical), un four de colonne (TCC 3000 SD) et un détecteur à barette de diodes (DAD 3000), en phase inverse à l'aide d'une colonne spécifique des stilbènes (2,1 mm x 100 mm Acclaim RSLC PolarAdvantage II contenant des particules de silice greffée C18 de 2,2 μ m dont le diamètre moyen des pores est 120 Å ; Dionex). Le profil d'élution est un gradient linéaire, décrit sur la figure 20. La phase mobile se compose d'eau ultra-pure (Millipore) en voie A et d'acétonitrile (Fisher; HPLC grade) en voie B. La pression est généralement comprise entre 200 et 450 bars. La température du four est 30°C. Les standards utilisés sont des standards commerciaux : resvératrol (Sigma) et ϵ -viniférine (Actichem).

Pour le resvératrol, la limite de détection est 0,5 mg/L et la limite de saturation est 100 mg/L, pour des injections de 10 μ L. La linéarité de la calibration est très bonne, $R^2 = 0.99994$ sur 50 points. L'écart-type relatif sur des injections du même vial a été calculé pour différentes concentrations. L'écart-type relatif moyen sur la partie linéaire de la courbe de calibration est 0,7% (le maximum étant 1,1%). L'équation obtenue pour la droite de calibration est :

$$A = 2,67 * [\text{resvératrol}]$$

où A représente l'aire du pic en mAU*min (AU est une unité arbitraire du signal) et [resvératrol], la concentration du resvératrol dans le vial en mg/L.

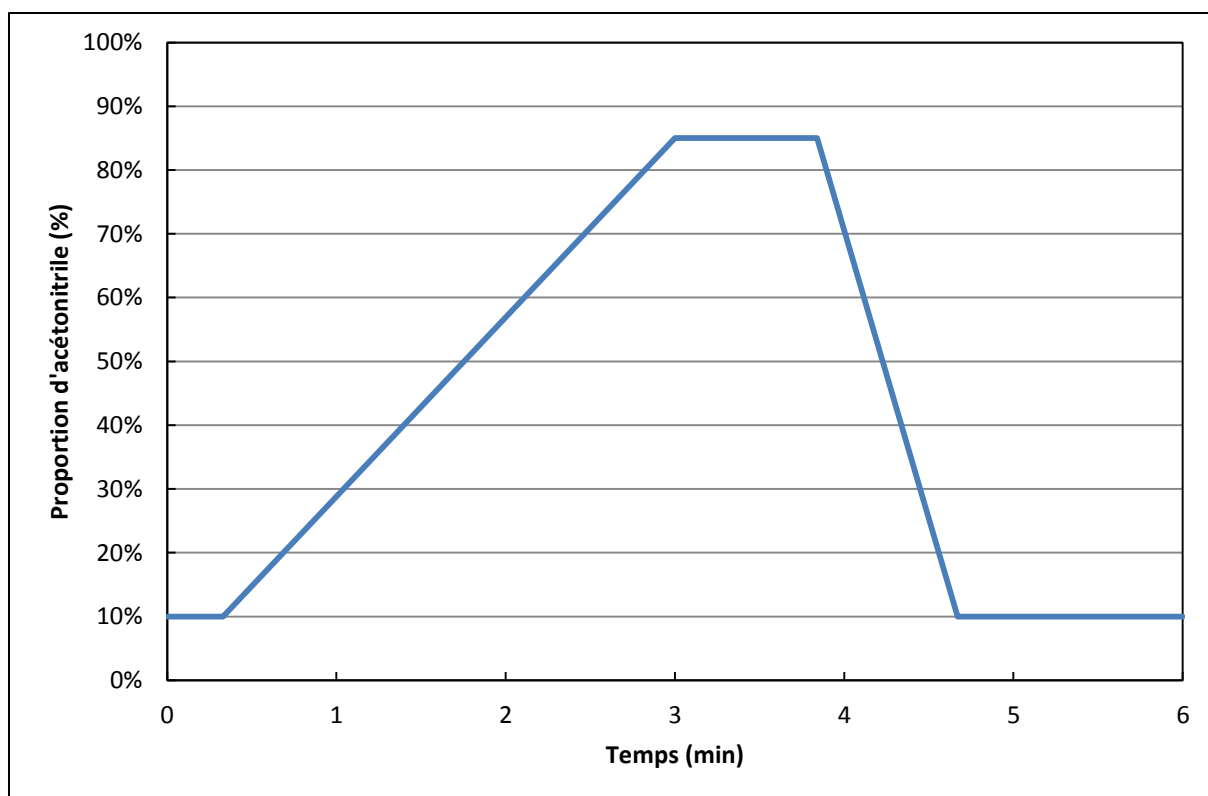


Figure 20 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des stilbènes. Le débit est constant et fixé à 0,5 mL/min. La proportion d'eau est donnée par le complémentaire à 100% de la proportion d'acétonitrile.

La figure 21 montre le type de chromatogramme obtenu. Le resvératrol est détecté après un temps d'élution d'environ 4,51 minutes. Nous avons constaté la présence d'un pic à 4,91 minutes qui pourrait être attribué à la production de viniférine, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en CCM qui montrent la présence de deux spots juste en-dessous de celui du resvératrol.

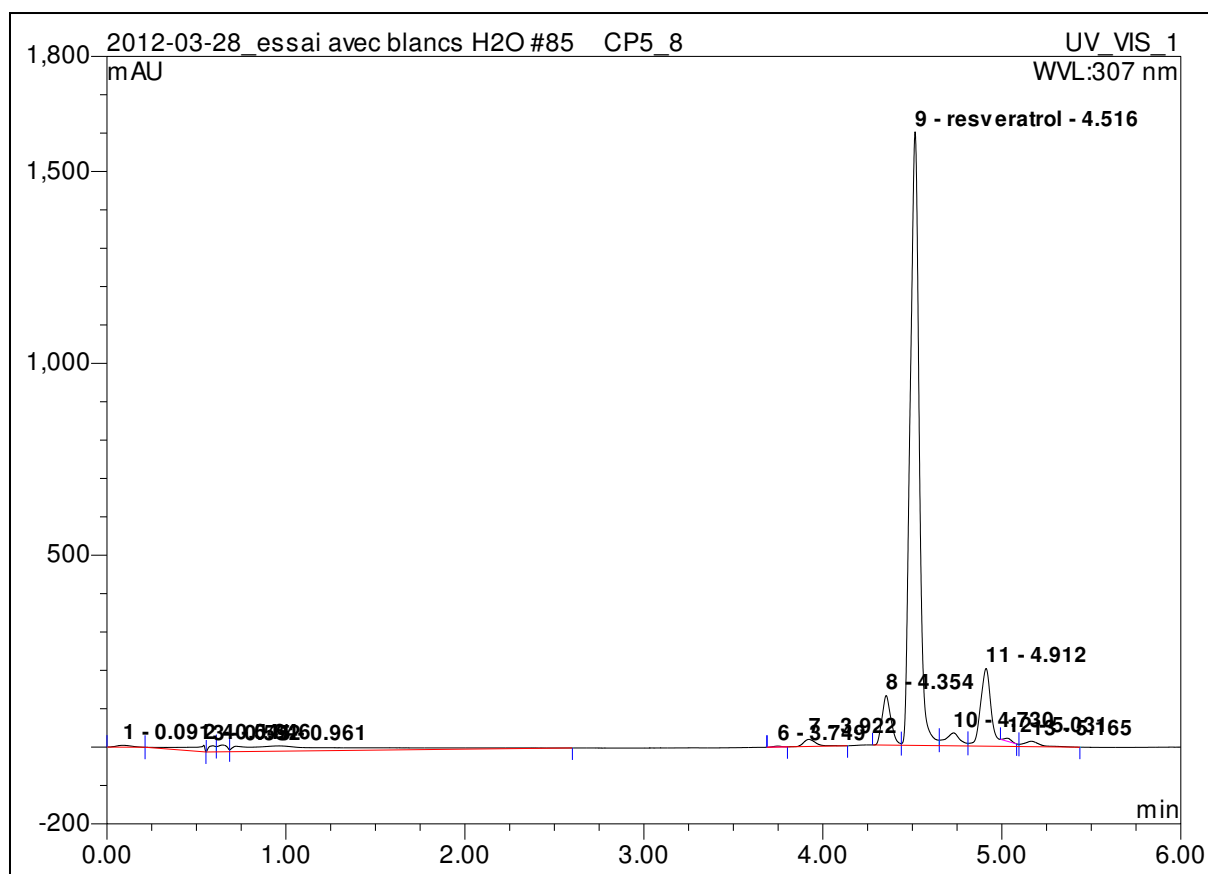


Figure 21 : Chromatogramme obtenu lors de l'analyse des stilbènes

X. Mise en œuvre des cultures

i. Expérimentations en fioles

La figure 22 expose le protocole général utilisé pour les expérimentations en fioles. Les fioles de 300 mL, contenant le milieu liquide, sontensemencées par une masse filtrée MF₀ de cellules Concord (ou 41B), le volume total de suspension dans une fiole étant 100 mL. Elles sont ensuite incubées dans les conditions décrites précédemment, pendant une durée variable selon les expériences. A l'issue de la phase de croissance, on injecte un certain volume d'une solution alcoolique de méthyljasmonate, de manière à obtenir la concentration désirée dans la suspension. Les fioles sont alors de nouveau incubées en présence de l'éliciteur pendant une durée variable. A la fin de l'expérience, on procède à une filtration sous vide de la suspension puis à une extraction liquide-liquide sur le filtrat par l'acétate d'éthyle. Le resvératrol est quantifié dans cet extrait par HPLC. Toutes ces étapes se font selon ce qui est décrit dans les paragraphes précédents.

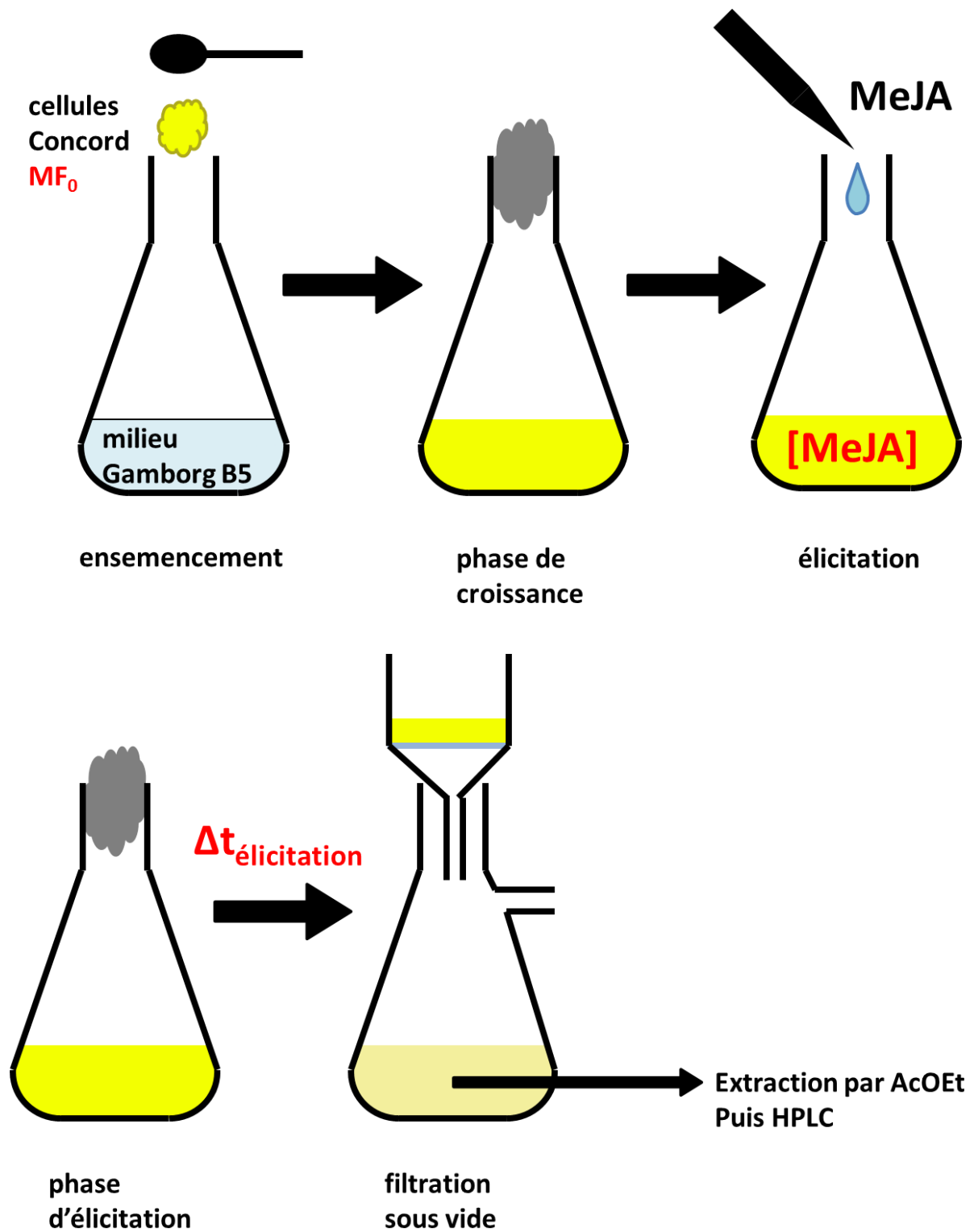


Figure 22 : Protocole général des expérimentations en fioles. Les paramètres que l'on peut faire varier sont indiqués en rouge.

ii. Expérimentations en bioréacteur

Un schéma du bioréacteur utilisé est représenté sur la figure 23. Le matériel est un bioréacteur de 5L constitué d'une cuve en verre entourée d'une double enveloppe parcourue par une circulation d'eau maintenant la culture à 23°C. L'agitation est assurée par une hélice. Un bullage d'air au fond de la cuve apporte l'oxygène nécessaire à la respiration cellulaire et deux sondes permettent le suivi du pH et de l'oxygène dissous.

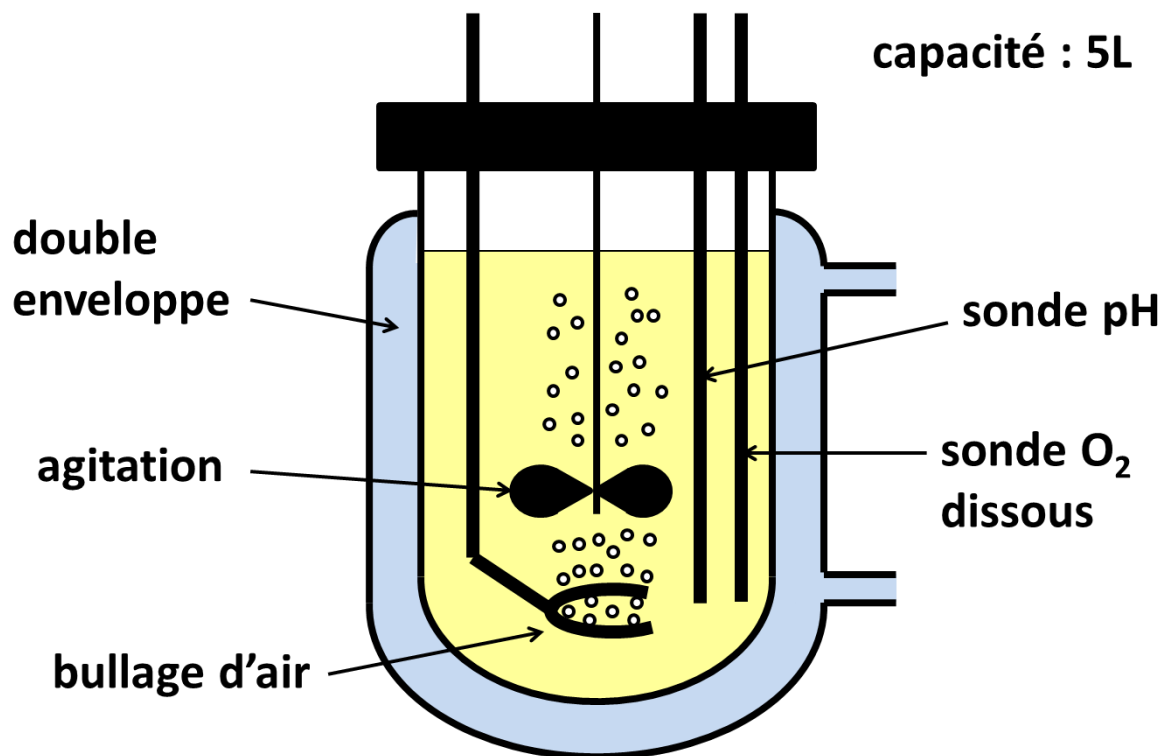


Figure 23 : Schéma du bioréacteur utilisé

Les figures 24 et 25 montrent des photographies du bioréacteur.



Figure 24 : Photographie du bioréacteur. On peut voir, au-dessus de la plate-forme, le moteur assurant la rotation de l'hélice, et devant la cuve, le système de prélèvement permettant le suivi de la culture.

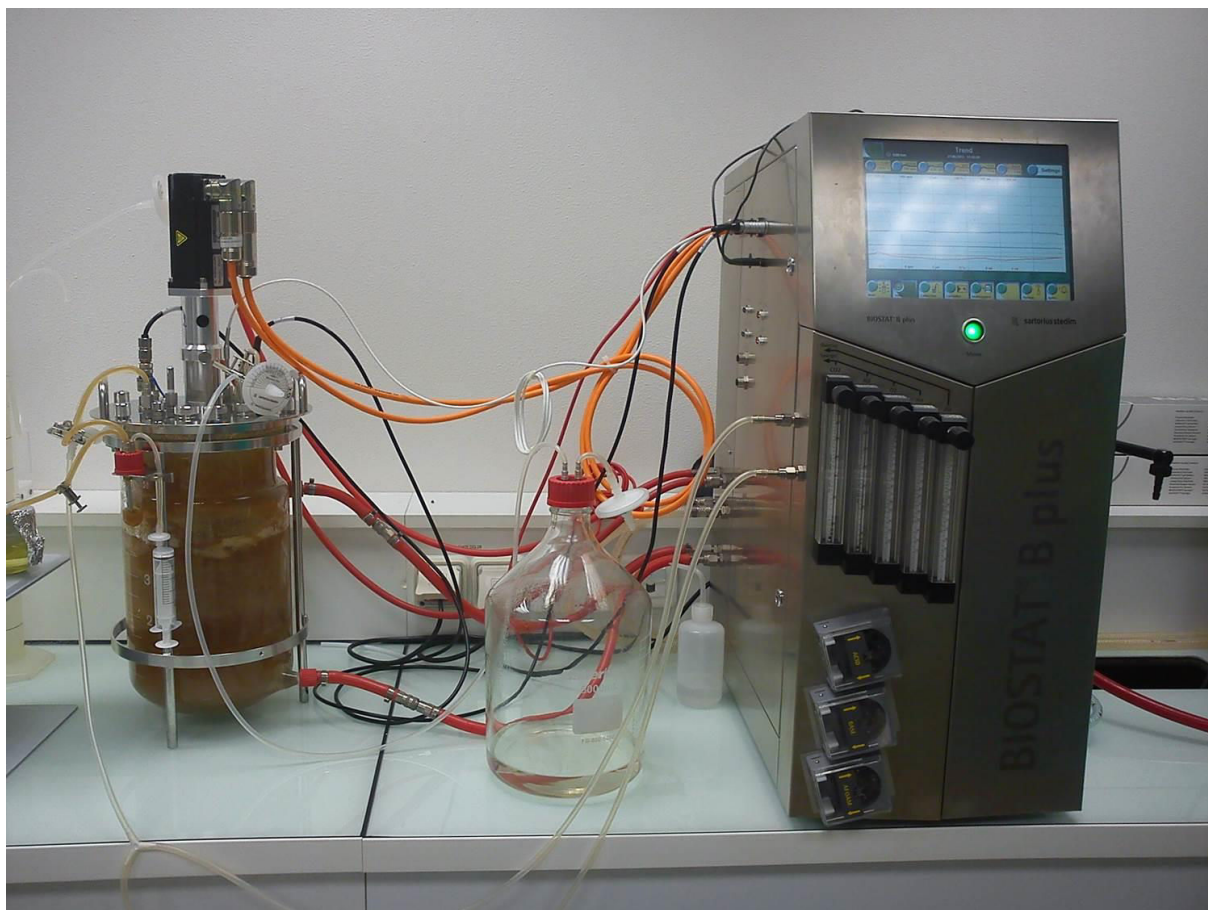


Figure 25 : Vue d'ensemble montrant l'interface de commande à droite. Un flacon de 5L (au centre) est utilisé pour effectuer des ajouts de milieu frais lorsque cela est nécessaire.

Le protocole utilisé pour les expérimentations en bioréacteur est présenté sur la figure 26. La cuve contenant le milieu liquide estensemencée par les cellules Concord. Après une première phase de croissance d'environ 6 jours, on procède à un premier rempotage jusqu'à 2L. Lorsque la biomasse a de nouveau atteint une concentration suffisante, un second ajout de milieu est effectué pour compléter la cuve jusqu'à son niveau maximal (5L). On laisse les cellules se multiplier pendant une troisième et dernière phase de croissance à l'issue de laquelle on élicite la suspension en injectant la solution éthanolique de méthyljasmonate. On entre ainsi dans la phase de production du resvératrol lors de laquelle des prélèvements quotidiens permettent le suivi du pH et de la concentration de la biomasse, des sucres, de l'oxygène dissous et du resvératrol excrété, ceci sur environ 3 semaines.

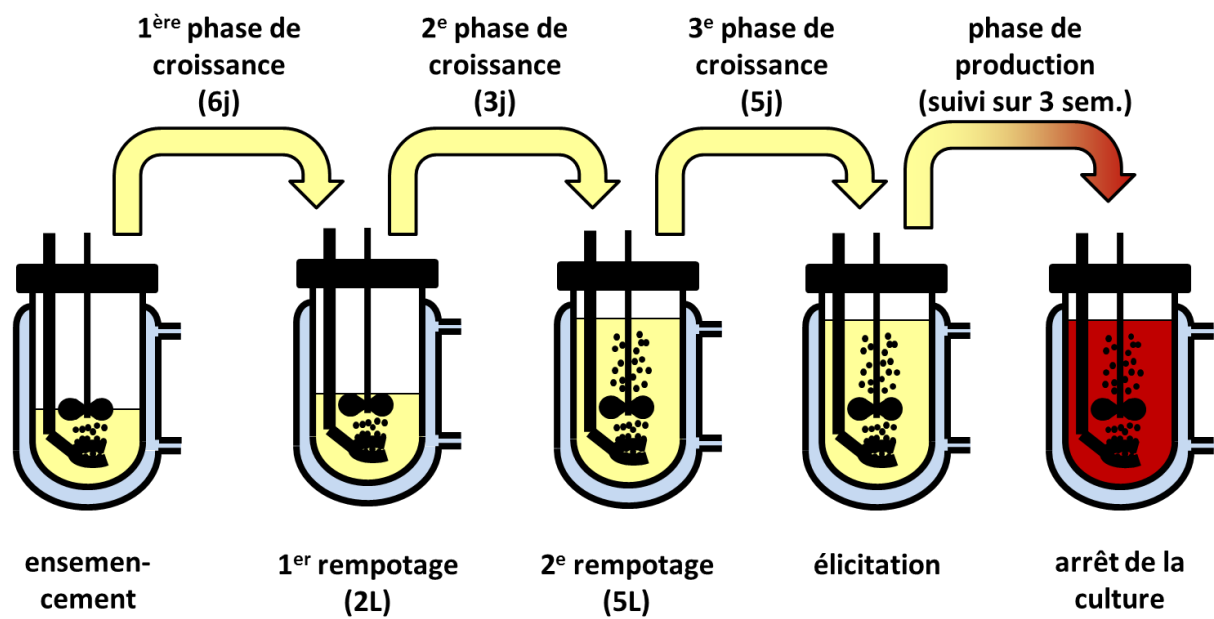


Figure 26 : Protocole des expérimentations en bioréacteur

Ci-dessous, une photographie de l'ensemencement du bioréacteur (Figure 27).



Figure 27 : Ensemencement du bioréacteur, effectué sous hotte à flux laminaire, à l'aide d'un entonnoir stérile

Partie 3 : Etude en fioles d'Erlenmeyer de 300 mL

I. Introduction

L'objet de cette première partie est l'étude des suspensions cellulaires en fioles d'Erlenmeyer de 300 mL. Celle-ci vise à mieux connaître le comportement des différentes souches sous l'effet de divers paramètres.

Elle comprend plusieurs volets : des premiers essais en élicitation simple et élicitation croisée (avec deux éliciteurs), la caractérisation de la croissance de la biomasse, la recherche d'un optimum de production de resvératrol par la mise en place d'un plan d'expériences, l'exploration d'une méthode d'extraction alternative à l'extraction par l'acétate d'éthyle des stilbènes à l'aide de résines et, enfin, des perspectives concernant les pistes qui restent à explorer en fioles.

II. Description de la mise en culture

Avant la mise en culture, les fioles sont remplies de 90 mL de milieu fraîchement préparé, puis bouchées à l'aide de coton cardé enveloppé de gaze. Elles sont alors autoclavées comme décrit ci-dessus. Après refroidissement complet, les fioles sont ensemencées sous hotte à flux laminaire par les cellules (généralement 10,0 g) qui ont été préalablement égouttées sur tamis (500 μm), ce qui correspond à 56,3 g/L de masse fraîche filtrée. Pour améliorer l'homogénéité entre les inocula, le contenu de trois fioles de routine est rassemblé dans une fiole de 500 mL et homogénéisé avant d'être égoutté.

III. Premiers essais sur les souches 41B et Concord

Les premiers essais en fiole ont concerné la variété 41 B, déjà cultivée et caractérisée au laboratoire. L'objectif de ces expériences était de confirmer l'effet éliciteur du méthyljasmonate sur la souche et d'essayer un nouveau type de molécule élicitrice, la méthyl- β -cyclodextrine. Cette dernière a été testée seule, afin de comparer son influence à celle du méthyljasmonate, et en élicitation croisée avec le méthyljasmonate.

i. Protocole expérimental

Trois expérimentations successives sont menées sur la souche 41 B. Pour chacune d'elles, 15 fioles sont préparées selon le procédé décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». 8 fioles

sont préparées avec le milieu habituel et 7 fioles avec le même milieu additionné de méthyl- β -cyclodextrine (CAVASOL W7 M, Wacker) à une concentration de 65,5 g/L (50 mM). C'est une masse très importante, c'est pour cette raison que l'on a choisi de l'introduire dès le début de l'expérimentation. Son ajout en cours de cinétique modifierait en effet le volume total de la suspension et donc la concentration des autres constituants, faussant ainsi l'analyse des résultats. Ceci montre aussi la grande solubilité des cyclodextrines dans l'eau, propriété qui participe aux avantages qu'elles présentent, comme nous le verrons par la suite. Les fioles sont ensuite autoclavées, puis ensemencées à l'aide de suspensions de cellules 41 B (8-10 g de cellules égouttées par fioles d'où 45,0-56,3 g/L de masse fraîche filtrée, suivant l'expérimentation).

Une fiole témoin (sans cyclodextrine) est séparée, son contenu filtré et la masse fraîche est pesée afin de quantifier la biomasse inoculée. Après une phase d'incubation (7-8 jours), deux fioles sont récupérées, l'une témoin (sans éliciteur), l'autre contenant la cyclodextrine seule ; ceci permet de quantifier la biomasse juste avant l'élicitation au méthyljasmonate, dans les deux cas (avec et sans cyclodextrine) ; le milieu contenu dans ces fioles est lavé avec de l'acétate d'éthyle pour vérifier l'absence de production de stilbènes en conditions témoins et quantifier la production avec cyclodextrine, dans cette première phase. En ce qui concerne les autres fioles, un volume de la solution de méthyljasmonate est ajouté dans 3 fioles témoins (sans cyclodextrine) d'une part, et dans 3 fioles contenant la méthyl- β -cyclodextrine d'autre part, de façon à obtenir une concentration de 0,2 mM de méthyljasmonate dans la suspension. Il n'y a pas d'ajout de méthyljasmonate dans les 6 autres fioles.

Après une seconde phase (6 jours) en présence ou non de méthyljasmonate, les 12 fioles restantes sont traitées pour mesurer la masse fraîche et le milieu est lavé avec de l'acétate d'éthyle pour extraire les stilbènes. On a ainsi quatre conditions différentes : témoins, élicitation avec méthyljasmonate seul, élicitation avec cyclodextrine seule et élicitation croisée méthyljasmonate – cyclodextrine, chacune d'elle étant réalisée en triplicat.

ii. Résultats obtenus sur la souche 41 B

Les résultats obtenus pour les trois expériences sont rassemblés dans le tableau 3.

Tableau 3. Concentrations du resvératrol et de l'ε-viniférine excrétés dans le milieu de culture par les cellules 41 B. Dans ce tableau, « MF₀ » est la masse filtrée à l'ensemencement, « t₁ » est la durée de la phase de croissance sans MeJA, « t₂ » est la durée d'incubation en présence de MeJA et « MF_f » est la masse filtrée à la fin de l'expérience.

N° de l'essai	MF ₀ (g/L)	[CD] (mM)	[MeJA] (mM)	t ₁ (j)	t ₂ (j)	MF _f (g/L)	Écart type MF _f (%)	[resv] (mg/L) (mM)	Écart type [resv] (%)	[ε-vinif] (mg/L) (mM)	Écart type [ε- vinif] (%)
1	45	0	0	8	0	100,0	0	0,0 (0,00)	-	0,2 (0,00)	0
2	56,3	0	0	7	0	66,7	14	0,4 (0,00)	100	0,1 (0,00)	100
3	45	50	0	8	0	89,5	0	130,3 (0,57)	0	3,2 (0,01)	0
4	56,3	50	0	7	0	42,5	44	69,8 (0,31)	90	1,2 (0,00)	50
5	45	0	0	14	0	283,8	2	1,1 (0,00)	90	0,0 (0,00)	-
6	56,3	0	0	13	0	274,4	9	0,0 (0,00)	122	0,0 (0,00)	-
7	45	0	0,2	8	6	203,5	7	5,9 (0,03)	24	1,0 (0,00)	16
8	56,3	0	0,2	7	6	115,7	17	4,5 (0,02)	98	1,4 (0,00)	94
9	45	50	0	14	0	190,6	4	221,2 (0,97)	19	7,6 (0,02)	102
10	56,3	50	0	13	0	159,8	39	69,9 (0,31)	109	0,0 (0,00)	-
11	45	50	0,2	8	6	125,1	1	1897,0 (8,31)	26	69,7 (0,15)	29
12	56,3	50	0,2	7	6	74,6	63	1636,8 (7,17)	20	72,6 (0,16)	37

Production de biomasse fraîche

Les résultats (Figure 28) montrent que la biomasse obtenue à l'issue de l'expérience dépend fortement des conditions ; elle est presque réduite de moitié, comparativement au témoin, après élicitation avec l'un des deux éliciteurs utilisé seul et elle est divisée par trois en élicitation croisée. Ceci confirme le caractère d'inhibiteur de croissance du méthyljasmonate (MeJA), qui met en compétition le développement des mécanismes de défense avec les

fonctions primaires des cellules. Sur ce point, la cyclodextrine étudiée semble avoir le même effet. Ces deux effets inhibiteurs s'ajoutent lors de l'éllicitation croisée.

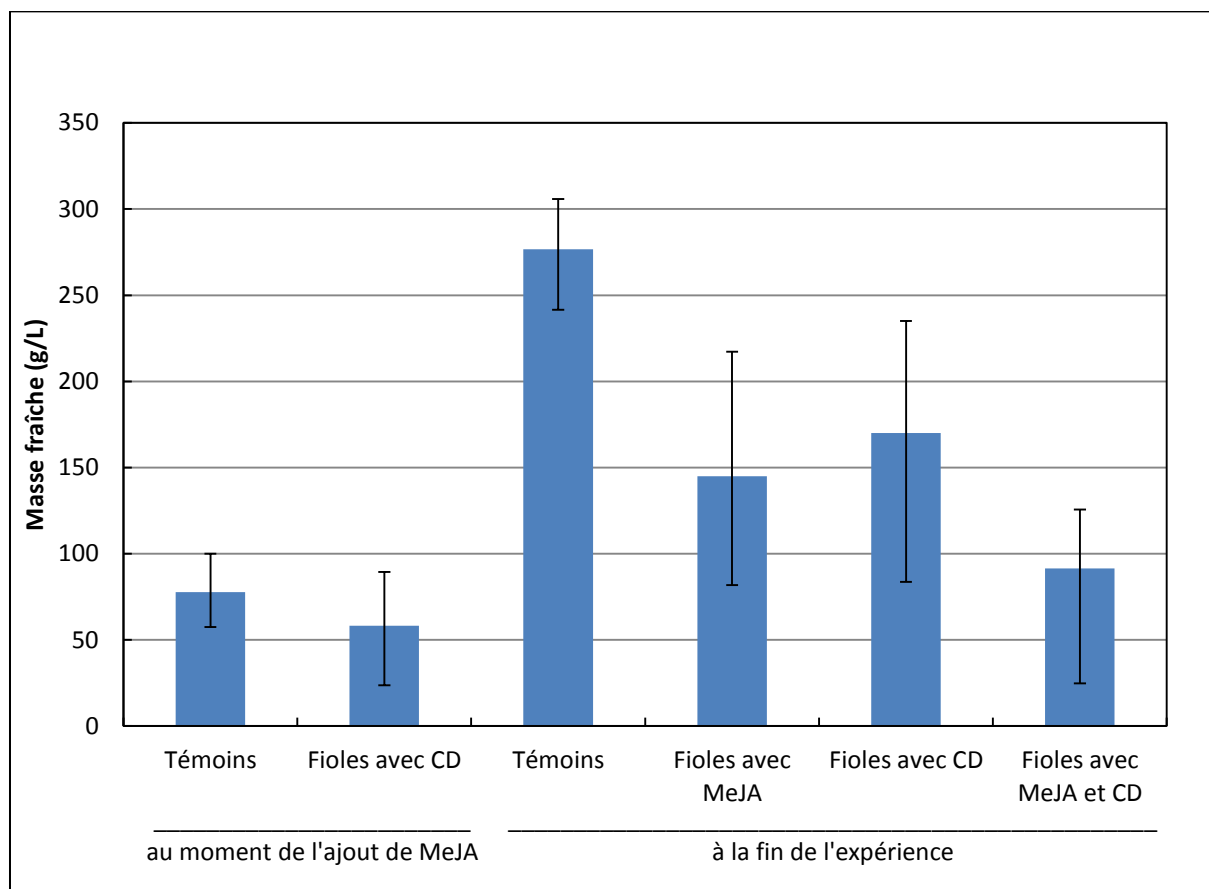


Figure 28 : Concentration de la biomasse fraîche à l'issue de l'expérience, pour la variété 41 B

Intérêt de la double éllicitation pour la production de resvératrol

La concentration de resvératrol dans le milieu de culture varie à peu près dans le sens inverse de la biomasse. L'éllicitation par le MeJA seul donne des concentrations relativement faibles de resvératrol (4,9 mg/L en moyenne, tableau 3, essais n°7 et 8). En revanche, la méthyl- β -cyclodextrine permet d'obtenir des concentrations près de 25 fois plus élevées (120 mg/L en moyenne, essais n°9 et 10). Enfin, ce qui est spectaculaire, l'éllicitation croisée donne des concentrations record pour un métabolite secondaire (plus de 1700 mg/L en moyenne et plus de 2500 mg/L sur une des fioles, essais n°11 et 12). Ce dernier résultat semble indiquer une potentialisation des effets des deux éliciteurs.

Production d'ε-viniférine

La production d'ε-viniférine suit à peu près la même tendance que celle du resvératrol, à ceci près qu'elle se fait en moindre quantité (71,7 mg/L en moyenne pour l'élicitation croisée qui est de loin la plus avantageuse, essais n°11 et 12). Toutefois la présence de cyclodextrine semble défavoriser la synthèse des viniférines, contrairement au MeJA. Les cellules produisent en moyenne 1,9 fois plus d'ε-viniférine avec la cyclodextrine (essais n°9 et 10) comparativement au MeJA seul (essais n°7 et 8), alors que ce facteur était de 25 pour le resvératrol. On tentera d'expliquer ce phénomène par la suite.

Discussion à propos de l'influence de la cyclodextrine

Pour résumer l'effet global de la méthyl-β-cyclodextrine sur les cellules, elle diminue la croissance cellulaire, mais dans une moindre mesure que le MeJA ; elle favorise très nettement la production de resvératrol ; en revanche, cet effet est moins marqué pour l'ε-viniférine ; enfin l'élicitation croisée produit une explosion de la synthèse de ces deux métabolites en parallèle d'une réduction drastique de la biomasse.

Plusieurs hypothèses non contradictoires peuvent expliquer ces effets. Le premier aspect est l'action élicitrice en elle-même. Rappelons que la méthyl-β-cyclodextrine est un oligosaccharide, c'est-à-dire une molécule constituée de quelques unités glucoses. Nous avons vu que les mécanismes de défense induits pouvaient être déclenchés par des MIMPs (Microbe-Induced Molecular Pattern) qui correspondent aux produits de dégradation des tissus de la plante par le pathogène (soi modifié). Or, les oligosaccharides sont tout à fait susceptibles de résulter de la dégradation des polysaccharides de la plante comme la cellulose ou l'amidon. Ceci expliquerait ainsi l'effet éliciteur.

Ces éléments ne sont pas suffisants pour expliquer la synthèse importante des stilbènes, comparativement à ce qui se passe avec les éliciteurs ordinaires, au-delà de la différence de concentration des éliciteurs. D'autres considérations s'imposent. De par sa configuration dans l'espace, la molécule de méthyl-β-cyclodextrine forme un tronc conique (Figure 29) capable d'abriter un composé relativement apolaire comme le resvératrol. En effet, la méthylation des groupements hydroxyles qui se trouvent tournés vers l'intérieur de cette cage moléculaire, permet de créer un petit espace hydrophobe au sein même de la solution aqueuse. Comme la méthyl-β-cyclodextrine est par ailleurs très soluble dans l'eau, elle va encapsuler le resvératrol excrété en très grande quantité dans le milieu extracellulaire. C'est d'ailleurs cette propriété qui est utilisée dans les nombreux usages de cette molécule : encapsulation des principes actifs des médicaments pour augmenter leur biodisponibilité, des polluants pour favoriser leur extraction, etc.

Cette propriété d'encapsulation conduit à formuler plusieurs hypothèses. La plus évidente est que ce phénomène favorise de très loin la solubilisation du resvératrol. Sans cyclodextrine, les

cellules se trouvent confrontées à la limite de solubilité intrinsèque du resvératrol dans l'eau (de l'ordre de 46 mg/L) et se voient obligées de l'accumuler, par exemple dans leur paroi, ce qui est limitant. Une deuxième hypothèse consiste à remarquer que l'encapsulation pourrait préserver le resvératrol contre sa dégradation, soit par oxydation, soit par métabolisation. Elle peut effectivement empêcher le contact du resvératrol avec l'oxygène dissous ou d'autres espèces oxydantes présentes dans le milieu, ou avec les enzymes relarguées par les cellules, permettant ainsi son accumulation dans le milieu. Le fait que la production d' ϵ -viniférine soit limitée par l'usage de la cyclodextrine seule, malgré une synthèse importante de resvératrol, vient étayer cette hypothèse puisque la synthèse des viniférines nécessite la disponibilité du resvératrol comme précurseur. Une troisième hypothèse, complémentaire des précédentes, concerne l'effet toxique du resvératrol sur les cellules. Comme acteur de la défense, celui-ci est en effet destiné à détruire le pathogène mais la contre-partie est le danger que représente son accumulation pour la cellule végétale elle-même. En le confinant et évitant ainsi son contact avec les cellules, les molécules de cyclodextrine pourraient exercer un effet protecteur sur ces dernières et leur éviter la mort cellulaire. Ceci est confirmé par leur influence plutôt bénéfique sur la biomasse, plus importante avec la cyclodextrine que le méthyljasmonate. Enfin, une dernière hypothèse serait la suppression d'une éventuelle rétroaction inhibitrice que le resvératrol, sans cyclodextrine, exercerait sur sa propre synthèse. Mais cette hypothèse pourrait être contredite par des considérations de possible auto-induction (mécanisme opposé), que nous développerons dans le chapitre suivant.

Une observation tout à fait notable est intéressante à souligner ici. Lors des expérimentations, on constate que, suite à l'élicitation par le MeJA seul, les suspensions changent souvent d'aspect concernant leur couleur ou leur consistance. Dans les conditions témoins, elles sont jaune clair. Après élicitation, elles deviennent très fréquemment brun-rouge, voire presque noires, parfois plus verdâtres et moins visqueuses. Là encore, plusieurs hypothèses peuvent être avancées : la couleur foncée peut provenir d'une oxydation des lipides des membranes des cellules détruites ou bien de la formation de quinones, composés brun-rouge, par oxydation des stilbènes. En présence de cyclodextrine seule, en revanche, les suspensions gardent systématiquement leur aspect jaune clair, ce qui étaye fortement les hypothèses de protection des cellules d'une part et du resvératrol d'autre part.

Enfin, on constate qu'en élicitation croisée, la biomasse est fortement réduite, le resvératrol est partiellement métabolisé en ϵ -viniférine et on observe aussi une coloration encore plus foncée des suspensions.

La dégradation des cellules est certainement liée à la présence du MeJA, en effet si on fait le calcul de la concentration de resvératrol libre (non encapsulé), elle est très faible, de l'ordre de 0,026 mM, ce qui correspond à 99,7% du resvératrol encapsulé. Quant à la concentration de viniférines, elle est de 0,16 mM.

Pour calculer la répartition du resvératrol entre la solution et la cyclodextrine, nous avons utilisé la constante d'équilibre d'encapsulation donnée par Morales *et al.*, 1998, qui est de 6951 M^{-1} , à la température que nous utilisons. La stoechiométrie du composé formé est 1:1.

Les résultats expérimentaux sont les suivants : $[\text{resv}]_{\text{total}} = 7,6 \text{ mM}$, $[\epsilon\text{-vinif}] = 0,16 \text{ mM}$ et les bilans sur le resvératrol et la cyclodextrine:

$$[\text{resv}]_{\text{total}} = [\text{resv}]_{\text{libre}} + [\text{resv}]_{\text{encapsulé}} = 7,6 \text{ mM}$$

$$[\text{CD}]_{\text{total}} = [\text{CD}]_{\text{libre}} + [\text{resv}]_{\text{encapsulé}} = 50 \text{ mM}$$

En écrivant la constante d'équilibre, il vient :

$$6951 = \frac{[\text{resv}]_{\text{encapsulé}}}{[\text{resv}]_{\text{libre}} [\text{CD}]_{\text{libre}}}$$

A partir de ces équations, on peut calculer la répartition du resvératrol entre la solution et les molécules encapsulantes.

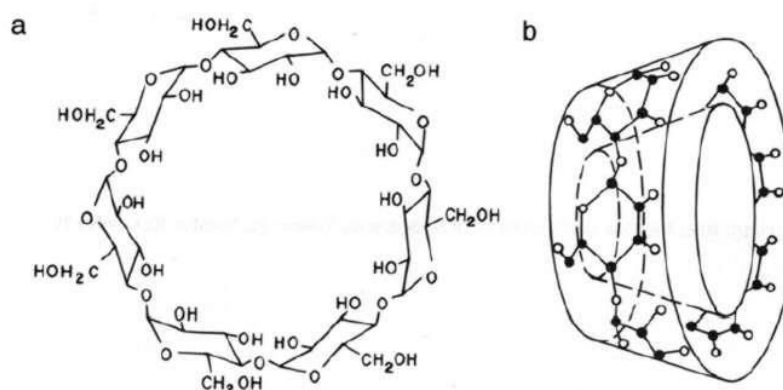


Figure 29 : Structure de la β -cyclodextrine, non méthylée. La taille de la cavité est 0,70 nm.

iii. Résultats obtenus sur la souche Concord

Deux expérimentations successives ont été menées sur la souche Concord, selon le même protocole que celui utilisé pour la souche 41 B, à l'exception du délai d'exposition au MeJA pour la seconde expérience, qui est de 7 jours au lieu de 6. Ceci permet d'avoir un premier aperçu sur les cinétiques mises en jeu dans le système. Il faut ajouter que, pour la première expérience, il n'y a pas eu de prélèvement, ni de mesure, au moment de l'élicitation au MeJA. Les concentrations de biomasse mesurées sont présentées dans la figure 30. Les concentrations de resvératrol et d' ϵ -viniférine obtenues sont rassemblées dans le tableau 4.

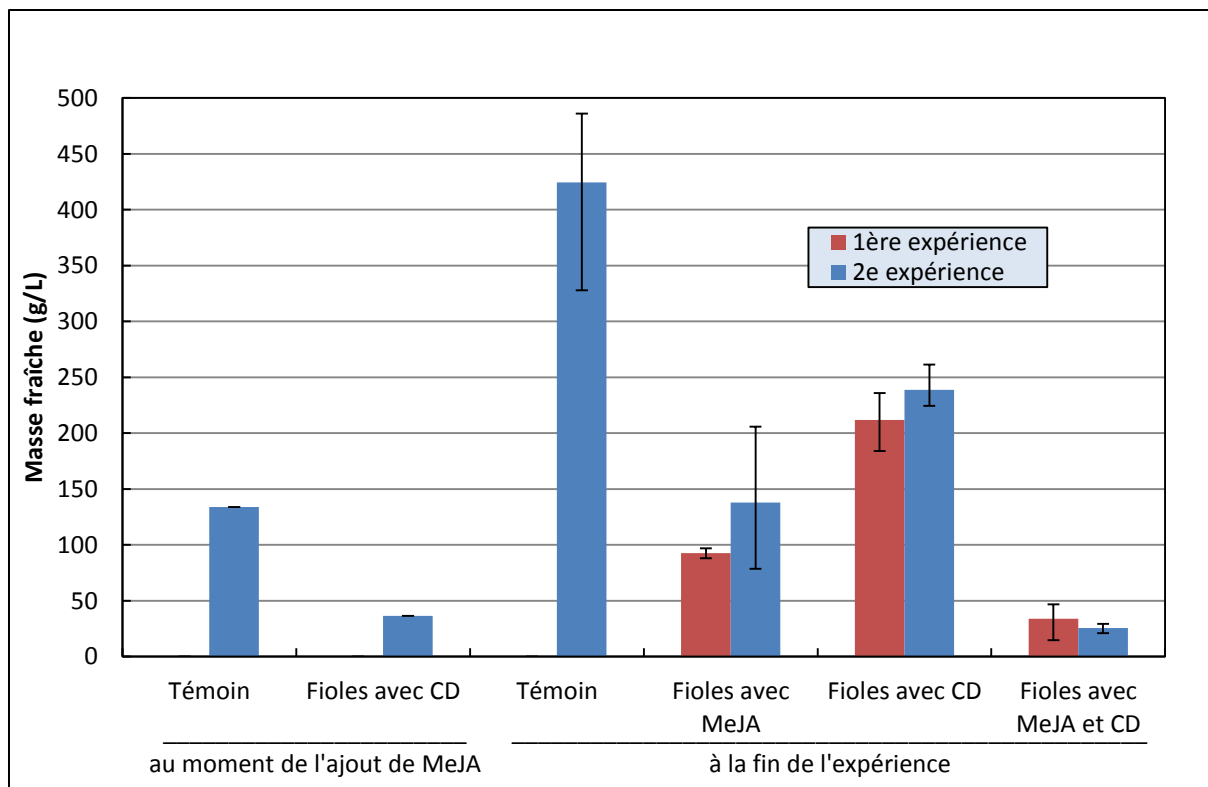


Figure 30 : Concentration de la biomasse fraîche à l'issue de l'expérience, pour la variété Concord

Fin de la 1^{ère} expérience : 6 jours après ajout de MeJA ; fin de la 2^{ème} expérience : 7 jours

Tableau 4. Concentrations du resvératrol et de l'ε-viniférine excrétés dans le milieu de culture par les cellules Concord. Dans ce tableau, « MF₀ » est la masse filtrée à l'ensemencement, « t₁ » est la durée de la phase de croissance sans MeJA, « t₂ » est la durée d'incubation en présence de MeJA et « MF_f » est la masse filtrée à la fin de l'expérience.

N° de l'essai	MF ₀ (g/L)	[CD] (mM)	[MeJA] (mM)	t ₁ (j)	t ₂ (j)	MF _f (g/L)	Écart type MF _f (%)	[resv] (mg/L) (mM)	Écart type [resv] (%)	[ε-vinif] (mg/L) (mM)	Écart type [ε-vinif] (%)
1	56,3	0	0	7	0	133,9	0	0,1 (0,00)	0	0,0 (0,00)	-
2	56,3	50	0	7	0	36,5	0	112,2 (0,49)	0	3,0 (0,01)	0
3	56,3	0	0	13	0	424,4	16	0,2 (0,00)	141	0,0 (0,00)	-
4	56,3	0	0,4	7	6	92,7	4	3,0 (0,01)	12	2,6 (0,01)	17
5	56,3	0	0,4	7	7	137,8	38	3,3 (0,01)	68	0,9 (0,00)	101
6	56,3	50	0	13	0	211,9	10	130,3 (0,57)	33	1,4 (0,00)	141
7	56,3	50	0	14	0	238,9	7	154,8 (0,68)	13	4,8 (0,01)	35
8	56,3	50	0,4	7	6	33,9	41	1240,9 (5,44)	42	49,9 (0,11)	30
9	56,3	50	0,4	7	7	25,6	13	307,3 (1,35)	37	111,9 (0,25)	26

De manière générale, ces résultats confirment les précédents. On constate, dans le cas de l'éllicitation croisée (essais n°8 et 9), que le jour supplémentaire d'éllicitation pour la seconde expérience a fait chuter le niveau de resvératrol pour favoriser l'apparition de l'ε-viniférine. Cependant, tout le resvératrol disparu n'est pas transformé en ε-viniférine. En effet, 68% du resvératrol s'est transformé en autre chose que l'ε-viniférine : autres viniférines, autres stilbènes, produits de dégradation, d'oxydation. Mais pour ce faire, le resvératrol encapsulé a dû se libérer, ce qui confirme bien que l'encapsulation est un mécanisme équilibré et non une réaction totale. On confirme le fait qu'en éllicitation croisée, la concentration de biomasse décroît fortement en liaison avec la présence du MeJA et les assez fortes concentrations d'ε-viniférine, ce qui semblerait suggérer un effet toxique sur les cellules plus important pour l'ε-viniférine que pour le resvératrol. On peut aussi imaginer que les autres composés formés à partir du resvératrol ont une action toxique sur les cellules.

IV. Cinétique de croissance en fiole de la souche Concord

Nous venons de voir que la variété Concord se prête tout aussi bien à l'élicitation que la variété 41B et produit des stilbènes dans les mêmes proportions que la variété 41 B. Sachant de plus que la souche Concord est, comme nous l'avons déjà dit, de croissance plus rapide que la souche 41 B, notre choix s'est porté sur elle pour l'étudier plus précisément. Voici, ci-après, la caractérisation de sa croissance en fiole (Figure 31A). Celle-ci donne un taux de croissance spécifique $\mu = 0,0093 \text{ h}^{-1}$ ($\mu = 0,22 \text{ j}^{-1}$) et un temps de doublement $T_d = 74,5 \text{ h}$ ($T_d = 3,10 \text{ j}$), déterminés sur la figure 31B, en échelle semi logarithmique. La croissance s'arrête lorsque la masse fraîche atteint 428 g/L ; cette phase stationnaire est due à l'épuisement d'un des substrats nécessaires à la croissance, nous essaierons par la suite de déterminer lequel.

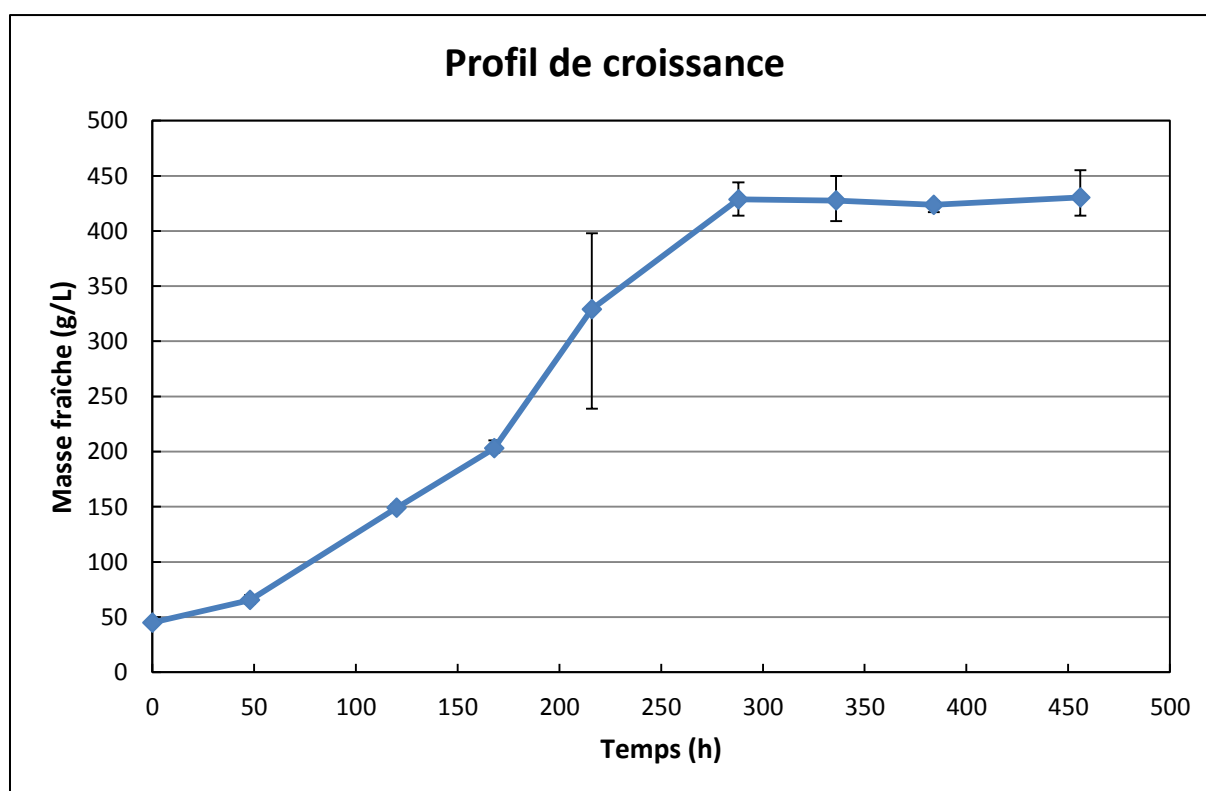


Figure 31A : Profil de croissance des cellules végétales Concord, en fiole de 300 mL.

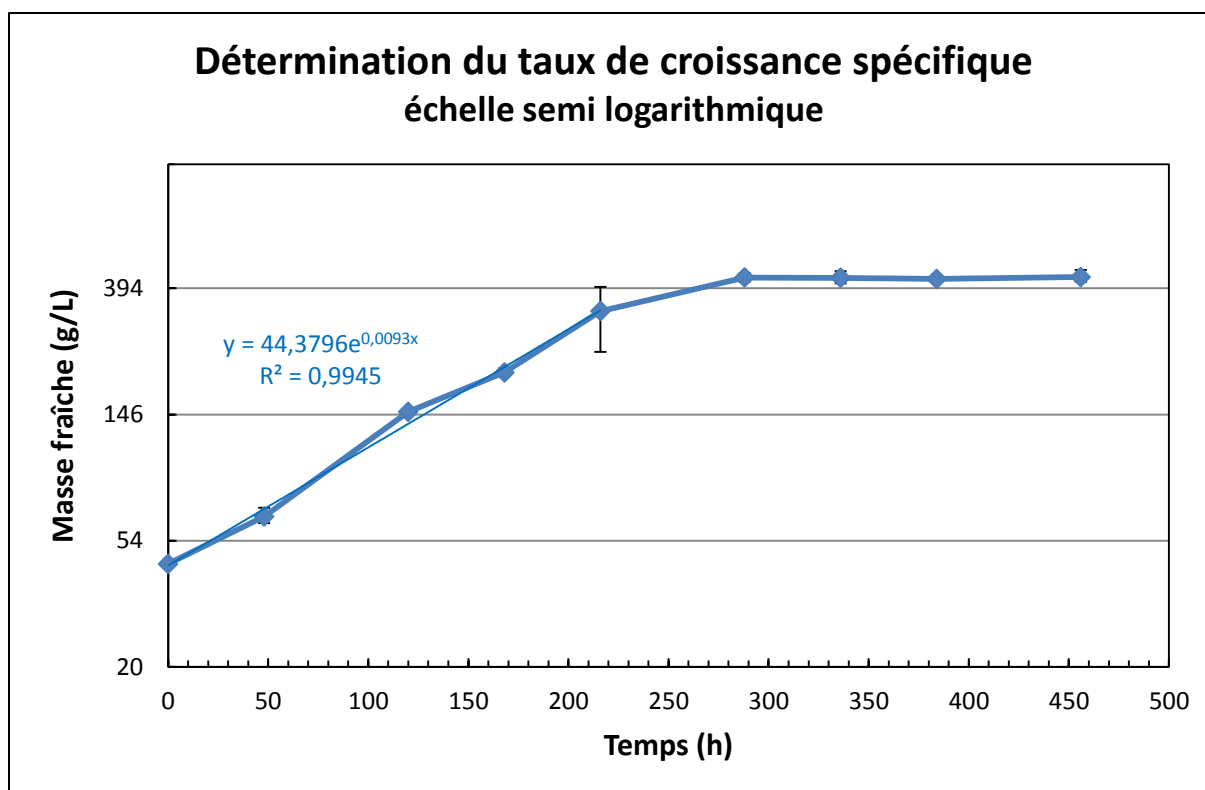


Figure 31B : Profil de croissance des cellules végétales Concord, en fiole de 300 mL, représentation semi-logarithmique.

V. Etude de l'influence de différents paramètres

Suite à ces résultats préliminaires, une deuxième série d'expérimentations a été effectuée pour connaître plus précisément la réponse de la souche Concord dans différentes circonstances. Six expériences ont ainsi été menées. Dans chacune d'elle, cinq conditions différentes sont testées en duplicat : une condition centrale pour laquelle on sait que les cellules produisent des stilbènes, et quatre conditions extrêmes où l'on fait varier deux paramètres seulement, les fixant soit à une valeur minimale, soit à une valeur maximale. Si P_1 et P_2 sont les deux paramètres variables, les points testés sont donc :

$$(P_1, P_2) = (\text{Moy}_1, \text{Moy}_2) ; (\text{Min}_1, \text{Min}_2) ; (\text{Min}_1, \text{Max}_2) ; (\text{Max}_1, \text{Min}_2) ; (\text{Max}_1, \text{Max}_2)$$

Les paramètres que l'on peut faire varier sont les suivants : la concentration de la biomasse dans la suspension (mesurée par la masse fraîche MF au début de la culture), le délai entre l'inoculation et l'élicitation au MeJA (phase de croissance sans éliciteur), la concentration en MeJA et enfin la durée entre l'élicitation au MeJA et l'arrêt de l'expérience.

Les expériences se déroulent sur une période totale de 14 jours ; l'élicitation est réalisée en général après 7 jours de culture.

i. Détermination des intervalles de concentration adéquats pour la production de resvératrol

Dans les deux premières expériences, on cherche à déterminer des bornes pertinentes pour les intervalles de concentration, en particulier pour celle du MeJA. On fait ainsi varier la concentration en biomasse initiale (notée MF_0) et celle du MeJA de la façon suivante : le point central est fixé à $MF_0 = 56,3$ g/L à l'inoculum (valeur utilisée dans les essais préliminaires) et $[MeJA] = 0,5$ mM. Les valeurs minimale et maximale de la masse fraîche sont choisies à 28,1 et 84,4 g/L (0,5 et 1,5 fois la valeur centrale) et celles de la concentration en MeJA sont fixées à 0,1 ; 0,3 ; 0,7 et 1 mM. Ces neuf conditions sont représentées sur la figure 32.

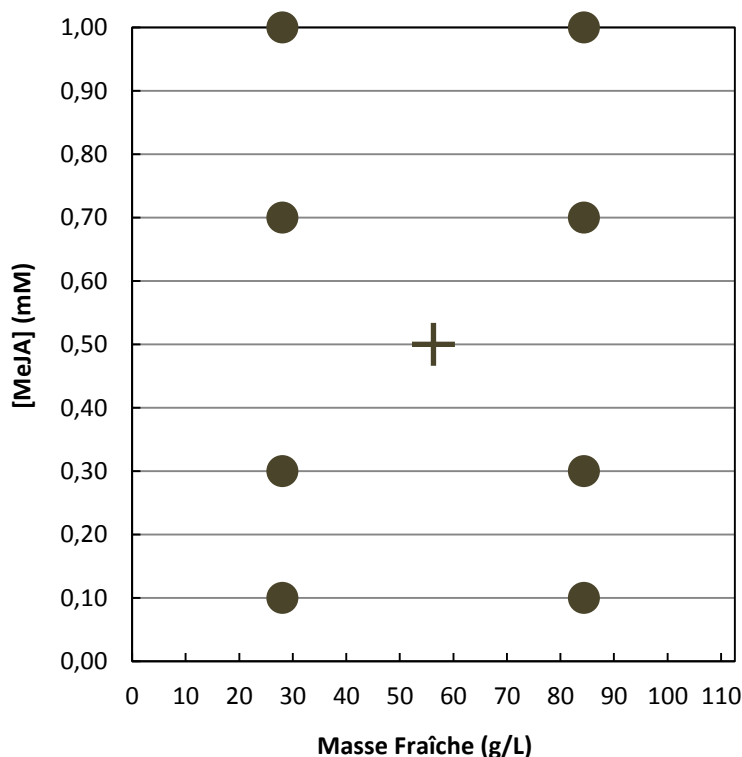


Figure 32 : Conditions expérimentales des expériences 1 et 2

Les résultats (Tableau 5) sont les suivants au bout de 14 jours : au point central ($MF = 56,3$ g/L et $[MeJA] = 0,5$ mM), comme on pouvait l'attendre, il y a synthèse de resvératrol (essais n°1 et 2). Pour $[MeJA] = 0,1$ mM, il n'y a aucune synthèse, indiquant par là une concentration trop faible d'éliciteur (essais n°3 et 7). Pour $[MeJA] = 1$ mM, la suspension subit une mort cellulaire sans avoir eu la possibilité de réaliser une synthèse ; la concentration en MeJA est donc, cette fois, trop forte (essais n°6 et 10).

Tableau 5. Concentrations de resvératrol obtenues dans le milieu de culture pour les différentes conditions des expériences 1 et 2. Pour tous les essais, la durée de la phase de croissance sans MeJA est de 7 jours et la durée d'incubation en présence de MeJA est également de 7 jours. Tous ces essais sont réalisés sans méthyl- β -cyclodextrine.

N° de l'essai	MF ₀ (g/L)	[MeJA] (mM)	MF _{élicitation} (g/L)	[resv] (mg/L) (mM)
1	56,3	0,5	268	3,2 (0,01)
2	56,3	0,55	268	11,8 (0,05)
3	28,1	0,1	134	0,2 (0,00)
4	28,1	0,3	134	8,7 (0,04)
5	28,1	0,7	134	5,4 (0,02)
6	28,1	1,0	134	0,0 (0,00)
7	84,4	0,1	402	0,0 (0,00)
8	84,4	0,3	402	0,0 (0,00)
9	84,4	0,7	402	19,7 (0,09)
10	84,4	1,0	402	0,0 (0,00)

Les résultats des essais avec des concentrations de MeJA intermédiaires sont représentés sur la figure 33. Ce qui ressort principalement est que la condition centrale de départ est loin d'être optimale.

Un autre aspect important est la corrélation entre les deux paramètres (biomasse et concentration en MeJA). En effet, les meilleurs taux de production sont obtenus lorsque la concentration en MeJA est ajustée à la biomasse : environ 0,7 mM pour MF = 84,4 g/L et environ 0,3 mM pour MF = 28,1 g/L. La condition à MF = 28,1 g/L et [MeJA] = 0,7 mM a donné une réponse assez bonne sur une fiole et une absence de réponse sur l'autre, ce qui laisse supposer un risque de mort cellulaire à cause d'un rapport [MeJA]/MF élevé.

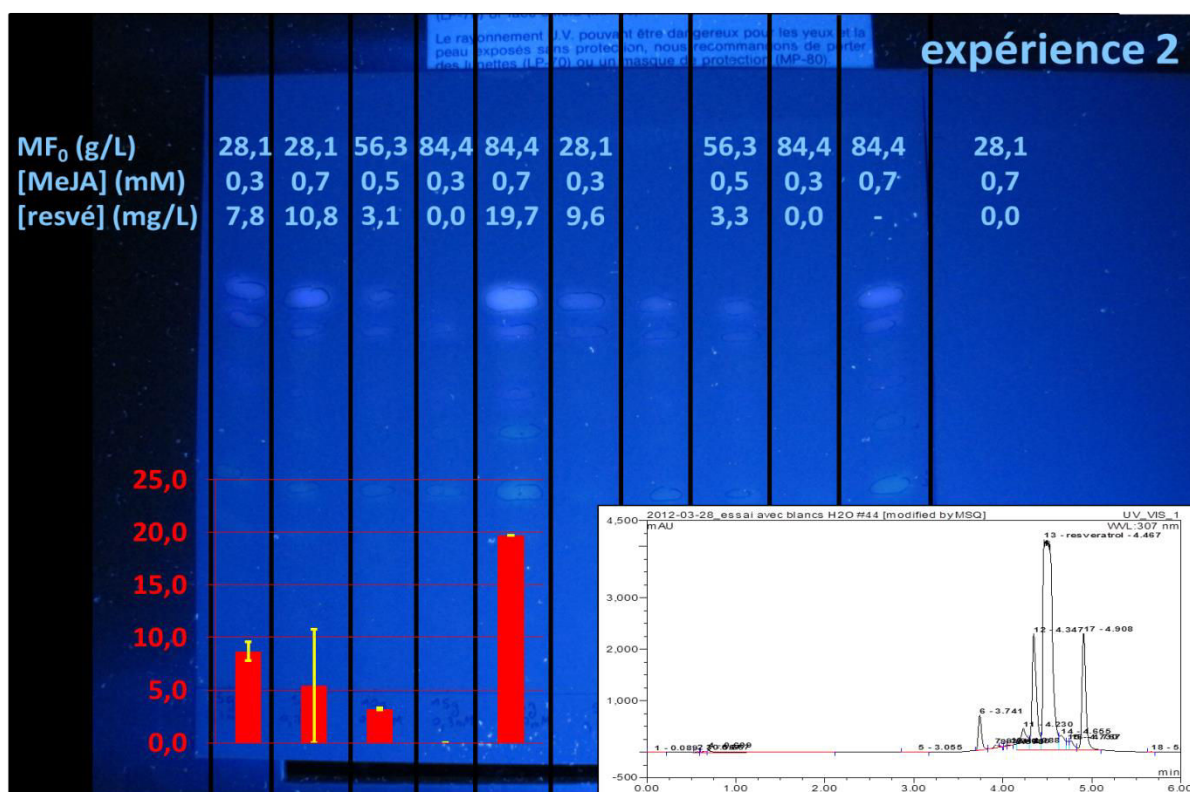


Figure 33 : Chromatographie sur couche mince réalisée avec les extraits au méthanol de l'expérience 2. Le spot fluorescent correspondant au resvératrol est celui qui est située le plus haut. Les valeurs des paramètres sont indiquées sur chaque colonne de migration, ainsi que la concentration du resvératrol mesurée par HPLC. Un histogramme en rouge, en bas à gauche, représente les moyennes correspondantes de ces dosages, exprimées en mg/L, avec les barres d'erreurs. En bas à droite, le chromatogramme d'un des extraits donne une idée du profil d'éluion HPLC.

ii. Influence de la durée d'exposition au MeJA

Dans une troisième expérience, on fait varier la concentration en biomasse et la durée d'exposition au MeJA. Les valeurs de masse fraîche restent 28,1 ; 56,3 et 84,4 g/L et celle de la durée d'élicitation sont : 5, 7 et 9 jours. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 6 et la figure 34.

Tableau 6. Concentrations de resvératrol obtenues dans le milieu de culture pour les différentes conditions de l'expérience 3. Pour tous les essais, la concentration de MeJA est fixée à 0,5 mM. Tous ces essais sont réalisés sans méthyl- β -cyclodextrine.

N° de l'essai	MF ₀ (g/L)	Durée de la phase de croissance (j)	MF _{élicitation} (g/L)	Durée en présence de MeJA (j)	[resv] (mg/L) (mM)
1	56,3	7	268	7	9,8 (0,04)
2	28,1	9	210	5	15,7 (0,07)
3	28,1	5	86	9	0,0 (0,00)
4	84,4	9	467 *	5	0,0 (0,00)
5	84,4	5	258	9	20,8 (0,09)

* Pour l'essai n°4, il y a épuisement du substrat et la suspension arrive en phase stationnaire. En effet, si la suspension était encore en phase exponentielle à l'élicitation, la masse filtrée aurait été $MF_{\text{élicitation}} = MF_0 \cdot \exp(\mu \cdot t) = 84,4 \cdot \exp(0,0093 \cdot 7 \cdot 24) = 629 \text{ g/L}$. Or la cinétique de croissance présentée dans la partie précédente (IV.) indique que le milieu de culture permet au maximum une augmentation de la biomasse ΔMF donnée par :

$$\Delta MF = MF_{\text{max}} - MF_0 = 428 - 45 = 383 \text{ g/L}$$

La valeur maximale de la biomasse pour l'essai n°4 est donc $84 + 383 = 467 \text{ g/L}$.

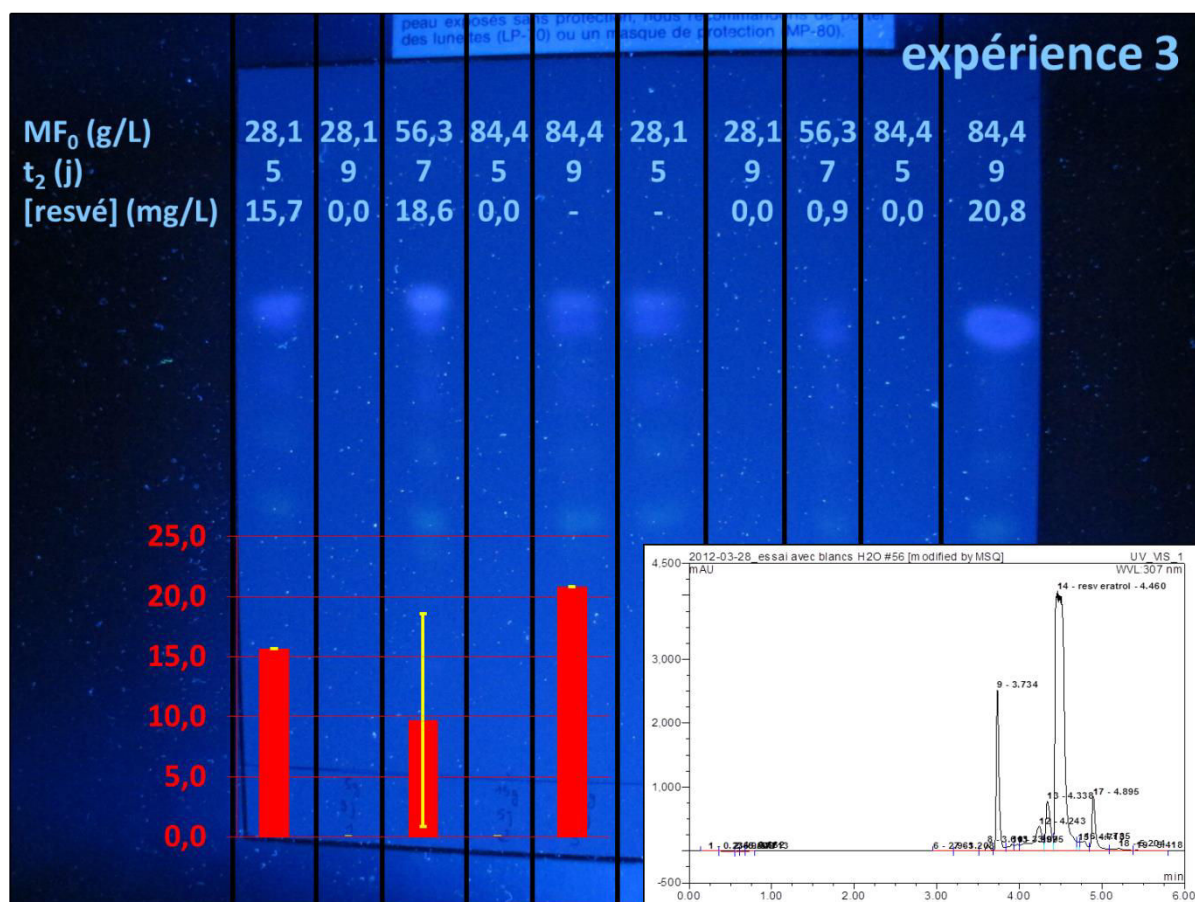


Figure 34 : Chromatographie sur couche mince réalisée avec les extraits au méthanol de l'expérience 3. Le spot fluorescent correspondant au resvératrol est celui qui est situé le plus haut. Les valeurs des paramètres sont indiquées sur chaque colonne de migration, ainsi que la concentration du resvératrol mesurée par HPLC. Un histogramme en rouge, en bas à gauche, représente les moyennes correspondantes de ces dosages, exprimées en mg/L, avec les barres d'erreurs. En bas à droite, le chromatogramme d'un des extraits donne une idée du profil d'élution HPLC.

La figure 34 montre les résultats obtenus avec l'analyse en chromatographie couche mince. Il semble y avoir, là aussi, une forte corrélation entre ces deux paramètres, concentration en biomasse et temps d'exposition au MeJA. Les plus hautes concentrations en resvératrol sont obtenues pour les conditions de type (Min, Min) et (Max, Max) (essais n°2 et 5). On constate ici que le rapport [MeJA]/MF est déterminant et qu'il influe même sur la cinétique de production. Il ne semble pas y avoir production de viniférines (absence de spots fluorescents correspondants sur la CCM) ; peut-être le resvératrol est-il détruit par oxydation, compte tenu de son pouvoir anti-oxydant ?

iii. Influence du rapport [MeJA]/MF

Puisqu'une meilleure production a été obtenue pour $[MeJA] = 0,7 \text{ mM}$ dans la deuxième expérience, cette concentration est choisie pour le point central de l'expérience suivante. Cette fois, on revient sur le jeu de paramètres (MF, [MeJA]), en décalant la fourchette de concentrations en MeJA : 0,5 ; 0,7 et 0,9 mM. Les masses fraîches prennent toujours les mêmes valeurs.

En observant la figure 35 et le tableau 7, on voit que la production la plus importante est obtenue de manière étonnante pour les concentrations les plus basses en biomasse et en éliciteur (MF = 28,1 g/L et $[MeJA] = 0,5 \text{ mM}$, essai n°2) avec un bon résultat également pour MF = 56,3 g/L et $[MeJA] = 0,7 \text{ mM}$ (essai n°1). Ceci confirme l'idée d'une corrélation entre la concentration de biomasse et celle du MeJA avec l'influence du rapport [MeJA]/MF.

Avec une masse fraîche de 84,4 g/L, on obtient des concentrations très faibles de resvératrol (essais n°4 et 5). On confirme ainsi que, lorsque le rapport [MeJA]/MF est faible, la cinétique est plus lente ; il faudrait sans doute attendre jusqu'à 9 jours pour avoir une production significative, alors que l'observation ne se fait ici qu'à 7 jours. Enfin, une concentration de MeJA égale à 0,9 mM est trop élevée pour une masse fraîche de 28,1 g/L, entraînant dans ce cas, la mort cellulaire (essai n°3).

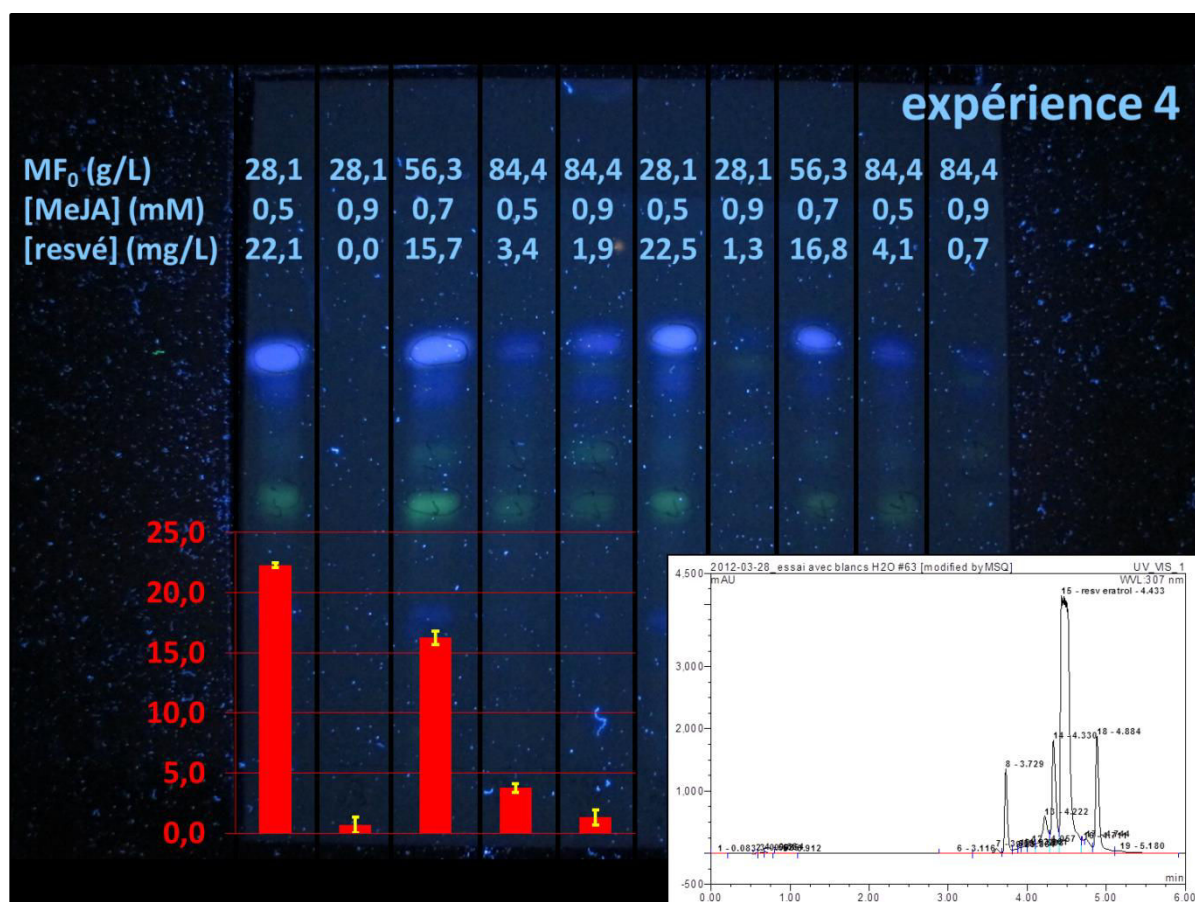


Figure 35 : Chromatographie sur couche mince réalisée avec les extraits au méthanol de l'expérience 4. Le spot fluorescent correspondant au resvératrol est celui qui est situé le plus haut. Les valeurs des paramètres sont indiquées sur chaque colonne de migration, ainsi que la concentration du resvératrol mesurée par HPLC. Un histogramme en rouge, en bas à gauche, représente les moyennes correspondantes de ces dosages, exprimées en mg/L, avec les barres d'erreurs. En bas à droite, le chromatogramme d'un des extraits donne une idée du profil d'élution HPLC.

Tableau 7. Concentrations de resvératrol obtenues dans le milieu de culture pour les différentes conditions de l'expérience 4. Pour tous les essais, la durée de la phase de croissance sans MeJA est de 7 jours et la durée d'incubation en présence de MeJA est également de 7 jours. Tous ces essais sont réalisés sans méthyl- β -cyclodextrine.

N° de l'essai	MF ₀ (g/L)	[MeJA] (mM)	MF _{élicitation} (g/L)	[resv] (mg/L) (mM)
1	56,3	0,7	268	16,3 (0,07)
2	28,1	0,5	134	22,3 (0,10)
3	28,1	0,9	134	0,7 (0,00)
4	84,4	0,5	402	3,8 (0,02)
5	84,4	0,9	402	1,3 (0,01)

iv. Interprétations

Dans ce paragraphe nous allons exploiter tous les résultats obtenus en élicitation par le méthyljasmonate.

Dans un premier temps examinons l'influence de la concentration de l'éliciteur sur la production de resvératrol à 7 jours après élicitation (figure 36).

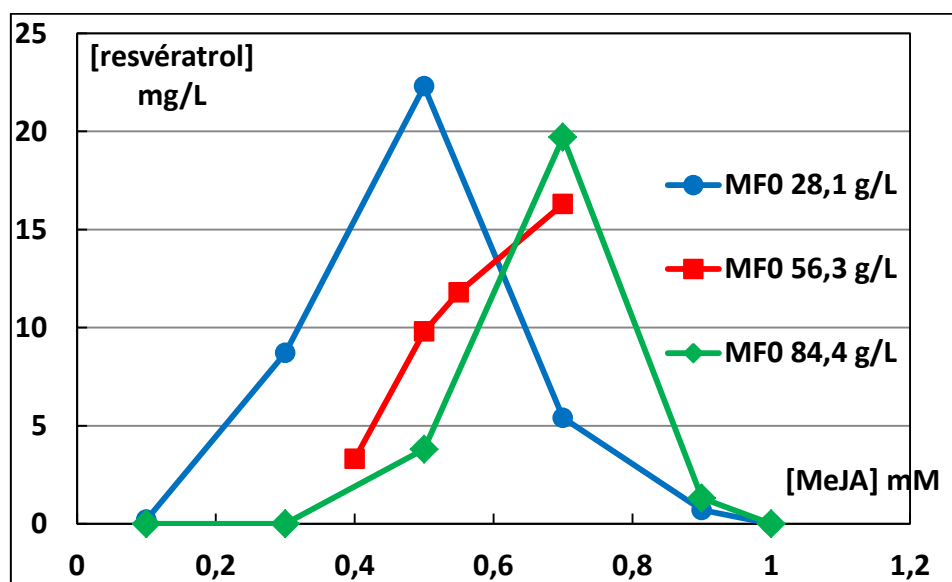


Figure 36 : Production du resvératrol en fonction de la concentration de MeJA

Valeurs à 7 jours après élicitation

La concentration de resvératrol atteint un maximum pour une concentration de MeJA différente selon la biomasse fraîche utilisée. Il est difficile de déterminer cette valeur maximale, compte tenu de l'allure des courbes ; elle se situe entre 0,4 et 0,6 mM pour MF₀ 28,1 g/L et plutôt entre 0,6 et 0,8 pour MF₀ 84,4 g/L. En ce qui concerne la courbe à 56,3 g/L, il est probable que le maximum se situe entre ces deux intervalles, à savoir entre 0,5 et 0,7 mM.

Nous avons porté sur la figure 37 la valeur de la concentration de resvératrol en fonction du rapport [MeJA] / MF₀ exprimé en mM.L.g⁻¹.

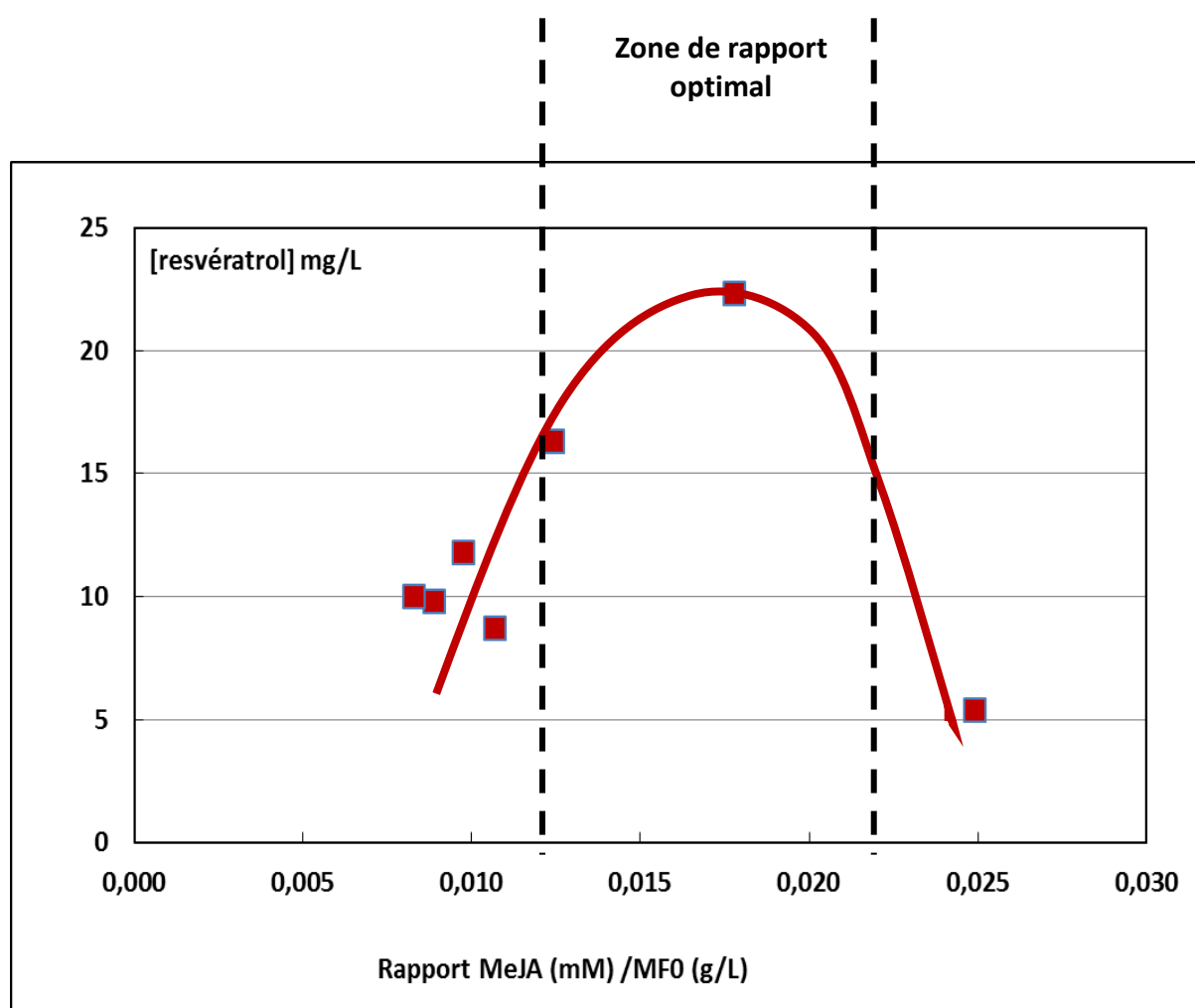


Figure 37 : Estimation du rapport [MeJA]/MF optimal

Valeur à 7 jours après l'éllicitation

On peut ainsi déterminer une zone de rapport optimal [MeJA]/ MF₀ pour la production de resvératrol à 7 jours après l'éllicitation qui se trouve entre 0,013 et 0,021 mM.L.g⁻¹.

Examinons maintenant l'influence du temps passé après éllicitation ; comme on peut le voir sur la figure 38, obtenue avec 0,5 mM de MeJA, c'est un paramètre important. On observe ici

la résultante de la cinétique de production du resvératrol et de sa disparition (par dégradation et/ou formation de viniférines). On confirme l'influence importante du rapport $[MeJA]/MF_0$ qui joue sur la cinétique de production. En effet pour un rapport de 0.018 (MF_0 28,1 g/L), la cinétique est plus rapide que pour un rapport de 0.006 (MF_0 84,4 g/L) et on obtient le maximum entre 6 et 8 jours pour $MF_0 = 28,1$ g/L, alors qu'il sera au-delà de 9 jours pour $MF_0 = 84,4$ g/L.

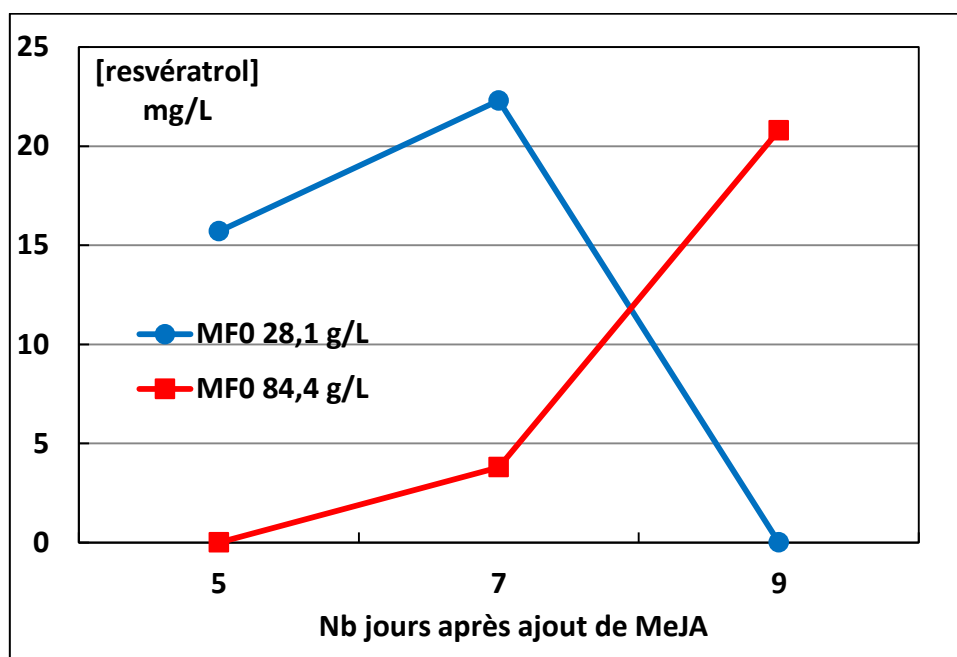


Figure 38 : Variation de la concentration de resvératrol en fonction du temps après élicitation (0,5 mM MeJA)

Afin de tenir compte des effets conjugués du temps d'élicitation et de la concentration du MeJA par rapport à celle de la biomasse, nous avons calculé pour chaque expérience la concentration de biomasse obtenue au moment de l'élicitation ; après élicitation la biomasse ne croît plus.

On peut obtenir cette valeur par la loi de Monod $MF(t_{\text{élicitation}}) = MF_0 \exp(0,0093 t_{\text{élicitation}})$ avec le temps d'élicitation exprimé en heures. La figure 39 montre les résultats obtenus pour 7 jours après élicitation ; on constate, avec beaucoup plus de points que précédemment puisque l'on peut comparer des résultats obtenus avec des temps de croissance différents avant élicitation, que la forme de la courbe est la même et que le rapport optimal par rapport à la biomasse au moment de l'élicitation est compris entre 0,003 et 0,005 $mM.L.g^{-1}$. Une transformation de la biomasse au temps d'élicitation en biomasse au temps 0 pour 7 jours de croissance montre que ces valeurs sont parfaitement cohérentes avec ce qui avait été obtenu précédemment.

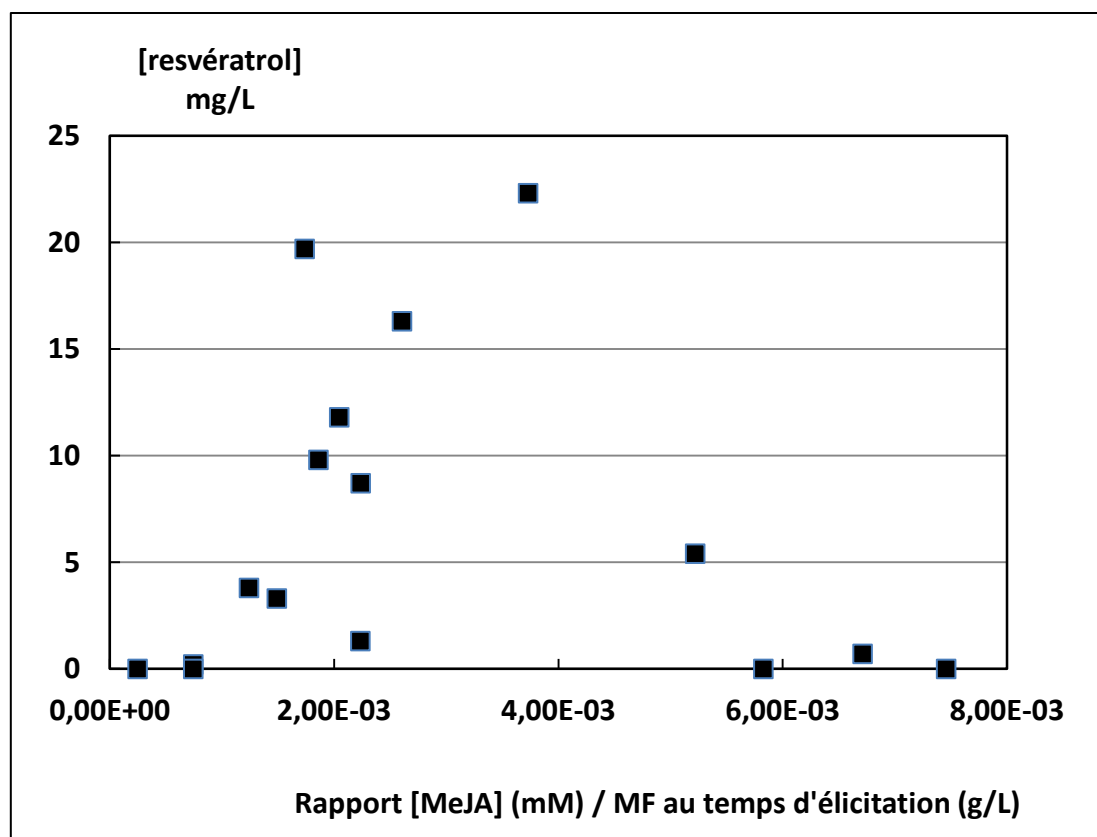


Figure 39 : Influence du rapport concentration de MeJA par rapport à la biomasse au moment de l'éllicitation

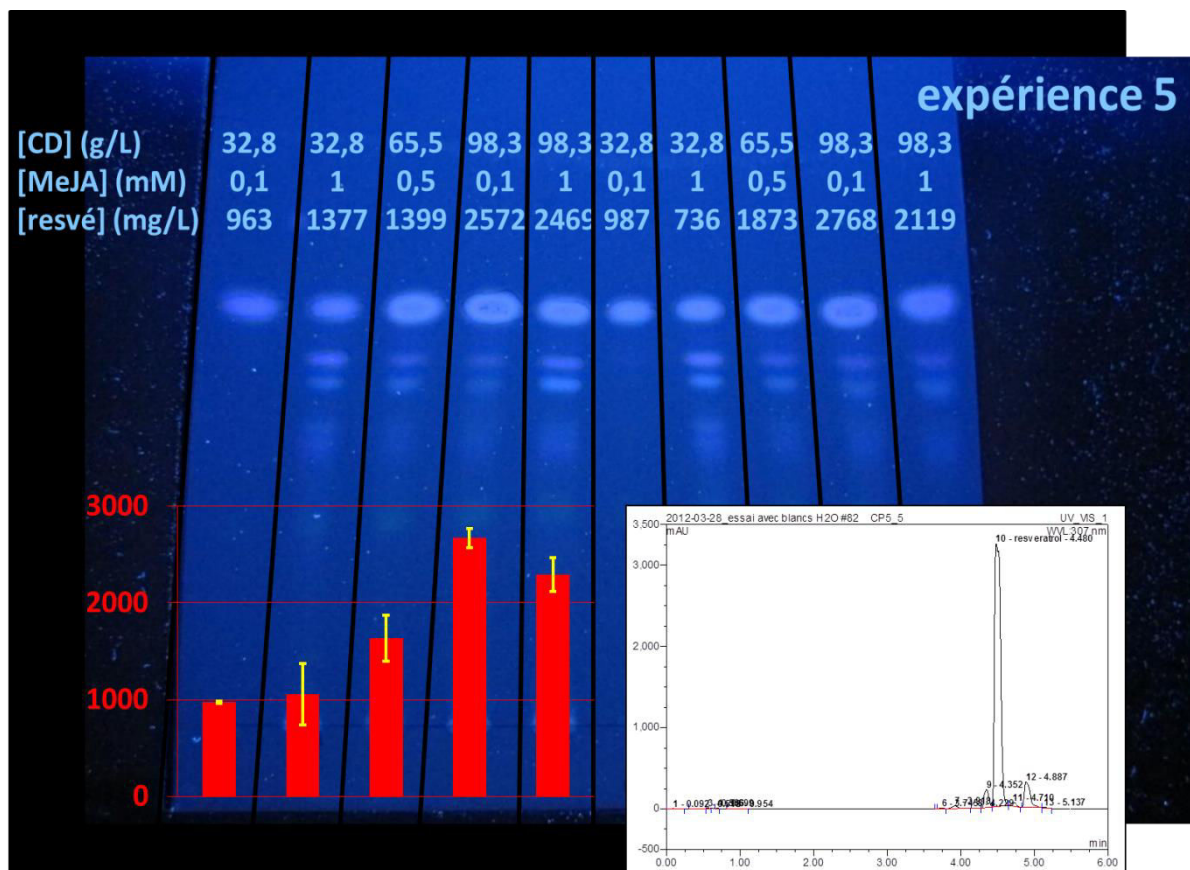
Valeurs 7 jours après éllicitation

Les valeurs de la concentration de resvératrol restent faibles, compte tenu de la dégradation de ce composé (par oxydation notamment) et des effets négatifs sur les cellules de l'élliciteur et de la molécule produite. La production de viniférines reste très faible compte tenu des teneurs réduites du monomère resvératrol.

v. Influence de la présence de la méthyl- β -cyclodextrine

Les deux dernières expériences sont réalisées avec ajout de méthyl- β -cyclodextrine, en éllicitation croisée avec le MeJA. Pour la cinquième, on fixe les paramètres suivants comme au début de la série : MF = 56,3 g/L ; t_2 = 7j et on fait varier la concentration de chacun des deux élliciteurs. On reprend les valeurs extrêmes pour la concentration en MeJA (0,1 et 1 mM) car la présence de la cyclodextrine peut favoriser l'éllicitation pour [MeJA] = 0,1 mM d'une part, et exercer un effet protecteur pour [MeJA] = 1 mM d'autre part. Pour la cyclodextrine, la valeur centrale est fixée à la valeur habituelle (65,5 g/L) et les valeurs extrêmes sont respectivement 0,5 et 1,5 fois cette valeurs (32,8 et 98,3 g/L). Pour la dernière expérience, les

paramètres variables sont de nouveau la biomasse (28,1 ; 56,3 et 84,4 g/L) et la concentration en MeJA (0,1 ; 0,5 et 1 mM). Les résultats sont regroupés dans le tableau 8 et sur les figures 40 et 41.



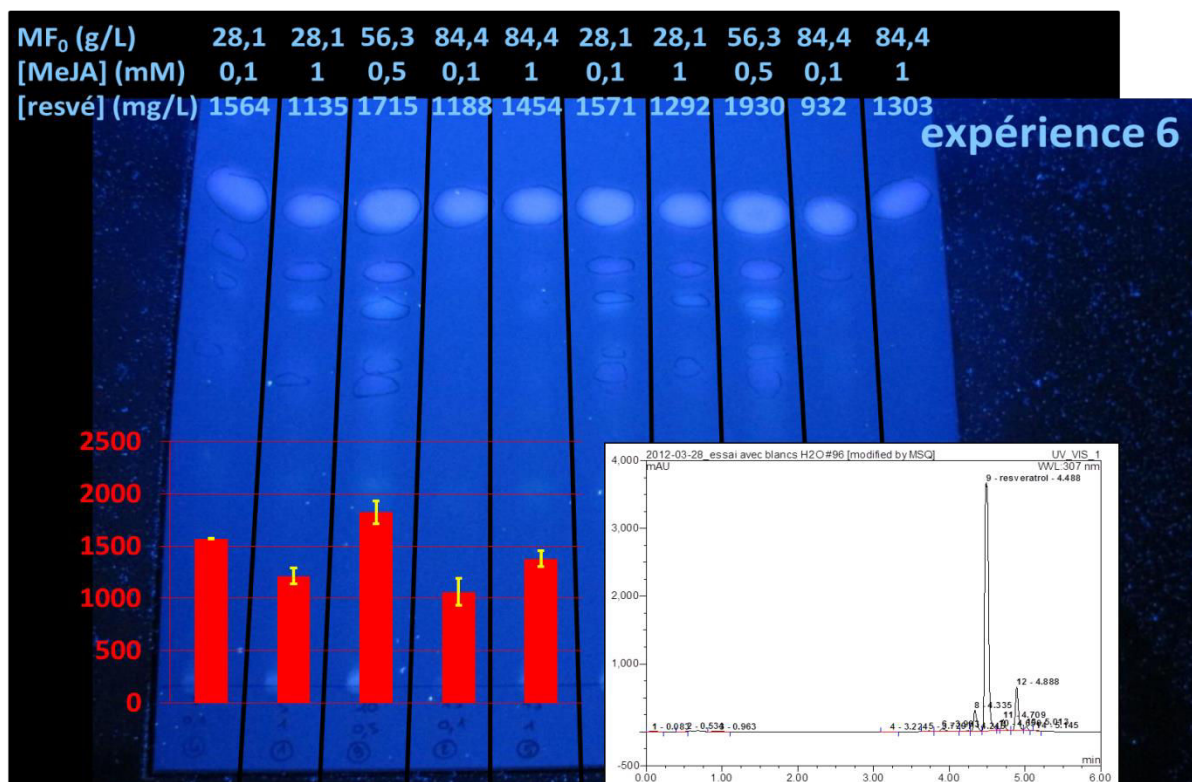


Figure 41 : Résultats de l'expérience 6

Tableau 8. Concentrations de resvératrol obtenues dans le milieu de culture pour les différentes conditions des expériences 5 et 6. Pour ces essais, il n'a pas été possible de calculer la masse filtrée à l'élicitation car le taux de croissance en présence de méthyl- β -cyclodextrine n'a pas été mesuré.

N° de l'essai	MF ₀ (g/L)	[CD] (mM)	[MeJA] (mM)	Durée de la phase de croissance (j)	Durée en présence de MeJA (j)	[resv] (mg/L) (mM)
1	56,3	50	0,5	7	7	1636 (7,17)
2	56,3	25	0,1	7	7	975 (4,27)
3	56,3	25	1,0	7	7	1057 (4,63)
4	56,3	75	0,1	7	7	2670 (11,70)
5	56,3	75	1,0	7	7	2294 (10,05)
6	56,3	50	0	14*	0	238 (1,04)
7	56,3	50	0,5	7	7	1823 (7,98)
8	28,1	50	0,1	7	7	1568 (6,87)
9	28,1	50	1,0	7	7	1214 (5,32)
10	84,4	50	0,1	7	7	1060 (4,64)
11	84,4	50	1,0	7	7	1379 (6,04)

* Pour tous ces essais la cyclodextrine est ajoutée au début de la culture, contrairement au méthyljasmonate qui est ajouté à 7 jours de culture

On voit très nettement aux résultats regroupés sur la figure 42 que pour une même concentration de MeJA, la production est fortement corrélée à la concentration en cyclodextrine. Celle du MeJA influe peu, voire négativement, sur la synthèse du resvératrol. L'autre aspect, plus qualitatif, que l'on peut voir sur les figures 40 et 41, est que le MeJA semble orienter le système vers la synthèse des viniférines, décelées par les spots fluorescents situés en dessous de celui du resvératrol sur les chromatogrammes. Ceux-ci sont effectivement absents ou très atténués pour la plus faible teneur en [MeJA], 0,1 mM. La concentration en cyclodextrine pourrait encore être optimisée car 98,3 g/L donne d'excellents résultats.

Ces derniers résultats confirment, en présence de cyclodextrine, la corrélation déjà observée entre la biomasse et la concentration du MeJA. Les meilleurs taux de production sont effectivement obtenus pour les conditions de type (Min, Min), (Moy, Moy) et (Max, Max) (essais n°7, 8 et 11). Il est ainsi nécessaire de bien ajuster le rapport [MeJA]/MF. Le point central (MF = 56,3 g/L, [MeJA] = 0,5 mM, essai n°7) reste, ici, celui qui donne les résultats les plus satisfaisants.

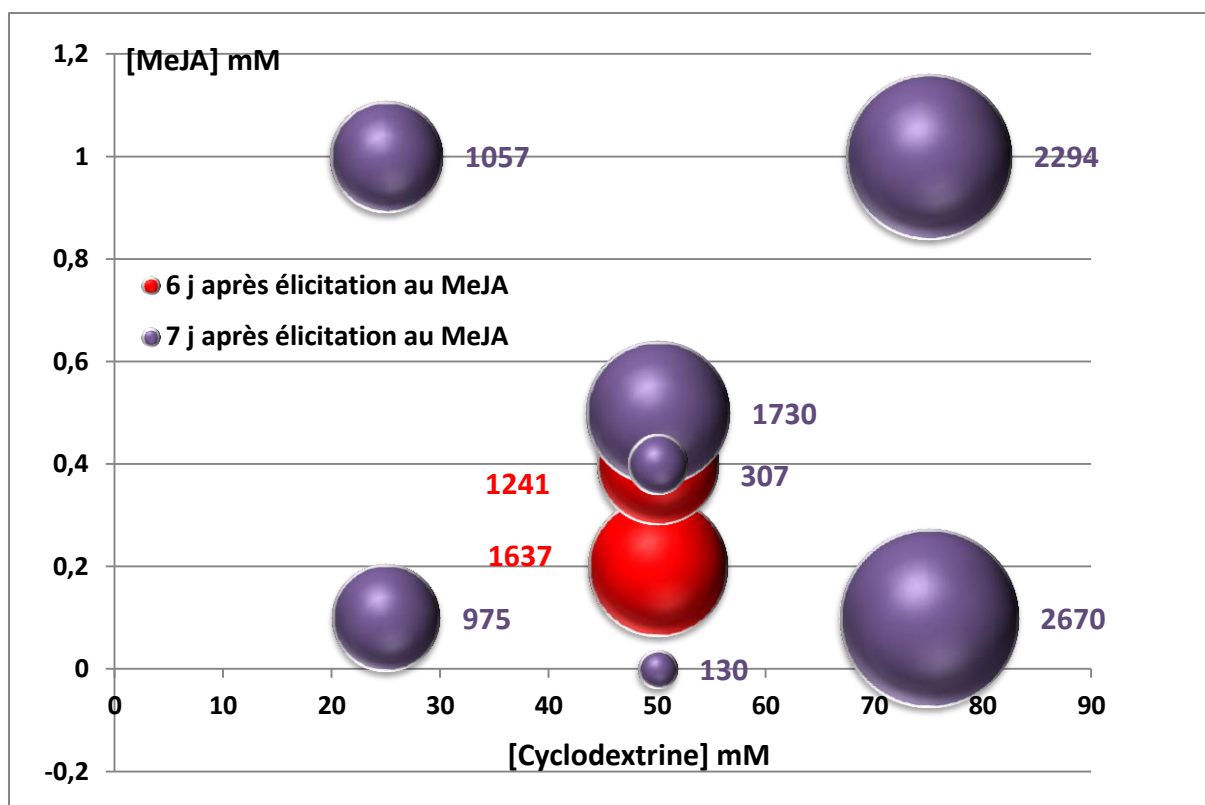


Figure 42 : Production de resvératrol par élicitation croisée

$MF_0 = 56,3 \text{ g/L}$

Les chiffres à côté des bulles représentent la concentration de resvératrol en mg/L.

VI. Exploration d'une méthode d'extraction alternative des stilbènes par résines

Dans le cadre de cette thèse, le procédé utilisé pour le dosage du resvératrol est une extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle. Celle-ci est nécessaire lorsque la concentration en resvératrol dans le milieu est trop faible pour une quantification directe par HPLC. Puisque ce procédé est efficace en analyse, il pourrait être envisagé comme voie industrielle de récupération et de purification du resvératrol. Cependant si l'on envisage l'industrialisation future du procédé, il est important de considérer dès à présent ses aspects d'impact environnemental. Même si l'acétate d'éthyle est l'un des solvants les moins nocifs et les plus couramment utilisés, on peut étudier une voie alternative qui est la fixation sur résine qui présente l'avantage de ne pas mettre en œuvre de phases organiques. Il en existe différents types permettant la fixation et la séparation des composés en solution. Pour avoir une première idée de la pertinence de cette solution, l'étude de certaines de ces résines et de leur efficacité à extraire le resvératrol est présentée ici.

Quatre types de résines Amberlite ont été expérimentés : XAD 1180, XAD 1600, FPX 66 et FPX 68 (Tableau 9). Ce sont des résines macroréticulées, aromatiques et non ioniques, permettant l'extraction de molécules aromatiques faiblement polaires, présentes dans un solvant polaire. Elles diffèrent assez peu les unes des autres, sauf par la taille des grains et par l'aire interfaciale offerte. La résine FPX 66 a des grains plus gros que les autres ; FPX 68 et XAD 1180 sont très proches ; quant à XAD 1600 elle est beaucoup plus monodisperse, permettant une meilleure séparation entre des molécules assez proches. Les résines FPX 66 et XAD 1600 ont une aire interfaciale plus grande que les deux autres. La résine XAD 1180 est habituellement plutôt recommandée pour les molécules de grande taille (masse moléculaire > 10 000 daltons), tandis que la résine XAD 1600 permet la fixation de molécules plus petites.

Tableau 9 : Caractéristiques des résines testées

	FPX 66	FPX 68	XAD 1180	XAD 1600
Taille moyenne des grains (mm)	0,6 à 0,75	0,35 à 0,60	0,35 à 0,60	0,40
Aire interfaciale par unité de masse (m ² /g)	700	>450	500	800

Lors d'un premier essai, on souhaite évaluer, pour chaque résine, ses capacités de rétention et de relargage du resvératrol. Cet essai est réalisé sur une solution de référence préparée à partir d'une poudre de resvératrol (Naturex, pureté 50%) et filtrée ; on obtient une solution de resvératrol, mais aussi d'autres composés dans l'eau. Avant la mise en colonne, les résines sont préparées en les rinçant quatre fois à l'eau désionisée (200 mL), puis en les trempant dans l'éthanol (95°) pendant une nuit. Enfin, elles sont de nouveau rincées quatre fois à l'eau désionisée. On introduit pour chaque essai 10 mL de résine saturée en eau dans la colonne, ce qui correspond à 3,6 g pour XAD 1180 et les deux résines FPX et 3 g pour XAD 1600 qui retient plus d'eau.

Pour comparer les différentes résines, on fait passer la solution de référence en continu dans la colonne et on recueille les six premières fractions de 20 mL. Ces fractions sont ensuite dosées par spectrométrie d'absorption à 307 nm, longueur d'onde caractéristique des stilbènes et entre autres du resvératrol. On mesure l'absorbance de la solution plus ou moins diluée afin d'entrer dans la fourchette de concentrations de la droite d'étalonnage (entre 0 et 1 d'absorbance). La solution de départ diluée d'un facteur 50 a une absorbance de 0,518. Ce chiffre est donc proportionnel à la concentration du resvératrol présent dans la solution diluée. Une chromatographie couche mince permet de vérifier la présence effective de resvératrol dans ces fractions.

Les résultats exprimés en ratio « absorbance de sortie sur absorbance d'entrée » sont représentés sur la figure 43, pour chaque résine. Pour les six premières fractions, le rapport est très inférieur à 1, montrant une très bonne rétention du resvératrol pour toutes les résines. En effet en sortie on n'a pas plus de 5% du resvératrol entrant. On peut dire simplement que les

résines XAD 1600 et FPX 68 sont légèrement plus efficaces que les autres. Mais dans les conditions des essais on reste très loin de la saturation pour toutes les résines. Il n'a donc pas été possible de quantifier par ces essais la capacité des diverses résines, nous avons simplement montré qu'elles étaient très efficaces, fixant quasiment 100% de la masse introduite. : 99% pour les meilleures résines et 97% pour les autres.

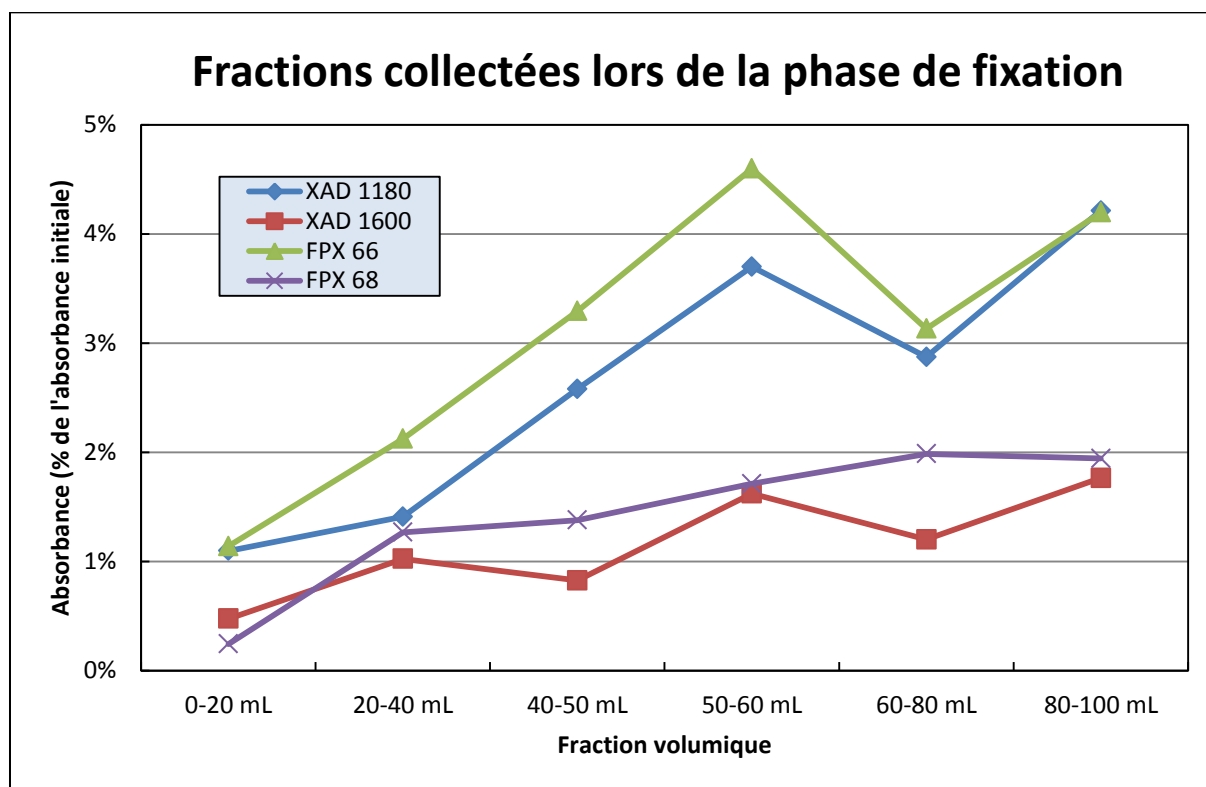


Figure 43 : Ratio de l'absorbance des fractions récoltées lors de la phase de fixation de la solution de référence sur l'absorbance initiale

Après la phase de fixation, on élue la colonne à l'éthanol, en collectant de nouveau les fractions volumiques. Le resvératrol est élué très rapidement, en deux fractions de 25 mL. Les résultats sont représentés sur la figure 44. Deux tendances se dessinent nettement : les résines XAD 1600 et FPX 68 libèrent plus rapidement une masse très importante de resvératrol dans la 1^{ère} fraction ; si on considère que pour ces résines l'élution est totale en deux fractions, on retrouve 95% de la masse fixée dans la 1^{ère} fraction et 5% dans la 2^{ème}. Pour les autres résines, il semble que l'élution soit moins rapide et que l'on ne récupère dans les deux fractions qu'environ 86% de la masse fixée.

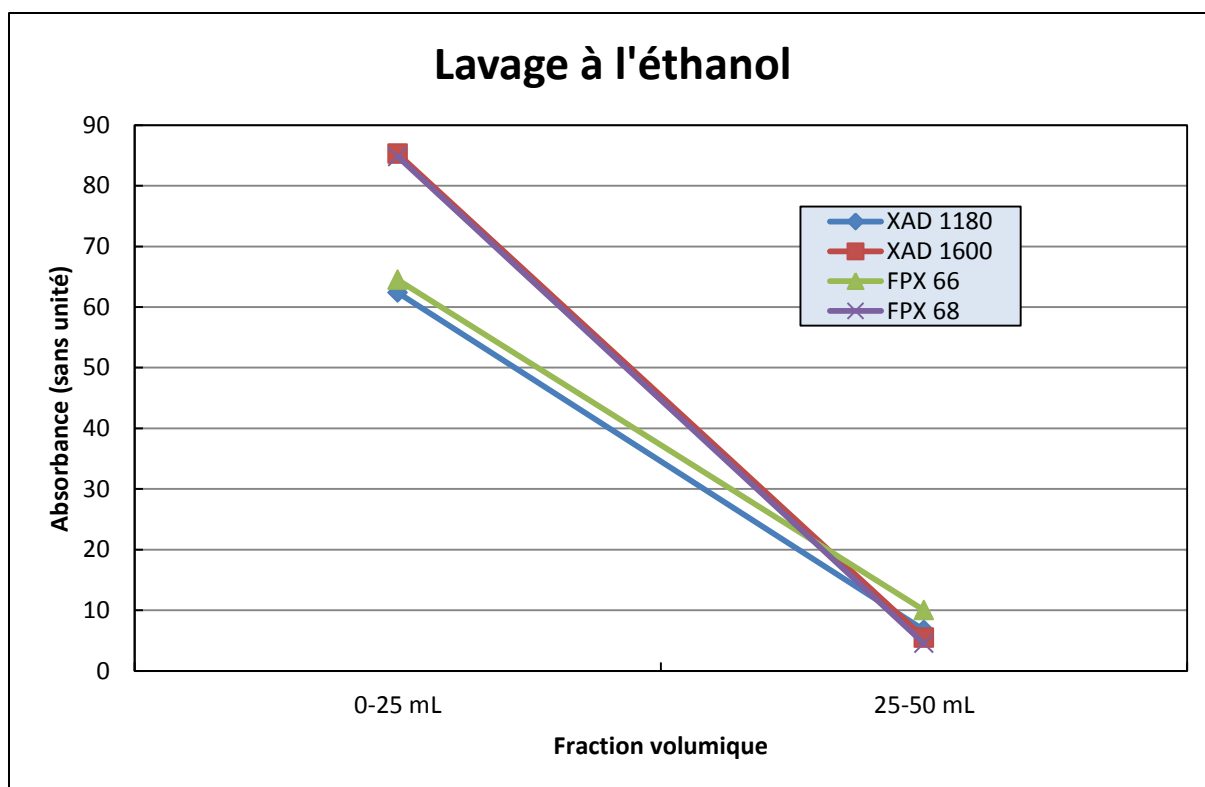


Figure 44 : Absorbance corrigée par la dilution, des fractions récoltées lors de la phase d'élution

On choisit de limiter la suite des essais à l'étude d'une seule résine, parmi les deux plus satisfaisantes, la résine FPX 68. C'est en effet, celle qui fixe le plus de resvératrol dès la première fraction. La première expérience est alors reproduite en remplaçant cette fois, la solution référence par le milieu de culture issu d'une suspension de cellules Concord élicitées au MeJA, ; contenant environ 45 mg/L de resvératrol. On cherche ainsi à vérifier que les résultats obtenus avec une solution de resvératrol dans l'eau pure sont toujours valables en conditions réelles. Les absorbances des fractions volumiques obtenues lors de la phase de fixation sont représentées, en rouge, sur la figure 45, avec le rappel, en bleu, des résultats obtenus avec la solution étalon. Ces valeurs sont exprimées en pourcentage de l'absorbance d'entrée, afin de permettre leur comparaison. Le milieu est effectivement beaucoup moins concentré que la solution de référence. On observe alors que, dès la première fraction de 20 mL, 24% des stilbènes sont rejetés donc seuls 76% sont fixés, concernant le milieu de culture, tandis que la résine fixait 100% du resvératrol de la solution de référence, dans cette même première fraction. Autrement dit, la cinétique de fixation des stilbènes est beaucoup plus lente à partir du milieu de culture et/ou la résine se sature beaucoup plus rapidement. Deux explications peuvent être avancées. D'une part, la concentration des stilbènes dans le milieu peut être trop faible pour donner une cinétique rapide et d'autre part, certains autres constituants du milieu, qu'on ne trouve pas dans la solution de référence, peuvent entrer en compétition avec les stilbènes dans le processus de fixation. Trancher entre ces deux explications est important car, dans le cas d'une influence de la concentration des stilbènes, le

problème pourrait être résolu en traitant des milieux beaucoup plus concentrés (chose tout à fait envisageable avec l'emploi de la méthyl- β -cyclodextrine, par exemple, sous réserve que l'encapsulation du resvératrol n'empêche pas sa fixation). En revanche, si la faible efficacité de la résine est due à la présence de composés se fixant concurrentiellement aux stilbènes, il faudrait d'abord éliminer ces composés, ce qui complique grandement le procédé. Afin de décider entre ces deux explications, on réalise des expériences complémentaires.

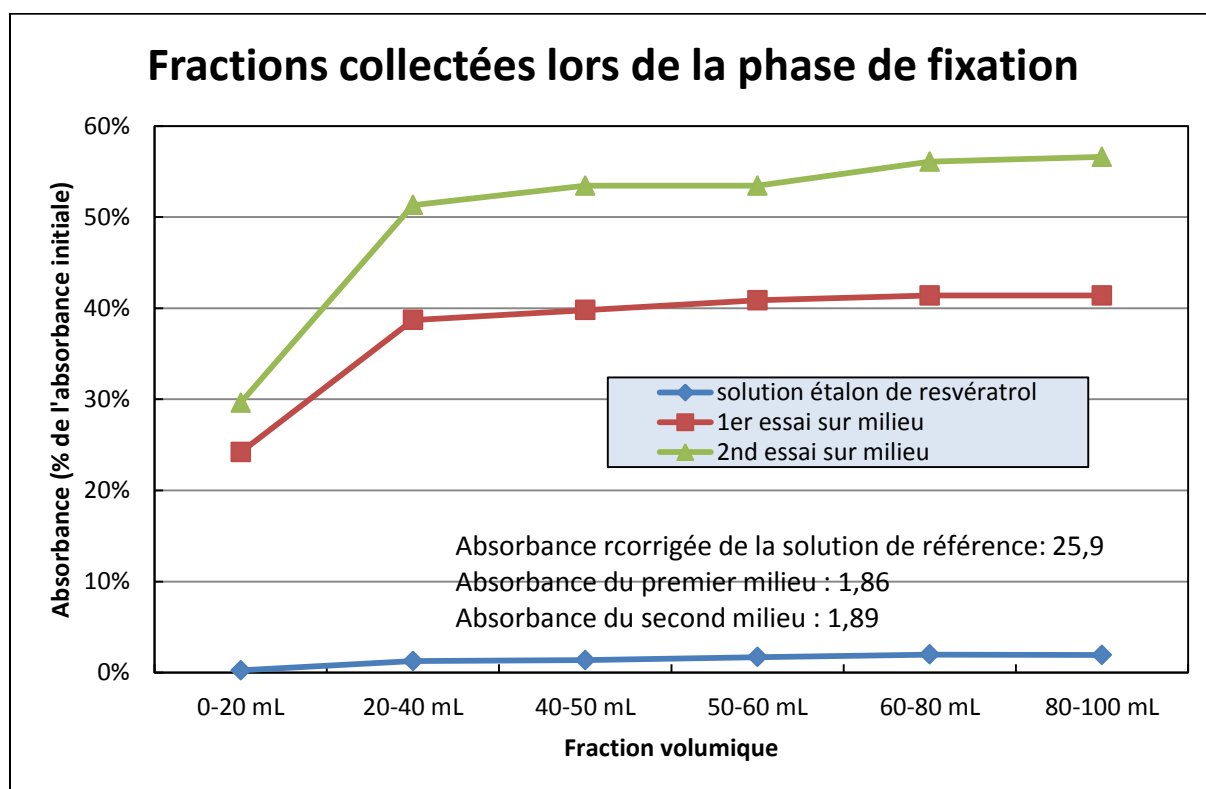


Figure 45 : Ratio absorbance de sortie/ absorbance d'entrée pour la solution de référence et pour le milieu de culture, lors de la phase de fixation

Pour vérifier l'influence de la concentration du resvératrol et voir si la résine fixe mieux ce dernier dans un milieu plus concentré, on réalise l'expérience suivante : on lave 680 mL de milieu avec le même volume d'acétate d'éthyle. On obtient deux phases : la phase organique contenant le resvératrol extrait est évaporée et l'extrait sec obtenu est dissous de nouveau dans 100 mL de la phase aqueuse. On a ainsi un milieu reconstitué, concentré 6,8 fois en resvératrol. On reproduit alors l'essai de fixation sur la résine FPX 68.

Dans une seconde expérience, pour vérifier, cette fois, l'influence des autres composés du milieu sur la fixation du resvératrol, on procède de la façon suivante : on lave 100 mL de milieu avec le même volume d'acétate d'éthyle, on suppose que le resvératrol est extrait sélectivement. La phase organique est évaporée et l'extrait sec obtenu est dissous dans un mélange, en proportions variables, d'eau et de la phase aqueuse. On réalise cette manipulation

pour les proportions de phase aqueuse suivantes : 0%, 1%, 5%, 20%, 50%, 80% et 100%. On reconstitue ainsi un milieu plus ou moins appauvri en composés parasites. Pour 0% de phase aqueuse, la majeure partie des composés parasites a été éliminée. Pour 100% de phase aqueuse, on a reconstitué le milieu initial (ce qui permet une vérification par comparaison avec le milieu sans traitement). On reproduit alors l'essai de fixation sur la résine FPX 68, pour ces sept mélanges.

Les résultats de ces huit essais sont rassemblés dans la figure 46. Ceux-ci y sont comparés aux résultats précédemment obtenus sur la solution de référence et sur le milieu (un second essai sur milieu est ajouté). On voit très nettement que le milieu reconstitué sans phase aqueuse (0%) se comporte comme la solution de référence, tandis que le milieu reconstitué complètement (100%) se comporte comme le milieu sans traitement. Les solutions reconstituées avec différents pourcentages de phase aqueuse, quant à elles, décrivent toutes les situations intermédiaires entre ces deux comportements extrêmes. Enfin, la concentration d'un facteur 6,8 du resvératrol dans le milieu a amélioré sa fixation par rapport au milieu de culture direct, mais c'est plus probablement par l'étape d'extraction qui a permis d'éliminer une partie des composés parasites. Nous pouvons donc conclure que la faible efficacité de l'extraction sur milieu de culture est due à la présence de composés qui gênent la fixation du resvératrol. Nous pouvons préciser que ces composés sont hydrophiles puisqu'ils migrent dans la phase aqueuse lors de l'extraction liquide/liquide à l'acétate d'éthyle.

La possible utilisation de résines comme alternative à l'extraction liquide-liquide semble ainsi compromise par ces premiers résultats. L'extraction à l'acétate d'éthyle reste, pour le moment, la solution la plus simple et la plus efficace. Mais l'examen futur d'autres types de résines ne doit pas pour autant être exclu, notamment l'Ambertite XAD 1600 qui présente selon le fabricant des propriétés de fixation plus sélective.

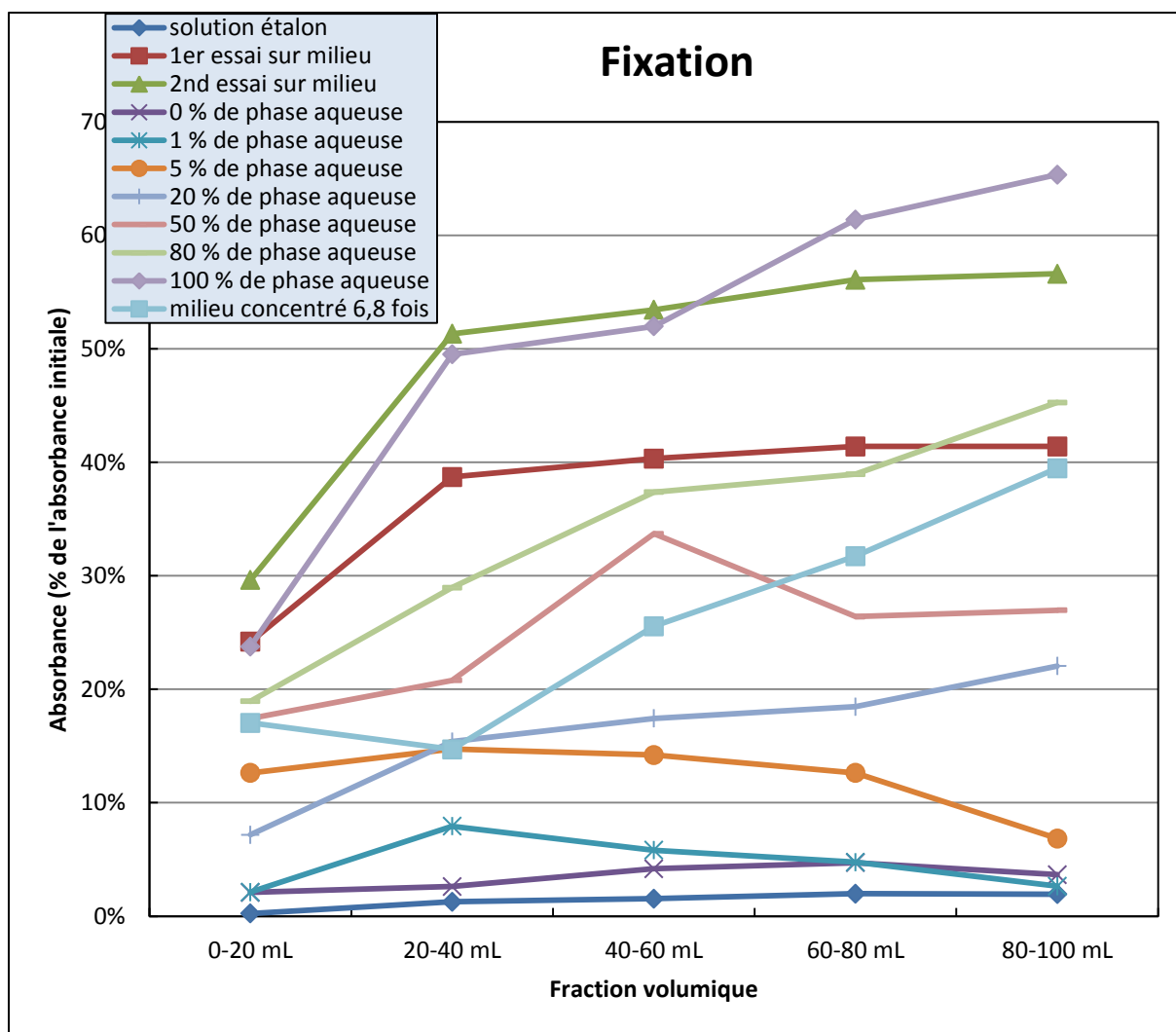


Figure 46 : Ratio absorbance de sortie/ absorbance d'entrée pour différents milieux

VII. Conclusion et perspectives

L'un des principaux aspects qui ressortent de l'étude des suspensions en fioles d'Erlenmeyer est la grande production de resvératrol consécutive à l'action de la méthyl- β -cyclodextrine. Celle-ci est encore plus marquée dans le cas de l'éllicitation croisée avec le MeJA. Deux autres effets sont ressortis : la cyclodextrine semble préserver la biomasse en utilisation seule, comparativement au MeJA et elle n'induit qu'une faible synthèse d' ϵ -viniférine. Un certain nombre d'hypothèses ont été avancées pour expliquer ces phénomènes. L'effet d'éllicitation peut être expliqué par la nature d'oligosaccharide de la molécule, reconnue alors par les cellules comme un produit de dégradation des polysaccharides des tissus végétaux. Les cyclodextrines sont d'ailleurs des produits naturels résultant de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*. Pour expliquer les taux très élevés de resvératrol, nous avons évoqué les effets protecteurs que peut exercer la méthyl- β -cyclodextrine. Sa configuration

spatiale en forme de tronc conique, hydrophobe à l'intérieur et hydrophile à l'extérieur, lui permet d'encapsuler de petites molécules plutôt apolaires comme le resvératrol et de les solubiliser. La formation d'un tel complexe pourrait protéger, d'une part, le resvératrol de sa dégradation par oxydation ou par transformation en d'autres métabolites (viniférines, par exemple) et, d'autre part, les cellules contre l'effet toxique du resvératrol.

Ces considérations conduisent à penser que la clé d'une importante production du resvératrol résiderait dans le fait d'extraire immédiatement celui-ci du milieu pour empêcher un contact prolongé avec les cellules. Les possibilités qui s'offrent à nous sont : l'utilisation de molécules-cages comme les cyclodextrines, l'extraction par solvant et l'extraction liquide-solide à l'aide de résines plus sélectives que celles testées. Si l'on se tourne vers des applications cosmétiques, diététiques ou pharmaceutiques, les cyclodextrines posent le problème de leur innocuité. Si celles-ci doivent être éliminées du produit fini, leur propre extraction risque d'être délicate. Elles sont, de plus, d'un coût élevé. Concernant l'utilisation de solvants comme l'acétate d'éthyle, nous avons vu qu'il était préférable de s'en affranchir pour des raisons écologiques. Enfin, une première étude de l'extraction par résine a montré que cette solution était loin d'être évidente. Mais les possibilités dans ce domaine ne sont certainement pas épuisées. Si les hypothèses émises précédemment sont vérifiées, n'importe quel procédé d'extraction pourra offrir le même résultat prometteur que l'ajout de méthyl- β -cyclodextrine.

Concernant la variété de vigne utilisée pour produire le resvératrol, notre choix s'est porté sur la souche Concord qui a une croissance rapide ($\mu = 0,0093 \text{ h}^{-1}$ et $T_d = 74,5 \text{ h}$) et se montre résistante au stress mécanique. Elle est donc particulièrement bien adaptée pour l'étude en bioréacteur qui est abordée dans la partie qui suit.

Partie 4 : Etude en bioréacteur agité de 5 L (publication)

Bioproduction of resveratrol: optimisation of cell suspension culture from *Vitis labrusca* in bioreactor

Thomas Chastang^{1,2}, Behnam Taidi¹, Eric Courot², Christophe Clément² and Dominique Pareau¹

¹Ecole Centrale Paris, LGPM, Centre d'Excellence en Biotechnologies Blanches, Route de Bazancourt, 51110 Pomacle, France.

² University of Reims Champagne-Ardenne, URVVC EA 4707, Faculty of Sciences, , PO Box 1039, 51687 Reims cedex 2, France.

Abstract

The culture of plant cells of *Vitis labrusca* was developed at 5L scale in order to bioproduce resveratrol. This was advancement from shake-flask cultures at 300 mL and the opportunity was taken to correlate some common measurements of biomass to the dry weight measurement. The bioreactor cultures were used to measure and model the production of resveratrol, which was brought about by elicitation of the culture with methyl jasmonate. A fed-batch culture strategy was used in order to minimise the amount of inoculum necessary and the final biomass obtained in the bioreactors was of the order of 8-9 g/L (dry weight). Two mathematical models could describe the production of resveratrol equally well namely a quadratic and an exponential model. The mechanistic implications of each model are discussed.

Key words: resveratrol, bioreactor, cell suspensions, elicitation, methyl jasmonate, *Vitis labrusca*, biomass measurements

Abbreviations:

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

BAP: benzylaminopurine

CD: cyclodextrin

dO₂: dissolved oxygen

DW: dry weight

FW: filtered weight

GC: gas chromatography

HPLC: high performance liquid chromatography

MeJ: methyl jasmonate

NAA: 1-naphthaleneacetic acid

PCV: packed cell volume

[resv]: molar concentration of resveratrol

rpm: revolutions per minute

RSD: relative standard deviation

STS: stilbene synthase

T_d: doubling time

UV: ultraviolet

v/v: volume per volume

VVM: volume of air introduced per working volume in the bioreactor per minute

WW: wet weight

Introduction

Resveratrol is a molecule from the stilbene polyphenols family and a secondary metabolite of many plants such as Japanese knotweed (*Fallopia japonica*), white hellebore (*Veratrum album*), raspberries, mulberries, peanuts, blueberries, bilberries, cranberries, some pines and the grapevine. Secondary metabolites are often used in applications such as fine chemicals, colorants, flavourings, textile pigments, cosmetics ingredients (perfumery, antioxidant), as well as food supplements. These metabolites also form a significant source of active components in the pharmaceutical industry.

Considering the numerous properties of resveratrol, this molecule may well become a key molecule in the pharmaceutical industry in the coming years should authorisation for its medical application be obtained. At present, resveratrol is mainly used in cosmetics and as a nutritional supplement. Thanks to its fame in relation to the “French paradox”, resveratrol has established itself as a natural product of the grapevine and provides a strong marketing tool.

Resveratrol extraction from vine cuttings could provide the means of recycling agricultural by-products, such as wood cuttings, otherwise often burned, at the same time deriving value from this resource (Rayne *et al.*, 2008). The drawback of using vine cuttings for this purpose is the high energy and solvents requirement (Andre and Renimel, 2010). This process is therefore incompatible with sustainable development (Donnez *et al.*, 2009).

The marketing approach for using resveratrol as a food supplement, has been very much based on the “French paradox” and the grapevine, although resveratrol is not commercially obtained from the grapevine but another plant well-known for its stilbenes synthesis, the Japanese knotweed (*Fallopia Japonica* or *Polygonum cuspidatum*) (Beerling *et al.*, 1994). This plant contains mainly piceid, which is a glycosilated derivative of resveratrol. According to some studies, the extraction of resveratrol and piceid from a dry knotweed roots can be made through simple a process (Chu *et al.*, 2005) but knotweed roots contains a low amount of resveratrol (0.1 to 0.2 % DW) (Zhao *et al.*, 2005). The majority of the stilbenes are in glycosilated form and have to be hydrolysed to release the free form of the molecule. At the moment, Japanese knotweed constitutes the major source of resveratrol and global production and supply come mainly from China.

Resveratrol is the most widely studied stilbene due to the role it plays in plant defence and its potential therapeutic properties. It was first extracted from the roots of *Polygonum cuspidatum* and from the tea Itadori roots (Nonomura *et al.*, 1963). After twenty years of research, resveratrol has shown an efficacy in relation to the prevention and treatment of cancer, protection against neurodegeneration, but also an induction of the Sirtuin genes involved in resistance against type-2 diabetes and longevity in organisms with a short life span, such as yeasts and drosophilas (Wood *et al.*, 2004 ; Howitz *et al.*, 2003).

Biotechnology represents a promising alternative to produce natural molecules of interest, avoiding many of the drawbacks of chemical synthesis or extraction from plants. Actually, extraction from plants seems to be suitable solution provided in sufficient amounts. but the extraction techniques consume much energy and large amounts of solvents, which is in

conflict with the current policy of sustainable development (Andre and Renimel, 2010). In particular (i) the use of genetically-modified microorganisms to produce molecules of interest and (ii) *in vitro* plant cell suspensions under controlled conditions are nowadays widely investigated to produce specific metabolites.

Using cell suspension culture, bioproduction of targeted metabolites is most often carried out through elicitation. Elicitation consists in stimulating the production of plant cell defence responses through a physical or chemical stress (Mulabagal and Tsay, 2004 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Namdeo, 2007). In the *Vitis* genus previous works have shown that cell suspension cultures of *Vitis vinifera* cv. Gamay Fréaux var. Teinturier could produce phenolic substances identical with those found in wine such as condensed tannins, anthocyanins and catechins. This was achieved thanks to media containing high sucrose and adjusted mineral contents concentrations (Decendit and Mérillon, 1996). This variety has been used to produce piceid and other various resveratrol glucoside derivatives, also induced by high sucrose concentrations (Larronde *et al.*, 1998). Methyl jasmonate was used as an elicitor on the same variety, which led to production of stilbene, mainly piceid and little resveratrol (6 mg/L) (Vitrac *et al.*, 2002). Methyl jasmonate induced also stibenenes synthesis in *Vitis vinifera* cv. Limberger (Repka *et al.*, 2004) and cv. Barbera (Tassoni *et al.*, 2005). Another study revealed that L-alanine activated, through programmed cell death response, gene expression of stibenenes pathway in *Vitis labrusca* cv. Concord (Chen *et al.*, 2006). Dimethyl- β -cyclodextrin was the elicitor that gave the highest amounts of resveratrol in *Vitis vinifera* cv. Monastrell and cv. Gamay rouge (up to 5000 mg/L) (Bru and Pedreno, 2006). However, such results were obtained at a small scale (50 mL Erlenmeyer flasks containing 10 mL of suspension). Further work on cv. Monastrell in 250 mL flasks containing 100 mL of suspension reported a resveratrol production of 4000 mg/L thanks to combined elicitation between methyl jasmonate and cyclodextrin (Lijavetzsky *et al.*, 2008). A scale-up of this work remains to be done.

Regarding the plant hormones in different media, the Murashige and Skoog medium is supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an auxin (0.2 mg/L, Donnez *et al.*, 2011; 0.1 mg/L; Ferri *et al.*, 2011) and with benzylaminopurine (BAP) as a cytokinin (0.5 mg/L, Donnez *et al.*, 2011; 1 mg/L; Ferri *et al.*, 2011). 1-naphthaleneacetic acid (NAA) is another possible auxin (0.093 mg/L, Aumont *et al.*, 2004) and kinetin as a cytokinin (0.22 mg/L, Aumont *et al.*, 2004). Our medium contained NAA (0.1 mg/L) and kinetin (0.2 mg/L).

The production of resveratrol at an industrial scale is increasingly gaining interest. The purpose of this study was to scale-up the culture of *Vitis labrusca* cell suspensions from 300 mL shake-flask and 2L bioreactor (Donnez *et al.*, 2011) to 5L bioreactor for the bioproduction of resveratrol under controlled aeration and stirring. Parameters such as pH, biomass, resveratrol, sugar concentrations and dissolved oxygen concentrations were followed over time in order to identify the major reactions, estimate their rates and determine the optimal conditions for resveratrol production.

Materials and Methods

Plant material

The Concord variety is the most widely farmed grapevine variety in the Eastern United States. This variety belongs to the *Vitis labrusca* species or may be a natural hybrid between *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* (Tukey, 1966).

Stock Concord cell suspensions were cultured in Erlenmeyer flasks (300 mL total volume) in Gamborg B5 liquid culture medium (100mL) (Gamborg *et al.*, 1968) modified after Donnez *et al.* (2011). The medium supplemented with sucrose (30 g/L), 1-naphthaleneacetic acid (NAA; 0.1 mg/L) and kinetin (0.2 mg/L). The pH of the medium was adjusted to 5.8 with the addition of sodium hydroxide (0.1-2.0 M) or muriatic acid (0.1 M) prior to inoculation with plant cells.

Incubation in shake-flask culture and maintenance of the cell line

Cell suspensions were incubated (23°C) in darkness on a rotary shaker (SHKE 8000; Thermo scientific, 110 rpm; 25.4 mm/orbit radial movement). They were maintained in a state of perpetual growth through weekly subculture into fresh medium at a 33% (v/v) rate.

Biomass measurements

In order to simplify future studies, we looked at the different methods of biomass measurement during exponential growth and we standardised them against dry weigh (DW). It rests for each research group to determine their own conversion coefficient, which will depend on the exact conditions used by each group, with the knowledge that the relationship between the measurements reported here is linear. Two broad kinds of measurements were performed, those based on wet biomass and those based on dry biomass. Different techniques were used for wet biomass measurements, namely, centrifugation (5,000 g, 20 min, 18°C) followed by weighing the hydrated pellet, measurement of the packed cell volume (PCV, relative volume of the pellet after centrifugation), filtration or dripping in each case followed by weighing the hydrated biomass.

For DW measurements cell suspension was centrifuged (5,000 g, 20 min, 18°C). The pellet was then dried at 105°C for 7 days, cooled in a desiccator with anhydrous calcium sulphate and weighed.

Wet biomass determination of biomass concentration

PCV determination by centrifugation

Centrifugation was performed as described above; the relative volume of the pellet to the total volume was measured using the centrifuge tube graduations. This measurement was performed in triplicate.

Filtered mass determination

The suspension was filtered with the aid of a vacuum pump through a stainless steel support screen and the biomass weighed. This measurement was performed for each time point without replicates.

Dripped mass determination

This was another method for the separation of the biomass from the medium. The cell suspension was allowed to drip on a stainless steel sieve with a nominal aperture of 250 μm , and the biomass was weighed. This measurement was also performed for each sample point without replicates.

WW determination

Three centrifugation tubes were each filled with sample (15 mL). They were then centrifuged (5000 g; 20 min; 18°C), the hydrated biomass was then weighed.

Dry biomass determination of biomass concentration (DW)

After the centrifugation described above for WW measurements, the pellet was rinsed twice with pure water (Millipore deionized) in order to eliminate sugars and other soluble medium components. The washed pellet was then resuspended in the deionized water (approx 15 mL) then centrifuged as described. The pellet was again resuspended in deionized water and the resulting cell suspension transferred into a pre-weighed aluminium containers ($\varnothing = 100 \text{ mm}$). The container and its contents were placed in an oven (105°C) for seven days. The aluminium containers containing the dried biomass were cooled in a desiccator containing anhydrous calcium sulphate before being weighed. Dry weight measurements were performed without replicates.

Resveratrol measurements

Since 90% of the total resveratrol produced by the cells is excreted in the culture medium (Donnez *et al.*, 2011), resveratrol concentration was measured in the culture supernatant. After storage at -20°C and subsequent thawing of these sample (20 mL) the supernatant was washed with 40 mL of ethyl acetate and the organic phase was evaporated to dryness using a rotary evaporator (Büchi, Rotavapor RII). The concentrate was resuspended in 1 mL of methanol and the concentration of resveratrol measured by HPLC (Ultimate 3000, Thermofisher).with a UV detector (DAD 3000) and a column designed for stilbene analysis (2.1 mm x 100 mm Acclaim RSLC PolarAdvantage II). The mobile phase consisted of water (Millipore) as elution solvent A and acetonitrile (Fisher; HPLC grade) as elution solvent B. A linear gradient elution profile was used. Pressure was generally adjusted between 200 and 450 bars and oven temperature at 30°C . The standard we used was resveratrol, approx. 99 % GC (Sigma).

The detection limit was 0.5 mg/L and the saturation limit was 100 mg/L, both for injections of 10 µL. The linearity of the calibration was $R^2 = 0.99994$ over 50 points. The average relative standard deviation on the linear part of the calibration curve was 0.7%.

Carbohydrate measurements

Carbohydrates were also measured by HPLC (Ultimate 3000, maximum pressure 620 bar; Thermofisher) with an RI detector using an isocratic elution profile (constant flow rate = 0.5 mL/min). The mobile phase consisted of water (Millipore) acidified with sulphuric acid (2 mM). Pressure was adjusted to 70 bars and oven temperature at 30°C. The standards we used were D-(-)-sucrose (Acros Organics), D-(+)-glucose (Sigma) and D-(-)-fructose (Fisher Scientific). All were analytical grade chemicals.

The detection limit for carbohydrates was 0.05 g/L for an injection volume of 10 µL with saturation being reached at 10 g/L. The linearity of the calibration was between $R^2 = 0.99880$ to $R^2 = 1.00000$ over 80 points. The average relative standard deviation on the linear part of the calibration curve was 0.6 %.

Bioreactor parameters

A stirred bioreactor (Sartorius Stedim, Biostat B plus) with a glass vessel (total volume 6.6 L; working volume 0.4-5.0 L) and a standard helix (3 blade segment impeller, adjustable; Ø = 7 cm) were used. The vessel was equipped with a pH and a polarographic dissolved oxygen probes. The speed of the stirrer was set to 100 rpm, except for the last nine days of the first run, during which time it was increased to 120 rpm to improve mixing of the thick culture. The aeration rate to 20 mL/min (0.013 VVM at atmospheric pressure) at the beginning of the run and next increased from 15-20 mL/min at the beginning of the incubation period then to 750-780 mL/min from 124-141 hours with the aim of counterbalancing the fall of dO₂ as the biomass concentration increased. All culture runs were conducted at 23°C.

Dissolved Oxygen dO₂ was measured with a polarographic (OxyFerm FDA 325; Hamilton) dO₂ probe. The probe was calibrated for the zero point straight after autoclaving whilst still hot and for the 100% dO₂ point by passing air (750 mL/min) through the attemperated medium.

The culture pH was measured with (EasyFerm Plus K8 325; Hamilton). This was calibrated before autoclaving at pH values of 7.0 and 4.0 and then after autoclaving with a point calibration at each time point by measurement of the pH of the sample using an external calibrated pH probe and adjusting the bioreactor pH reading accordingly.

The actual air-flow out of the bioreactor was measured daily by timing the volume of gas accumulated in an inverted measuring cylinder (1 or 2 L depending on the flow rate) filled with water.

Samples (45 - 90 mL) of culture were removed from the bioreactor daily or twice daily (when adding medium) for analysis and was not replaced by fresh medium.

Culture strategy

Plant cultures necessitate a high inoculation rate (2.0 g DW/L). Inoculation of 5L would have required a substantial volume of shake-flask cultures. This problem was avoided by inoculating a smaller volume of medium and adopting a fed-batch culture regime through two increasingly larger additions of medium to the bioreactor.

In the bioreactor, the initial medium (1.2 L) was inoculated with shake-flask cultures (300 mL). The biomass was allowed to increase for approximately seven days. After this period, the cell concentration had sufficiently increased to allow the addition of further sterile medium. After a further 3 days growth the volume of the culture was completed to 5 L (except for first batch: 3.5 L) with the addition of a final volume (3.0-3.3 L; 1.8 L for the first batch) of sterile medium. After approximately 333-367 h of growth, the cells were elicited with the addition of methyl jasmonate (Sigma-Aldrich 95% purity; 0.5 mM). The methyl jasmonate was first mixed with ethanol before addition into the culture. Ethanol had already been shown not to affect elicitation (Donnez *et al.*, 2011).

There were three different experiments (batches) in the bioreactor. The first culture was interrupted before the resveratrol concentration reached its maximal value. The second culture was continued until the resveratrol concentration reached its maximum level and fell again. The third culture was a duplicate of the second culture. In order to smooth the growth curves instead of plotting the biomass concentration, the total biomass in the bioreactor was calculated and plotted, taking into account the volumes of sample removed and the volumes of medium added.

Statistical analysis

The bioreactor culture was repeated in three batches over a period of approximately a year. Although the duration of the batches varied, the conditions applied were identical. The growth results were very close for two of the batches and slightly different for the third batch. No statistical analysis was performed on the results obtained other than the statistical controls performed for the analyses and reported above for each analysis.

Results

During the course of these studies the various measurements of biomass used by different researchers were compared. In general, only the results from the third batch are presented for simplicity's sake. Where there were significant differences between the three results from the three batches they are highlighted in the text.

Biomass measurements

Various methods are used for biomass measurements by the different research teams in the world, based on their ease of application or accuracy. We compared (Fig. 1.a & b) the methods that we had encountered in the literature. A good correlation was observed between

the DW measurement and all other measurements of the non-elicited biomass (table 1). Under our conditions, the wet weight (WW) measurement could be converted to dry weight (DW) by dividing the value by 55.715. Similarly, for estimating the DW from the PCV, the percentage PCV could be multiplied by 0.0573. Under our conditions the dry weight could be estimated from the filtered weight of the biomass divided by 18.737 or by dividing the dripped weight by 47.191.

The correlation between DW and other methods of biomass measurement were less well correlated after elicitation (data not shown).

Bioreactor cultures

Growth

For the three batch cultures, the biomass concentration was plotted against time. The duration of each batch was slightly different hence the biomass grew to different extents in the three batches (Fig. 2). In this figure (2.a) the total biomass in the bioreactor is presented as it increases with time. An exponential growth rate was measured for the cultures in the three batches. On average this was 0.0085 h^{-1} (range $0.0076\text{-}0.0093 \text{ h}^{-1}$). This growth phase continued until approximately 330 h when the culture was elicited thus ending exponential growth. Nevertheless, growth continued until approximately 500h reaching approximately 43 g DW of biomass (in 5L) for two of the batches (2 & 3). The first batch behaved differently in that initially it had a lower biomass concentration than the other two batches and that growth stopped completely after elicitation so the maximum biomass encountered was 24 g DW). For the third batch, a short stationary phase (150-180 h) was observed immediately after the first addition of medium. The specific growth rate measured after this short stationary phase was faster than that measure before the stationary phase.

In the three experiments (see table 2), four exponential growth phases were detected. There was a 10% variation in all the specific growth rates (μ) measured in the three batches with a mean value of 0.0085 h^{-1} . This could have been related to the way the fed-batch process was carried out. In the third batch, a lag phase was observed after the first addition of medium. On the whole an average doubling time of 82 h was measured.

Carbohydrate utilisation

A significant extracellular invertase activity was observed during the experiments (Fig. 2.c). The concentration of sucrose (the sole carbon source added to the medium) decreased rapidly and was exhausted by 120 h. Each time fresh medium was added, the same pattern was observed with a rapid decrease and exhaustion of the sucrose concentration in the medium. This was always accompanied by an increase in the glucose and fructose concentrations in the medium indicating extracellular invertase activity. Glucose was always used quickly and in preference to the fructose. It is notable that elicitation of the cells was always initiated when fructose remained as the sole carbon source.

Taking the first steps towards the optimization of a future industrial process, the kinetics of the carbohydrate utilisation by the biomass was examined. The results of the third batch are

shown in figure 2.c. The sudden changes in carbohydrate concentrations at 141h and 212h correspond to the additions of medium.

Resveratrol production

The resveratrol concentration in the medium remained at approximately zero for the first 71-169 h after elicitation (Fig. 3). Then the resveratrol concentration in the medium increased with a non-linear progression up to a maximum (16 to 66 mg/L; 294 to 336 h after elicitation). After reaching this peak, the concentration of resveratrol decreased non-linearly. This pattern was observed on both the second and the third bioreactor batches but the first batch was terminated before reaching the maximum resveratrol concentration.

Discussion

In this study, the culture of *Vitis labrusca* and resveratrol production was transferred from shake-flask culture to 5L bioreactor culture. This allowed the partial optimisation of growth conditions for the grapevine variety, the medium components, the incubation conditions and the elicitors used. This more reproducible culture system was employed to study and model the production of resveratrol, which could fit either an exponential or a quadratic model. Each of the models presents its own implications in terms of the synthesis or activation of the pathways leading to resveratrol formation, which will be discussed below.

Variety

Different varieties (strains) have been grown in bioreactors: *Vitis vinifera* (L.) cv. Gamay Fréaux var. Teinturier, especially a clone (GT₂ strain) (Aumont *et al.*, 2004) chosen for its production of high amounts of anthocyanins (Krisa *et al.*, 1999); the variety 41B rootstock (*Vitis vinifera* cv. Chasselas×*Vitis berlandieri*) (Donnez *et al.*, 2011) for the production of resveratrol and its oligomers, viniferins; and *Vitis vinifera* cv. Barbera stemming from petiole cells (Ferri *et al.*, 2011). The choice of variety depends on the aim of the experiment, particularly the metabolites sought (stilbenes, anthocyanins, catechin...), the biomass necessary and the required cell robustness. In this way, the Concord (*Vitis labrusca*) variety appeared to be a reliable source for stilbene production in bioreactor culture. This variety was robust and produced concentrations (16 – 66 mg/L) of resveratrol encountered by other researchers (Table 5).

Medium used

We compared our results with the Gamborg medium with those used previously (Table 5). Liquid media for plant cells have generally the same basic components; macroelements (N, P, K, Ca, Mg, S), microelements (Co, Cu, Fe, B, I, Mn, Mo, Zn), vitamins (myo-inositol, nicotinic acid, pyridoxine, thiamine), hormones (auxin and cytokinin) and carbohydrates as carbon source. The relative concentration of these constituents can vary between different media. In our experiments, we used Gamborg medium (Gamborg *et al.*, 1968) with a C:N atomic molar ratio of 39.4 which is very high compared to the normal value for balanced

growth of 5, although this imbalance may favour the production of secondary metabolites. The media encountered in other studies were Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) (Ferri *et al.*, 2011), modified Murashige and Skoog (Donnez *et al.*, 2011) or a combination of both (Aumont *et al.*, 2004), with a C:N ratio of 5.8, 17.4 and 26.2 respectively. The results from these studies are summarized in table 5.

Different sources of nitrogen are used in different media namely NO_3^- or NH_4^+ and often both but in different ratios in different media. In our medium, as in Aumont *et al.*, 2004, the molar ratio of nitrate to ammonium was 12.2, whereas it was 1.9 for Donnez *et al.*, 2011 and Ferri *et al.*, 2011. The carbohydrate source was sucrose at different concentrations in the two media (20 g/L, Aumont *et al.*, 2004; 30 g/L, Donnez *et al.*, 2011, 10 g/L, Ferri *et al.*, 2011).

Biomass production

A critical aspect of the plant cell cultures in bioreactors is their ability to grow in a sufficient quantity. It is not obvious to transfer a shake-flask growth protocol into a bioreactor and this can be a scale-up obstacle. The biomass concentration reached in our experiments was 7.0-10.1 g DW/L. This compared well with other studies: 27.6 g DW/L (Aumont *et al.*, 2004), 19.7 g DW/L (Donnez *et al.*, 2011) and 2.3 g DW/L (Ferri *et al.*, 2011).

Carbohydrate utilisation

Sucrose was extracellularly degraded to glucose and fructose corresponding to an extracellular invertase activity. Glucose was then consumed in preference to fructose. From our data it was not possible to determine whether or not sucrose was taken up by the cells directly in addition to its partial degradation outside the cells. Another unlikely but possible alternative that was not investigated was that of an internal hydrolysis of sucrose followed by the release of the resulting monosaccharides into the extracellular medium. It was possible to calculate the rates of disappearance of each carbohydrate from the medium in the absence of the others (Table 3). Each carbohydrate profile with time had a linear section where the concentration of the other carbohydrates did not change; these sections were used to calculate the rates of carbohydrate consumption for each of the carbohydrates. The exception was sucrose that decreased at the beginning of the incubation period, during a period where glucose and maybe even fructose could have been used. As this carbohydrate is not produced in any way from the degradation of other carbon sources present in the medium, the measure of its utilisation rate was considered to have been realistic. Contrary to sucrose and glucose, the consumption rate of fructose was calculated after elicitation since elicitation was carried out after the practical exhaustion of glucose leaving fructose in the medium to act as carbon source for the production of secondary metabolites such as resveratrol.

Elicitation

Different elicitors have been used in different studies. Donnez *et al.*, 2011, Ferri *et al.*, 2011 and Morales *et al.*, 1998 used methyl jasmonate, chitosan and dimethyl- β -cyclodextrins respectively. In our experiments, with methyl jasmonate, the resveratrol concentration reached a maximum 66 mg/L which compared to 209 mg/L (Donnez *et al.*, 2011) and 374

mg/L (Morales *et al.*, 1998). Expressed in DW ratio this gives 38.9 $\mu\text{mol/g DW}$, which is much higher than 5.9 $\mu\text{mol/g DW}$ encountered by Ferri *et al.*, 2011. Our experiments provide a basis for the culture of the cells in more reproducible conditions as we used bioreactor cultures. Although at present, the concentration of resveratrol produced in our bioreactor cultures was not the highest reported in the literature, we aim to optimise the system for a higher productivity of resveratrol using the resveratrol production models that we have developed here and optimising the sugar type and concentration available to the cells during the resveratrol production rate.

Resveratrol production

Two kinds of models for the production of resveratrol can be considered; firstly an exponential model (Fig. 3.b), secondly a quadratic model (Fig. 3.c).

The first model was that of an exponential production. To verify this hypothesis, the resveratrol concentration was plotted on a semi-logarithmic graph (Fig. 3.b). Linear parts on this graph correspond to a good fitting with the model and allow the determination of the coefficient c in the equation:

$$[\text{resv}] = [\text{resv}]_0 \cdot \exp[c(t-t_0)]$$

which gives the rate of resveratrol production.

$[\text{resv}]$ = resveratrol concentration in g/L at time t

$[\text{resv}]_0$ = resveratrol concentration in g/L at the time t_0 , the time when the concentration of resveratrol starts to increase exponentially

t = time in h

Similarly to the biomass growth, a doubling time can be calculated ($T_d = \ln 2/c$). Results are shown in table 4.a. At the beginning of the exponential phase, the production seems to take time to fit the model but this could be related to the fact that on a logarithmic scale, low concentrations are less reliable. In the second and third batches, that initial period of low resveratrol production gives way to an exponential phase of resveratrol production that fits well with the model. Correlation coefficients between the model and the experimental points are over 0.99, on more than 5 points and over a period of 95 to 169 h (depending on the batch). However, the calculated Relative Standard Deviation (RSD) for c and T_d between three experiments (22-23%) indicated not very reproducible rates of production. It is possible that those coefficients may depend on other unmeasured parameters that were not completely identical between the three bioreactors due to experimental variability (inoculation rate, duration of growth phases, aeration rate, and the precise concentration of methyl jasmonate). Furthermore, due to a possible accumulation of the biomass in some part of the vessel, the culture might not have been completely homogeneous and this could have influenced all these parameters. To go further than this first empirical study, a phenomenological explanation can be proposed for this model. Since resveratrol is a defence metabolite for plants, it seems relevant for its synthesis to be as fast as possible in step with a potential exponential increase

in the population of the microbial plant aggressor. The exponential model in this case would appear more logical. In mechanistic terms this could be explained by the phenomenon of auto-activation of the resveratrol synthesis by resveratrol itself. Supposing this mechanism to be first-order, the speed of resveratrol synthesis would be proportional to resveratrol concentration:

$$d[\text{resv}]/dt = k[\text{resv}].$$

The integration of this differential equation gives an exponential solution:

$$[\text{resv}] = [\text{resv}]_0 \cdot \exp(k \cdot t)$$

where k takes the values found for c ($0.12\text{-}0.19 \text{ h}^{-1}$).

The hypothesis of an alternative model has been investigated. The resveratrol profile could be fitted to a quadratic model. The square root of resveratrol concentration was plotted against time (Fig. 3.c). Just as the exponential model, the linear parts of the graph show the goodness of fit. A linear regression gives

$$\sqrt{[\text{resv}]} = a \cdot t - b \text{ and consequently,} \quad (\text{equation 1})$$

$$[\text{resv}] = (a \cdot t - b)^2 = a^2(t - b/a)^2$$

$$\text{Finally, } [\text{resv}] = c (t - t_0)^2$$

where $c = a^2$ is calculated from the slope of the straight line given by equation (1) above

$t_0 = b/a$ is the time when the concentration becomes detectable.

Results are shown in table 4.b. Considering the beginning of the quadratic phase (Table 4, b), for the first batch, it fits later than the exponential model whereas quite sooner for the second one. So the activation time of the three batches was quite homogeneous (146-169 h). Like with exponential growth model the fit is good until the maximum resveratrol concentration is reached. The correlation between the experimental points and the model is excellent ($R^2 > 0.9977$) for 5 or 6 points (except for the first batch), over a period of 72 to 167 h. On the other hand, the rates of resveratrol production are very different for the second and third batch where c is five times greater in the second batch. This could confirm the idea that there might be other culture parameters necessary for the refinement of the model. With this quadratic model, a phenomenological approach can also be considered by relating resveratrol production to the concentration in enzyme (STS). Supposing the speed of enzyme synthesis is constant: $d[\text{enz}]/dt = k_1$, if the initial concentration $[\text{enz}]_0$ equals zero, the integration gives:

$$[\text{enz}] = k_1 \cdot t.$$

For a first-order relation between the speed of resveratrol synthesis and the enzyme concentration, we have:

$$d[\text{resv}]/dt = k_2 \cdot [\text{enz}] = k_2 \cdot k_1 \cdot t$$

and, after a second integration (with $[\text{resv}]_0 = 0$ for initial condition):

$$[\text{resv}] = k_2.k_1.t^2/2.$$

This can be ascertained with the quadratic relation:

$[\text{resv}] = c(t - t_0)^2$ where t_0 is $t_0 = 0$ the time point at which point resveratrol becomes detectible and $c = k_1.k_2/2$

A first estimation for the product of the rate of reaction $k_1.k_2$ can be given from the values found for c ($0.612 \mu\text{g/L/h}^2 < k_1.k_2 < 3.30 \mu\text{g/L/h}^2$).

Conclusion

An explanation of the difference between our work and other studies could be the level of aeration. Indeed in an attempt not to limit the cultures by the availability of oxygen, our aeration rate was quite high. Oxidation could then destroy the resveratrol produced in the bioreactor, resveratrol being a powerful antioxidant, although in our cultures the dissolved oxygen concentration was inferior to 16 % of the dissolved oxygen concentration in the absence of cells. The biomass produced in this work was also inferior to the majority of the studies cited here (table 5). This could be related to different causes: the very high C:N ratio of the Gamborg medium, the possible inhibition due to high sugar concentrations, limitation by nitrogen source.

The resveratrol production in the third batch was much higher than in the second. We will not consider the first batch here because it was not followed for as long as the other batches. The conditions used for all the batches were identical, yet a lag phase was observed during the early part of the third batch. The highest concentration of resveratrol was observed in that very batch amongst the three batches. Much remains to be understood about the effect of the growth conditions on resveratrol production but could it be that a stress, such as the one that caused the short stationery phase, could prime the cells for a higher rate of resveratrol production later on after elicitation?

Two mathematical models for the accumulation of resveratrol in the medium have been suggested in this study. What is lacking from both models is the rate of resveratrol degradation. This rate could not be measured directly, nor could it be assumed to be constant. The mathematical conclusion of the exponential model is that the product (i.e. resveratrol) further activates its own production. In nature, an exponential response to a microbial invasion of a plant seems logical as microbial growth (therefore the attack) is exponential. There could be a cascade mechanism for the activation of the plant defense response.

The mathematical conclusion of the quadratic model is that the rate of enzyme synthesis is constant. Considering this simply by assuming that the enzyme has a very long half-life and that its activity is not modulated (enhanced or suppressed), the accumulation of resveratrol over time would increase in a quadratic fashion. This would be contrary to a cascade mechanism. It would mean that once activated the plant defense mechanism would keep responding at a constant velocity. Considering the exponential growth of microorganism, at

first sight, such mechanism could appear rather ineffective but it must be borne in mind that in a natural setting, as opposed to pure culture laboratory settings, unrestricted and exponential growth of microorganisms would be unlikely, so an exponential production of resveratrol would be a waste of resources that would have negative effects on the plant itself.

We did not attempt to model the decay of resveratrol in the medium as this phase contains too many unknowns. Is the resveratrol enzymatically converted or is this process purely chemical or both? Does the rate of resveratrol production vary according to the presence of its degradation products? Do the cells finally succumb to the deleterious effects of elicitation?

One aspect of our results that we found interesting was that grapevine cell growth in bioreactor cultures followed microbial models for exponential growth. The production of resveratrol by elicited *V. labrusca* cells fits well to two mathematical models. We have developed a fed-batch process that would enable to start the culture with a reduced mass of inoculum, opening the way for the first scale up steps for the production of resveratrol in bioreactor culture. A great deal of optimisation work indeed remains to be done before proof of concept at industrial scale. The measured doubling time of cell growth (82 h) could be used for future work where the medium could be fed into the bioreactor smoothly and continuously.

Future work would look at the possibility of protecting resveratrol from oxidation. We could also measure the rate of the different carbohydrates consumption and the effect of initial carbon concentration on the growth rate of the plant cells. Supplementation of the medium with additional nitrogen source would also be a necessary step in the optimization and intensification of plant cell cultures.

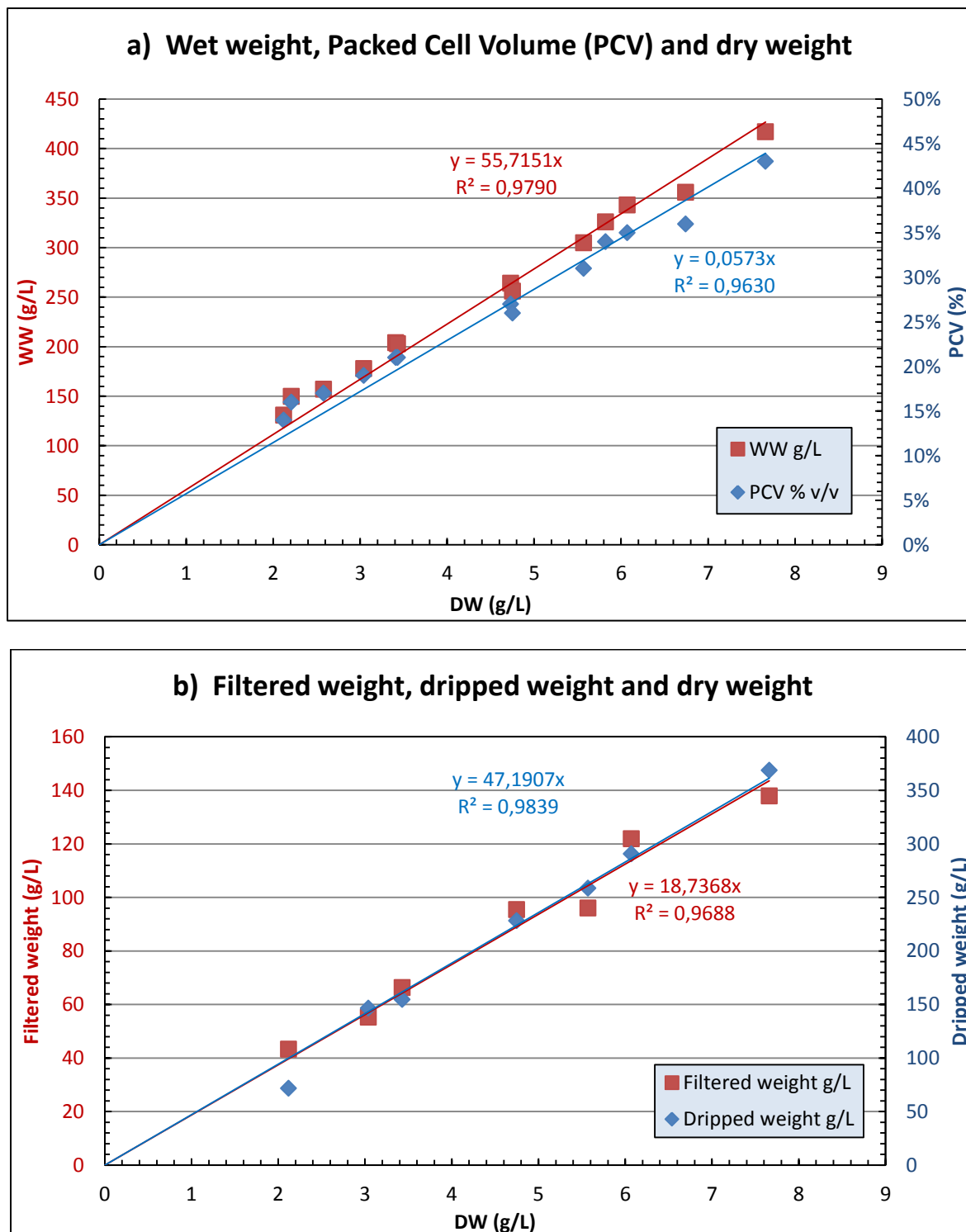
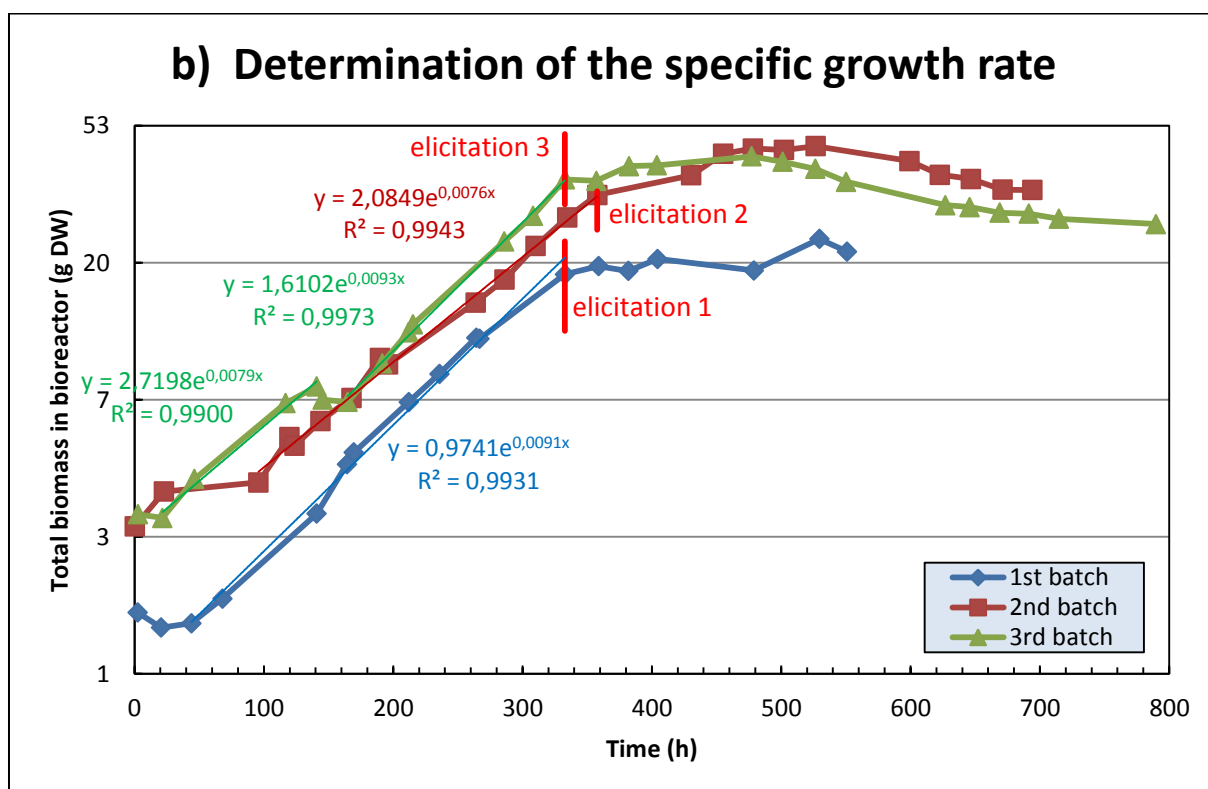
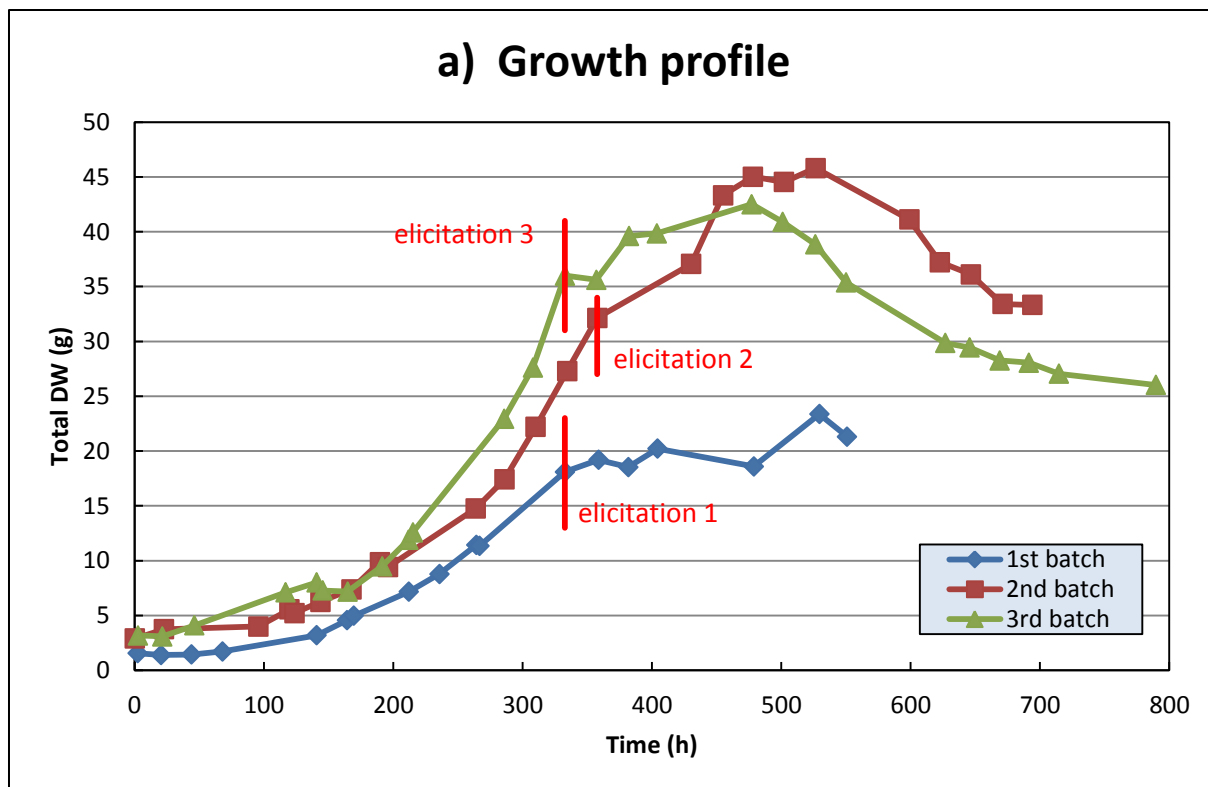


Figure 1. Correlation of different biomass measurement methods



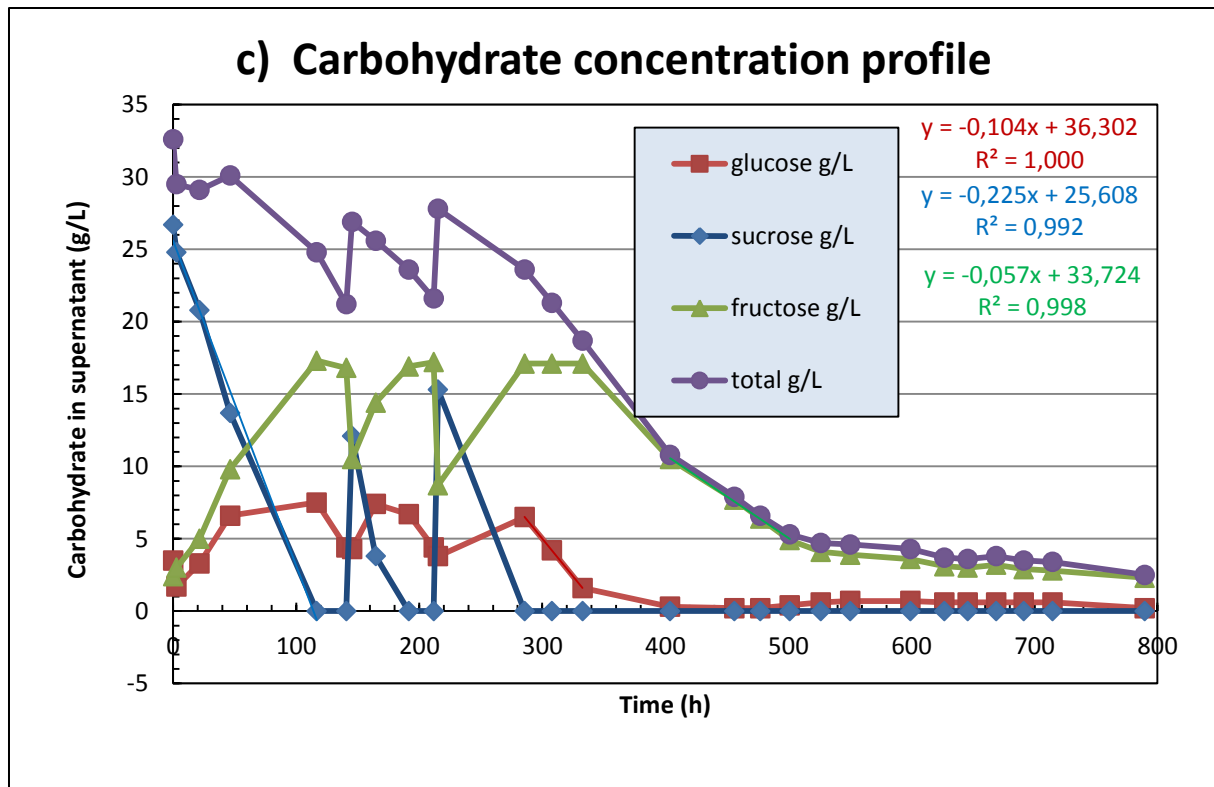
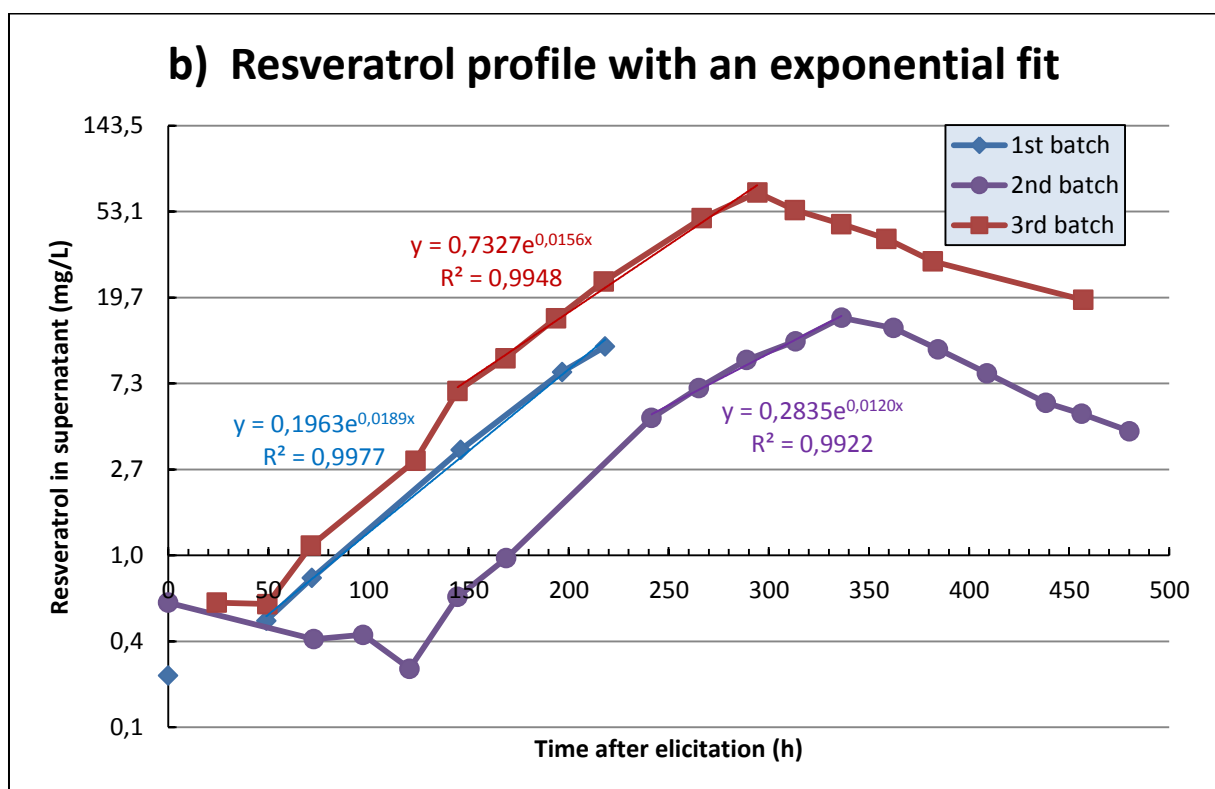
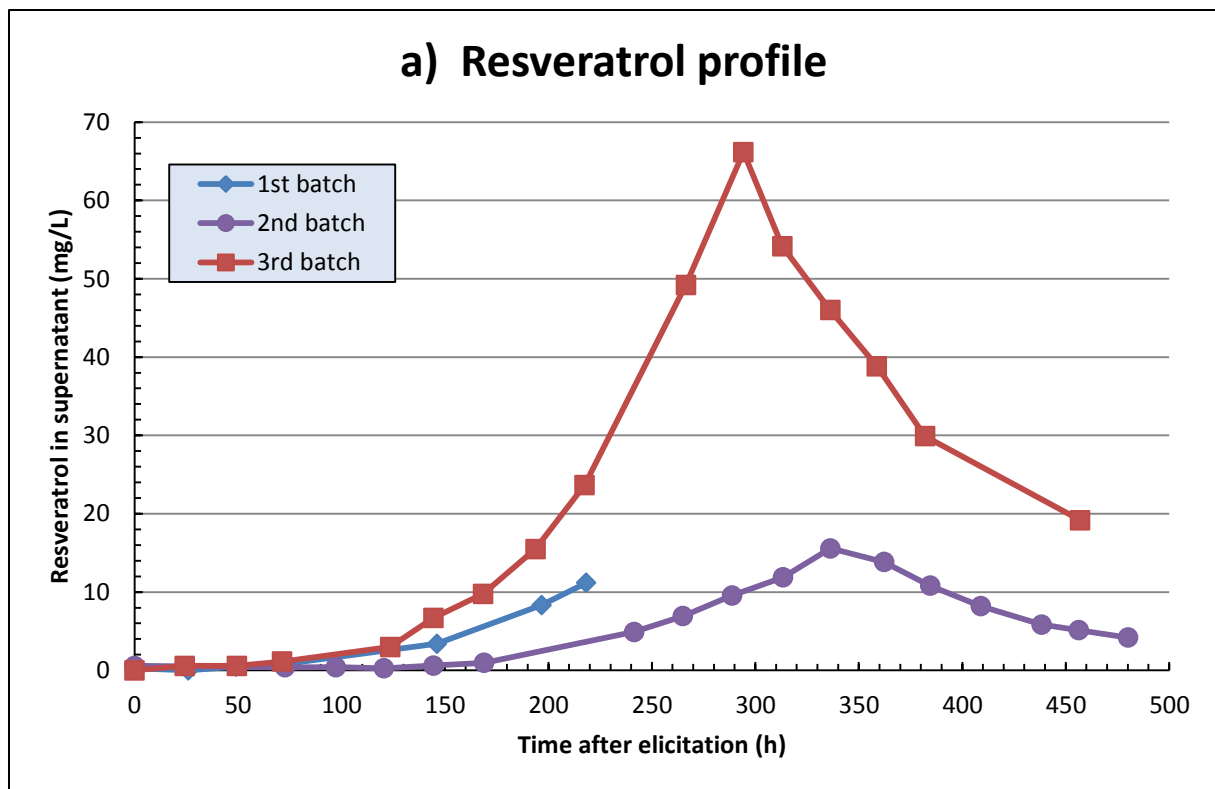


Figure 2. Growth profile of Concord vegetal cells in the 5L bioreactor. a & b) The growth patterns observed lent themselves to treatment for exponential growth but several exponential phases were observed with different specific growth coefficients (μ). b) The semilog plots allowed the calculation of the specific growth rates. In the third batch, a short lag phase can be seen after the first addition of medium. c) The growth medium contained only sucrose which was degraded externally to glucose and fructose. The linear formulae represent the equation that describes the part of the graph over which the rate of the disappearance of each particular carbohydrate was calculated. The formula for the utilisation of each carbohydrate is in the same colour as the line for the concentration of the same carbohydrate.



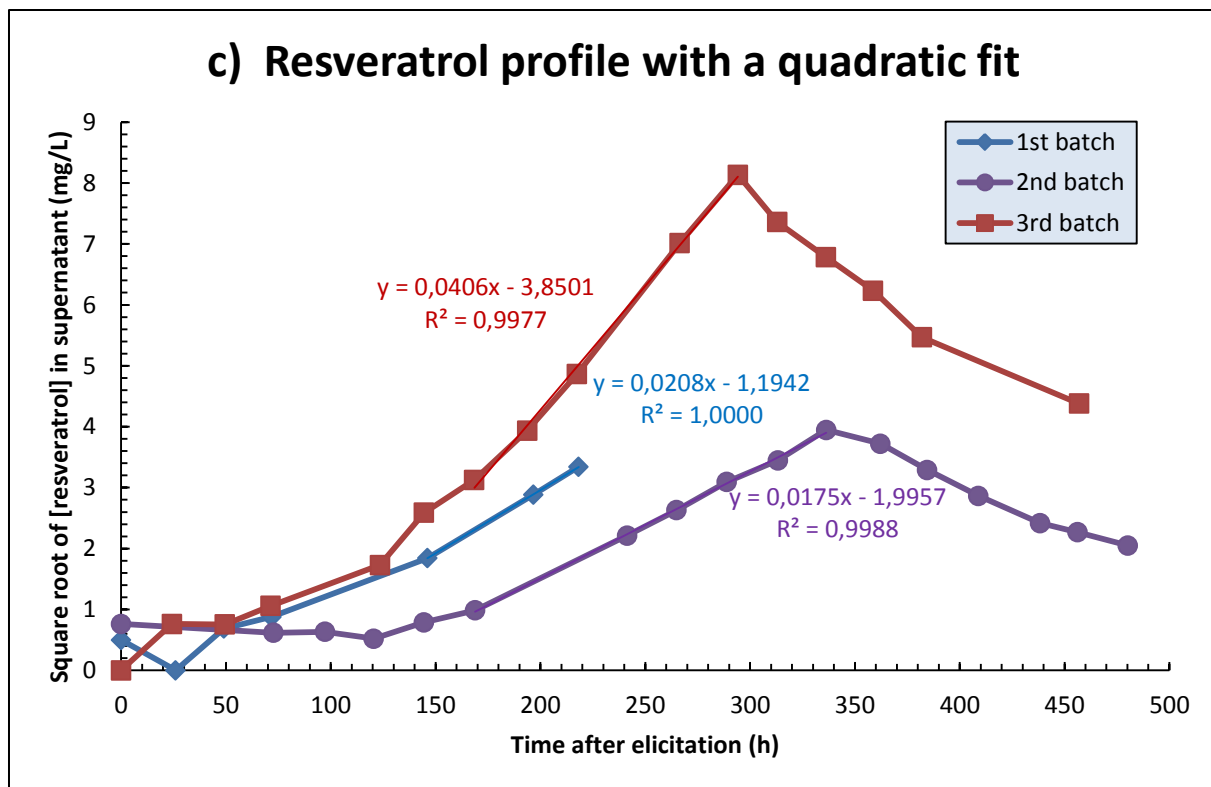


Figure 3. Resveratrol production after elicitation. In the above graphs, time zero refers to the point (approximately 310 h) the culture was elicited with the addition of methyl jasmonate. a) Resveratrol concentration produced in the three batches is plotted against time. b) This graph is a semi-logarithmic representation of the previous graph. This allow to verify the exponential model. c) The square root of resveratrol concentration is plotted against time in order to verify the quadratic model. In the first batch the experiment was stopped too early but in the following two batches, the experiment was allowed to continue in order to measure the peak value of resveratrol and its decay.

Table 1. Biomass measurements correlation factors in relation to DW measurement. Linear equation ($DW = C + MX$) where the DW (g/L) could be calculated from other biomass concentration measurements (X). C is equal to zero because all the linear fits are forced through the origin. M varied by less than 10% between the results from the three batches. The average values measured from the three batches are shown in this table.

Measurement	Multiplier (M)	Correlation coefficient (R^2)	Range of biomass concentration used for the correlation (DW g/L or %)	Nb of data points used for the correlation
WW	0.0179	0.979	131 – 417	12
PCV (%)	17.5	0.963	14 – 43	12
Dripped Weight	0.0212	0.984	72 – 369	7
FW	0.0534	0.969	43 – 138	7

Table 2. Specific growth rate of *V. labrusca* cells in bioreactor culture. The dry weight measurements were used to determine the specific growth rate (μ). RSD refers to Relative Standard Deviation calculated by dividing the standard deviation by the mean and expressing the result as a percentage. In the 3rd batch a lag phase was induced by the first medium addition as previously explained in the text.

Batch	Exp. phase (h)	μ (h ⁻¹)	T _d (h)	Correlation coefficient (R ²)	Nb of points used in the determination
1 st	44 – 333	0.0091	76.2	0.993	10
2 nd	96 – 358	0.0076	91.2	0.994	12
3 rd	22 – 141	0.0079	87.7	0.990	4
3 rd	165 – 333	0.0093	74.5	0.997	7
Average	-	0.0085	82.4	-	-
RSD	-	10%	10%	-	-

Table 3. Carbohydrate utilisation by *V. labrusca* cells during bioreactor culture. The sucrose disappearance rate does not indicate its utilisation intracellularly but it is a measure of its hydrolysis in the medium. The glucose disappearance rate from the medium was calculated over a period where there was no sucrose left in the medium and fructose was not consumed by the cells. The hypothesis that glucose would be transformed into fructose intracellularly then excreted back in the medium, keeping the fructose concentration constant, seems unlikely.

Sugar	Measurement made over (h)	Rate of disappearance from the growth medium (g/L/h)	Variation in the concentration of the other sugars over the period of measurement
Sucrose	0 – 117	0.225	Glucose and fructose, both increase
Glucose	286 – 333	0.104	No sucrose, fructose concentration constant
Fructose	404 – 501	0.057	Sucrose and glucose completely depleted

Table 4.a Exponential model to fit resveratrol production after elicitation. Exponential model for resveratrol production $[\text{resveratrol}] = [\text{resveratrol}]_0 \cdot \exp[c(t-t_0)]$ explaining the non-linear increase of resveratrol concentration ($[\text{resveratrol}]$) over time (t). $[\text{resveratrol}]_0$ is the resveratrol concentration at the time t_0 when production starts to become exponential after a lag period. c : resveratrol production rate.

Culture	Exp. Phase (h after elicitation)	c (h^{-1})	Correlation coefficient (R^2)	Nb of points used in the determination
1 st	49 – 218	0.0189	0.998	5
2 nd	241 – 336	0.0120	0.992	5
3 rd	145 – 294	0.0156	0.995	6
Average	-	0.0155	-	-
RSD	-	22%	-	-

Table 4.b Quadratic model to fit resveratrol production after elicitation. Quadratic model for resveratrol production $[\text{resveratrol}] = c(t-t_0)^2$ proposing another explanation for the non-linear increase of resveratrol concentration where t_0 is the time when the concentration becomes significant. c : resveratrol production rate.

Culture	Quadratic phase (h after elicitation)	c ($\mu\text{g/L/h}^2$)	Correlation coefficient (R^2)	Nb of points used in the determination
1 st	146 – 218	0.433	1.000	3
2 nd	169 – 336	0.306	0.999	6
3 rd	169 – 294	1.65	0.998	5
Average	-	0.796	-	-
RSD	-	93%	-	-

Table 5. Comparative table of our results with published results. The references are numbered 1 to 4 which indicate: ¹ Ferri *et al.*, 2011, ² Donnez *et al.*, 2011, ³ Aumont *et al.*, 2004 and ⁴ Morales *et al.*, 1998. * In this study the antibiotic rifampicin which is also known to act as an elicitor, was added in order to decrease the risk of bacterial contamination. MeJ is methyl jasmonate, CD is cyclodextrin. In the table, the study with the C:N ratio of zero was performed under photosynthetic conditions. If a plot of biomass concentration is made against the C:N ratio (figure not shown) a bell shaped curve is obtained where the biomass concentration in our study forms the last point and is responsible for the bell form of the graph.

C:N ratio of medium (mol/mol)	Molar ratio of $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	Maximum Biomass produced (g DW/L)	Biomass productivity (g DW/L/h)	Elicitor	Reference	Highest concentration of resveratrol obtained (mg/L)
39.4	12.2	9.16	0.017	MeJ	This study	66
5.8	1.9	2.3	0.0068	Chitosan*	1	1.2
17.4	1.9	19.7	0.043	MeJ	2	209
26.2	12.2	27.6	0.082	None	3	Not reported
0	12.2	11.9	0.102	CD	4	374

References

- Andre P, Renimel I, LVMH Recherche (2010) Protecting and regenerating composition. US 7 718 203 B2.
- Arichi H, Kimura Y, Okuda H (1982) Effects of stilbene components of the roots of *polygonum cuspidatum* sieb. et zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull* 30(5):1766-1770.
- Aumont V, Larronde F, Richard T, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Krisa S, Mérillon JM (2004) Production of highly ¹³C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *J Biotechnol* 109(3):287-294.
- Beerling DJ, Bailey JP, Conolly AP (1994) Biological flora of the british isles - *fallopia japonica* (hoult.) ronse decraene (reynoutria japonica houtt.; *polygonum cuspidatum* sieb. & zucc.). *J Ecol* 82(4):959-979.
- Bru MR, Pedreno GMLDE (2006) Method for the production of resveratrol in cell cultures. US 2006/0205049 A1.
- Chen J, Hall DE, Murata J, De Luca V (2006) L-Alanine induces programmed cell death in *V. labrusca* cell suspension cultures. *Plant Sci* 171:734-744.
- Chevassus-au-Louis N (2000) La paradoxale saga du taxol. *La Recherche* 333.
- Chu X, Sun A, Liu R (2005) Preparative isolation and purification of five compounds from the chinese medicinal herb *polygonum cuspidatum* sieb. et zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1097(1-2):33-39.
- Davis TME, Karunajeewa HA, Ilett KF (2005) Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. *Med J Aust* 182(4):181-185.
- Decendit A, Mérillon JM (1996) Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 15:762-765.
- Donnez D, Jeandet P, Clément C, Courot E (2009) Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol* 27(12):706-713.
- Donnez D, Kim KH, Antoine S, Conreux A, De Luca V, Jeandet P, Clément C, Courot E (2011) Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2L stirred bioreactor. *Process Biochem* 46(5):1056-1062.
- Ferri M, Dipalo SCF, Bagni N, Tassoni A (2011) Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. *Food Chem* 124(4):1473-1479.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50(1):151-158.

- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nat* 425:191-196.
- Jeandet P, Bessis R, Maume BF, Meunier P, Peyron D, Trollat P (1995a) Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *J Agric Food Chem* 43(2):316-319.
- Jeandet P, Bessis R, Sbaghi M, Meunier P, Trollat P (1995b) Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am J Enol Vitic* 46:1-4.
- Kopp P (1998) Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'french paradox'? *Eur J Endocrinol* 138(6):619-620.
- Krisa S, Larronde F, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Merillon JM. (1999) Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Methyl jasmonate induction and ¹³C biolabeling. *J Nat Prod* 62(12):1688-1690.
- Larronde F, Krisa S, Decendit A, Chèze C, Deffieux G, Mèrillon JM (1998) Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep* 17:946-950.
- Lijavetzky D, Almagro L, Belchi-Navarro S, Martinez-Zapater JM, Bru R, Pedreno MA (2008) Synergistic effect of methyl jasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res Notes* 1:132.
- Monod J (1949) The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* 3:371-394.
- Morales M, Bru R, Garcia-Carmona F, Ros Barcelo A, Pedreno MA (1998) Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53(3):179-187.
- Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Science Eng* 2:29-48.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev* 1:69-79.
- Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A (1963) Chemical constituents of *Polygonaceous* plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon. (*Polygonum cuspidatum* SIEB et ZUCC). *Yakugaku Zasshi* 83:988-990.
- Pilloy J (2006) La lutte contre le paludisme : le marché de l'artémisinine et des dérivés. *Med Trop* 66:554-557.

Rayne S, Karacabey E, Mazza G (2008) Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and transviniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Ind Crop Prod* 27(3):335-340.

Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339:1523-1526.

Repka V, Fischerova I, Silharova K (2004) Methyl jasmonate is a potent elicitor of a multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biol Plant* 48:273-283.

Stervbo U, Vang O, Bonnesen C (2007) A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem* 101(2):449-457.

Swift HF (1920) Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. *J Exp Med* 69-75.

Takaoka MJ (1940) Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J Fac Sci Hokkaido Imp Univ* 3:1-16.

Tassoni A, Fornalè S, Franceschetti M, Musiani F, Michael AJ, Perry B, Bagni N (2005) Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol* 166:895-905.

Tian T, Sun Q, Shen J, Zhang T, Gao P, Sun Q (2008) Microbial transformation of polydatin and emodin-8- β -d-glucoside of *Polygonum cuspidatum* sieb. et zucc into resveratrol and emodin respectively by *Rhizopus microsporus*. *World J Microbiol Biotechnol* 24(6):861-866.

Tukey HB (1966) The story of the Concord grape. *Fruit Var Hort Digest* 20:54-55.

Vitrac X, Krisa S, Decendit A, Vercauteren J, Nühlich A, Monti JP, Deffieux G, Mérillon JM (2002) Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *J Biotechnol* 95:49-56.

Waterhouse AL, Lamuela-Raventos RM (1994) The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochem* 37(2):571-573.

Wood JG, Regina B, Lavu S, Hewitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair DA (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nat* 430(7000):686-689.

Wu S, Chappell J (2008) Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Curr Opin Biotechnol* 19(2):145-152.

Zhao RZ, Liu S, Zhou LL (2005) Rapid quantitative HPTLC analysis, on one plate, of emodin, resveratrol, and polydatin in the Chinese herb *Polygonum cuspidatum*. *Chromatogr* 61(5-6):311-314.

Partie 5 : Discussion générale

L'étude du comportement de la souche Concord en bioréacteur a permis de poser des bases pour mieux définir un éventuel procédé de bioproduction. Nous avons montré que la cinétique de synthèse du resvératrol se prête très bien à un premier travail de modélisation. La principale limite est, en revanche, la trop faible quantité de resvératrol produite lors des trois essais décrits. Mais il faut préciser que le procédé est loin d'être optimisé et que de nombreuses interrogations attendent encore une réponse. Ainsi, faut-il prolonger la phase de croissance précédant l'élicitation pour maximiser la biomasse productrice ou au contraire éliciter au plus tôt ? Comment ajuster la concentration de l'éliciteur ? Peut-on prévoir précisément le moment où la concentration en resvératrol sera maximale ? Quelle proportion réelle de resvératrol reste piégée dans les cellules ? Faut-il provoquer la lyse de ces dernières pour libérer davantage de resvératrol ? Quel est le mécanisme d'excrétion du resvératrol ? Est-il passif, actif ou les deux à la fois ? Peut-on jouer sur ce mécanisme pour améliorer la production ? Plus en amont, quel est le lien entre les modèles que nous avons développés et les mécanismes de synthèse du resvératrol, notamment la synthèse et l'activation des enzymes ?

Afin de structurer la recherche des réponses à ces questions, il est nécessaire de schématiser le système constitué par la suspension cellulaire soumise à l'élicitation. Ceci peut se faire par un bilan de toutes les espèces en présence, celles qui sont introduites dans le système et celles qui sont produites et excrétées par lui (Figure 47).

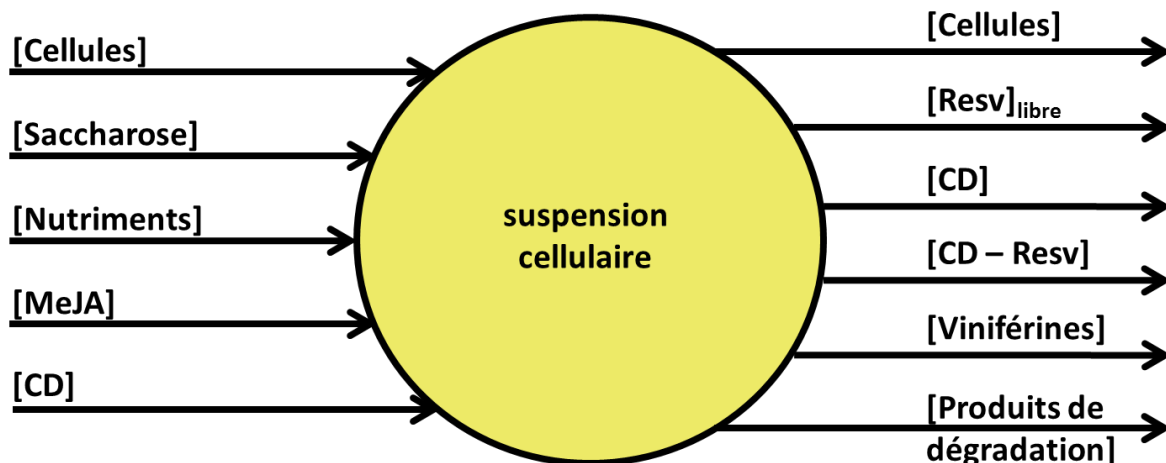


Figure 47 : Bilan sur les espèces en présence

[resv]_{libre} et [CD – resv] correspondent aux deux formes du resvératrol lié ou non à la méthyl- β -cyclodextrine. Les viniférines peuvent aussi bien être l' ϵ -viniférine, la δ -viniférine, le palidol, la vitisine B et au moins deux autres dimères en cours d'identification. Les produits de dégradation sont issus de l'oxydation et/ou de la métabolisation du resvératrol en d'autres dérivés que les viniférines.

A partir de ce bilan, on peut écrire un schéma réactionnel rassemblant les principales transformations chimiques qui peuvent avoir lieu :

Croissance cellulaire : $\text{Cellule} + \sum n_i \text{Nutriment}_i \rightarrow 2 \text{ Cellules}$

Elicitation : $\text{Cellule} + \text{MeJA} \rightarrow \text{Cellule} + \text{MeJA} + \text{Resvératrol}$

Elicitation : $\text{Cellule} + \text{CD} \rightarrow \text{Cellule} + \text{CD} + \text{Resvératrol}$

Encapsulation : $\text{Resvératrol} + \text{CD} \leftrightarrow \text{Resvératrol-CD}$

Dimérisation : $2 \text{ Resvératrol} \leftrightarrow \epsilon\text{-viniférine}$

Dimérisation : $2 \text{ Resvératrol} \leftrightarrow \delta\text{-viniférine}$

Méthylation : $\text{Resvératrol} + 2 \text{ CH}_3^* \leftrightarrow \text{Ptérostilbène}$

Glycosylation : $\text{Resvératrol} + \text{Glucose} \leftrightarrow \text{Picéide} + \text{H}_2\text{O}$

Dégradation : $\text{Resvératrol} \leftrightarrow \text{Produit de dégradation}$

Mort cellulaire : $\text{Cellule}_{\text{vivante}} + \text{Toxique} \rightarrow \text{Cellule}_{\text{morte}} + \text{Toxique}$

Nous allons ici examiner certaines de ces équations afin de voir quelles sont les hypothèses les plus probables.

I. Croissance cellulaire

La première équation fait référence à la croissance cellulaire :

$\text{Cellule} + \sum n_i \text{Nutriment}_i \rightarrow 2 \text{ Cellules}$

L'expression la plus générale de la vitesse de réaction en batch est la suivante :

$$v_1 = \frac{d[\text{cell}]}{dt} = \mu(T, [\text{Nutriment}]_i) \cdot [\text{cell}]$$

où T est la température d'incubation. Pour une température d'incubation constante (c'est le cas) et si on suppose la composition du milieu maintenue constante par un repiquage suffisamment régulier des suspensions, on a :

$$\frac{d[\text{cell}]}{dt} = \mu \cdot [\text{cell}] \text{ avec } \mu \text{ constant}$$

$$d'o\grave{u} [cell] = [cell]_0 \cdot \exp(\mu \cdot t)$$

On retrouve la célèbre loi de Monod pour la croissance microbienne. Cette loi se vérifie dans nos mesures, en fiole et en bioréacteur, dans la première partie de la croissance. En revanche, le modèle doit être affiné lorsque l'un au moins des nutriments commence à s'épuiser. La question qui se pose alors est celle de la nature du nutriment limitant. L'observation des courbes de croissance des trois expériences en bioréacteur ne permet pas de trancher car l'éllicitation est réalisée alors que la croissance est encore en phase exponentielle (333 h pour les expériences 1 et 3 et 358 h pour l'expérience 2). Ainsi, avant l'éllicitation, aucun nutriment n'est limitant, tandis qu'après l'éllicitation, les cellules ne croissent quasiment plus ; une modélisation différente est nécessaire. Au contraire, la cinétique de croissance en fiole a permis d'atteindre la phase stationnaire, pour laquelle la valeur de la biomasse est d'ailleurs très nettement supérieure à celle obtenue en bioréacteur (masse filtrée de 428 g/L en fiole comparativement à 138 g/L au maximum en bioréacteur à l'éllicitation). Ceci signifie qu'au moment de l'éllicitation en bioréacteur, la culture est encore loin de la phase stationnaire.

La figure 48 montre la comparaison des profils de croissance pour les trois essais en bioréacteur et pour l'essai en fioles. On a reporté DW/DW_0 en fonction du temps, rapport des masses sèches à l'instant t et l'instant 0. On voit que la reproductibilité est très bonne pour la phase de croissance exponentielle, sauf pour le deuxième essai en bioréacteur, pour lequel la croissance a été un peu plus lente. Pour l'expérience en fioles, on constate qu'on atteint la phase stationnaire plus tôt qu'en bioréacteur, mais ceci est dû au fait que la concentration en biomasse initiale est beaucoup plus élevée dans cette expérience, ce qui n'apparaît pas ici puisqu'on observe le rapport DW/DW_0 . Dans les essais en bioréacteur, aucun nutriment n'est susceptible d'être limitant en raison des ajouts de milieu frais (fed-batch).

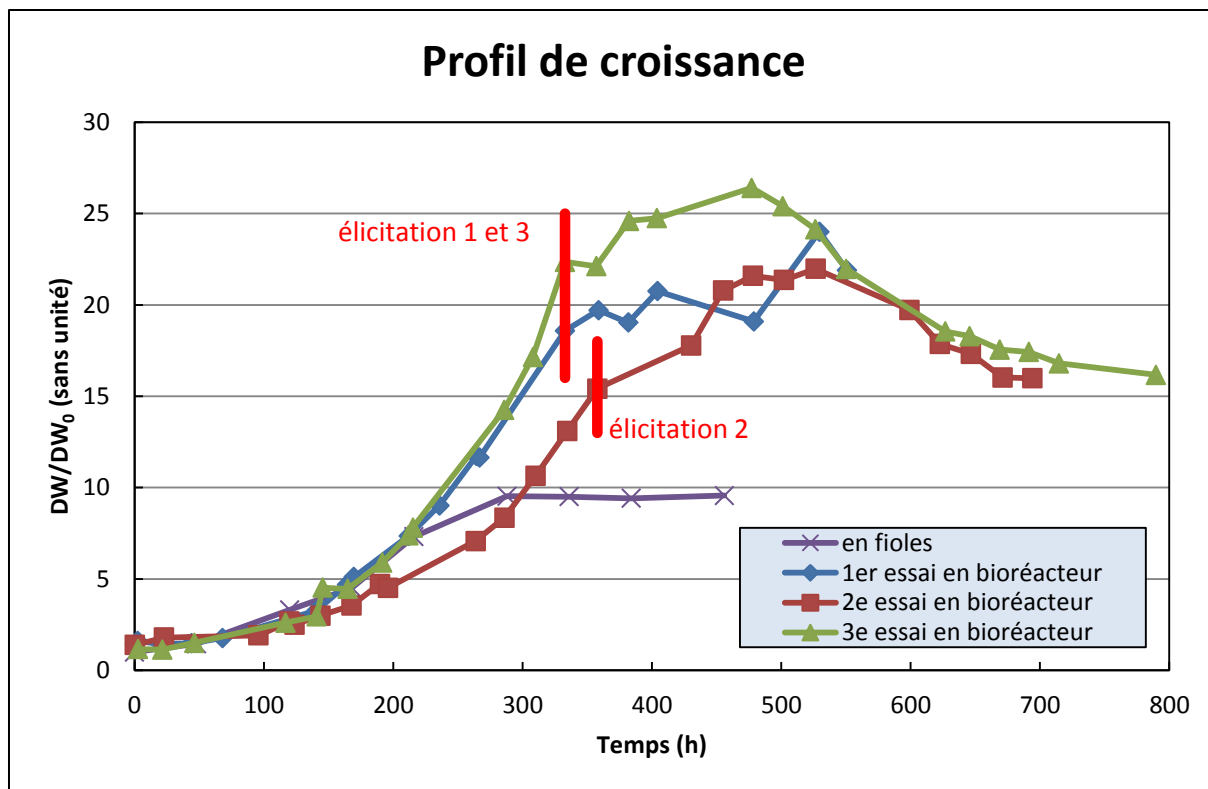


Figure 48 : Profils de croissance comparés pour les essais en bioréacteur et en fioles

L'observation de la consommation des sucres en bioréacteur permet d'apporter des éléments de réponse quant à la nature du nutriment limitant. La figure 49 représente la masse totale de sucre consommée au cours du temps (somme pour les trois sucres : saccharose, glucose et fructose), pour chaque culture. Dans les essais en bioréacteur, compte tenu de la variation du volume total au cours des essais, il n'est pas pertinent de considérer la concentration volumique ; la masse quant à elle permet de s'affranchir de cela. La masse de sucre consommée semble suivre une évolution exponentielle au début, puis on observe un ralentissement de la consommation après l'élicitation (333 h pour les 1^{ère} et 3^e expériences, 358 h pour la 2^e expérience). La consommation est inférieure pour la 1^{ère} expérience car la biomasse à l'inoculation était inférieure pour cet essai, comparativement aux deux autres ; une phase de latence prolongée a entraîné un retard de croissance sur toute l'expérience. Ainsi le profil de consommation des sucres est très similaire au profil de croissance de la biomasse. On peut donc supposer que la quantité de biomasse produite (en DW) est proportionnelle à la quantité de sucres consommés. En représentant la biomasse totale (en g DW) en fonction de la masse totale de sucres consommés, on obtient le graphique de la figure 50. On voit que la première partie des trois courbes est effectivement linéaire, avec une discontinuité autour de DW = 7g pour la troisième expérience, qui correspond à une phase de latence après le premier ajout de milieu. En réalisant une régression linéaire pour chacune des parties qui s'y prêtent, on obtient les différents rendements de production de biomasse définis par :

$$\alpha = \frac{\text{masse de cellules produite}}{\text{masse de sucres consommée}}$$

$$\alpha = \frac{DW - DW_0}{S_0 - S}$$

où DW et S sont les masses de biomasse sèche et de sucre à l'instant final et les mêmes notations avec l'indice 0, les masses à l'instant initial.

Le tableau 10 rassemble les valeurs obtenues. La linéarité est très bonne : $R^2 > 0,99$ sur 7 à 10 points, sauf pour la première phase de croissance de la troisième culture où $R^2 = 0,936$ pour seulement 4 points. La valeur moyenne du rendement est $\alpha = 36 \%$ avec un écart-type relatif de 23 %. La linéarité s'interrompt au-delà de 310-330 h, moment où est introduit l'éliciteur. Il est normal qu'au-delà la consommation de sucre soit différente car elle ne correspond plus à une phase de croissance des cellules.

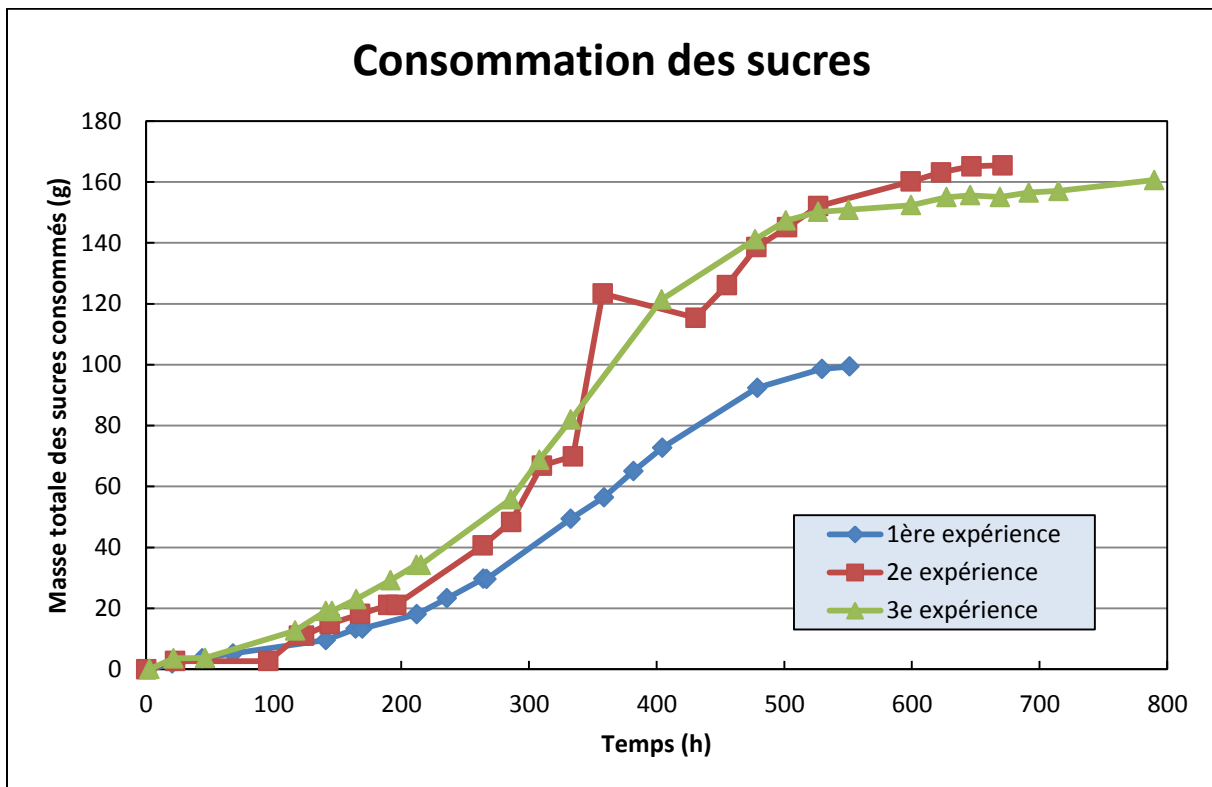


Figure 49 : Consommation des sucres en fonction du temps

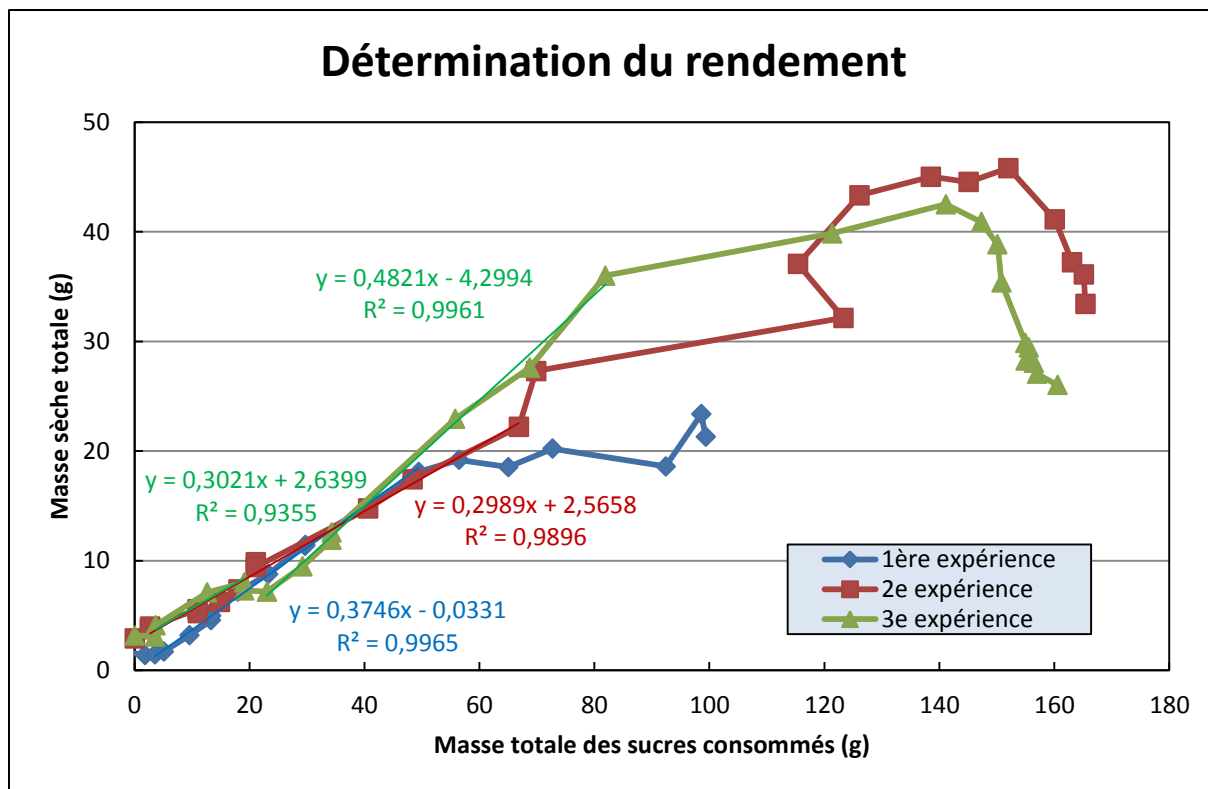


Figure 50 : Détermination du rendement

Tableau 10 : Rendement de production de la masse sèche en bioréacteur (sucres totaux)

Batch	Plage de détermination (h)	α (g DW/g sucres)	Coefficient de corrélation (R^2)	Nb. de points utilisés pour la détermination
1 ^{ère}	44 – 333	0,37	0.997	10
2 ^e	96 – 310	0,30	0.990	10
3 ^e	22 – 141	0,30	0.936	4
3 ^e	165 – 333	0,48	0.996	7
Moyenne	-	0,36	-	-
RSD	-	23%	-	-

Pour faire le calcul de la quantité de sucres consommés jusqu'à la phase stationnaire dans les expériences en fiole, on peut utiliser le rendement que l'on vient de calculer $\alpha = 0,36$.

Dans les expériences en fiole, le volume reste constant tout au long de la culture, on peut donc faire les bilans matière en concentrations :

$$[\text{sucres}]_{\text{consommé}} = \frac{[\text{cell}]_{\text{stationnaire}} - [\text{cell}]_0}{\alpha} = \frac{[\text{DW}]_{\text{stationnaire}} - [\text{DW}]_0}{\alpha}$$

La concentration des cellules sera exprimée en matière sèche par L, notée [DW]. Nous disposons des valeurs des concentrations de masse filtrée [MF] ; la valeur de la concentration de matière sèche est obtenue en divisant [MF] par le coefficient m qui a été déterminé en bioréacteur ; nous supposons que ce coefficient est le même dans les deux types d'expériences.

$$\text{Il vient donc : } [\text{sucres}]_{\text{consommé}} = m * \frac{[\text{MF}]_{\text{stationnaire}} - [\text{MF}]_0}{\alpha} = 0,0534 * \frac{428 - 45}{0,36} = 56,8 \text{ g/L}$$

On trouve une valeur très largement supérieure à celle de la concentration initiale de sucre qui est de 30 g/L. On peut donc raisonnablement supposer que le sucre est totalement épuisé au moment de la phase stationnaire, ce qui ferait de lui le nutriment limitant. L'écart entre la concentration théorique calculée et la concentration initiale peut s'expliquer de deux façons : le rendement α et/ou le rapport m sont différents en fioles de ceux déterminés en bioréacteur.

Estimation de α_{fiole}

On suppose ici que m est le même qu'en bioréacteur ; $m = 0,0534$

Si le sucre est consommé en totalité comme nous l'avons supposé (limitant), on peut par son bilan calculer le nouveau rendement : $\alpha_{\text{fiole}} = m * \frac{[\text{MF}]_{\text{stationnaire}} - [\text{MF}]_0}{[\text{sucres}]_{\text{consommé}}} = 0,68 \text{ g DW par g sucre consommé}$, soit à peu près deux fois plus qu'en bioréacteur.

Une telle différence dans le rendement entre l'expérience en fioles et les essais en bioréacteur semble irréaliste. En effet, il s'agit du même mécanisme de respiration ; le seul paramètre pouvant entrer en ligne de compte serait l'efficacité de l'aération. Or le bullage de l'air est plus important en bioréacteur qu'en fioles. Si ce paramètre jouait, on devrait avoir un rendement meilleur en bioréacteur, ce qui n'est pas le cas. On peut donc raisonnablement en conclure que le rendement varie peu selon les dispositifs.

Estimation du rapport m en fiole

Ici on suppose que le rendement est le même dans les deux types d'essais.

$$\text{Il vient } m_{\text{fiole}} = \alpha * \frac{[\text{sucres}]_{\text{consommé}}}{[\text{MF}]_{\text{stationnaire}} - [\text{MF}]_0} = 0,028, \text{ soit à peu près la moitié que dans le bioréacteur.}$$

ce qui pourrait s'expliquer par un état différent de la biomasse dans les deux cultures, donnant un rapport MF/DW différent. Ceci est plausible puisque dans un cas (bioréacteur) on ne considère que la biomasse en phase exponentielle, alors qu'en fiole la biomasse finale est celle obtenue en phase stationnaire. En toute rigueur on pourrait supposer que le rapport m au temps zéro est le même pour les deux types d'essais alors qu'il est différent à la fin de la période considérée : exponentielle pour le bioréacteur et stationnaire pour les fioles.

Dans la suite des calculs, on adoptera un rapport $m = 0,028$ pour les expériences en fioles. Puisque le nutriment limitant en fiole semble être le sucre, le taux de croissance peut prendre la forme suivante, d'après la loi de Monod :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

où $[S]$ est la concentration totale de sucres et K_s est la constante de demi-saturation, c'est-à-dire la concentration de sucre pour laquelle le taux de croissance tombe à la moitié de sa valeur maximale. L'évolution de la concentration en sucre au cours de sa consommation par les cellules peut être exprimée en utilisant le rendement α :

$$[S]_{\text{consommé}} = [S]_0 - [S] = \frac{[cell] - [cell]_0}{\alpha} \quad (1)$$

Rassemblons les différentes relations que nous avons établies :

$$\frac{d[cell]}{dt} = \mu \cdot [cell]$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

$$[S]_0 - [S] = \frac{[cell] - [cell]_0}{\alpha}$$

On trouve ainsi une relation entre $\frac{d[cell]}{dt}$ et $[cell]$.

On peut avoir une idée de l'allure de la solution de l'équation différentielle (concentration en biomasse au cours du temps), au début et à la fin de la cinétique. Au début, la concentration en sucre est élevée. Si elle est très supérieure à K_s , alors $\mu \approx \mu_{\max}$ et on retrouve une croissance exponentielle. A la fin de la cinétique de croissance exponentielle, la concentration en sucre devient très faible, donc μ aussi et la concentration de biomasse devient constante. Ces trois relations permettent d'exprimer l'équation différentielle. Pour plus de lisibilité, simplifions l'écriture en posant :

$$X = [cell]$$

$$S = [sucre]$$

$$X_0 = [cell]_0$$

$$S_0 = [sucre]_0$$

Les trois relations deviennent :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_S + [S]}$$

$$S = S_0 - \frac{X - X_0}{\alpha}$$

ce qui donne l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot X \cdot \frac{S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha}}{K_S + S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha}}$$

Celle-ci s'intègre de la façon suivante :

$$\cdot \left[\frac{K_S + S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha}}{\left(S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha} \right) X} \right] dX = \mu_{\max} \cdot dt$$

Le membre de gauche est une fraction rationnelle que l'on peut décomposer en éléments simples :

$$\frac{K_S + S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha}}{\left(S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha} \right) X} = \frac{A}{X} + \frac{B}{\left(S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha} \right)} \quad \text{avec A et B constants}$$

On trouve

$$A = \frac{K_S + S_0 + \frac{X_0}{\alpha}}{\left(S_0 + \frac{X_0}{\alpha} \right)} \quad \text{et} \quad B = \frac{K_S}{(\alpha S_0 + X_0)}$$

L'équation différentielle devient donc:

$$\left[\frac{A}{X} + \frac{B}{\left(S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha} \right)} \right] dX = \mu_{\max} \cdot dt$$

ce qui s'intègre entre le temps 0 et le temps t pour donner :

$$A \cdot \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) - \alpha \cdot B \cdot \ln\left(\frac{S_0 + \frac{X_0}{\alpha} - \frac{X}{\alpha}}{S_0}\right) = \mu_{\max} \cdot t$$

En remplaçant A et B par leurs valeurs, on obtient une expression qui ne permet pas de calculer X à partir de t , mais la réciproque :

$$t = 1/\mu_{\max} \cdot [K_s/(S_0+X_0/\alpha) \cdot \ln(S_0 \cdot X/(X_0 \cdot (S_0+X_0/\alpha-X/\alpha))) + \ln(X/X_0)]$$

En fixant la valeur des différents paramètres, on peut ainsi calculer t en fonction de X et tracer la courbe théorique de croissance. La représentation semi-logarithmique de la cinétique de croissance expérimentale représentée sur la figure 51 montre que la phase exponentielle se déroule entre le temps 0 et 220 h environ. Ceci signifie que dans cette partie, le sucre est en excès ($S \gg K_s$) et aucun nutriment n'est limitant. Le taux de croissance reste constant, égal à $\mu_{\max}$ et la croissance est de la forme : $MF = MF_0 \exp(\mu_{\max} \cdot t)$ où MF_0 et MF sont les concentrations en masse filtrée aux instants 0 et t .

On a trouvé :

$MF_0 = 44 \text{ g/L}$ et $\mu_{\max} = 0,0093 \text{ h}^{-1}$. On peut alors utiliser ces valeurs pour calculer t en fonction de X.

Résumons l'ensemble des paramètres connus :

$$S_0 = 30 \text{ g/L}$$

$$\alpha = 13 \text{ g FW/g sucres}$$

$$X_0 = 44 \text{ g/L}$$

$$\mu_{\max} = 0,0093 \text{ h}^{-1}$$

Seul K_s reste inconnu. En choisissant différents ordres de grandeur pour ce dernier paramètre, on obtient la série de courbes paramétrées, représentée sur la figure 52. En examinant l'ajustement de ces courbes par rapport aux valeurs expérimentales, on en déduit que K_s devrait être d'un ordre inférieur à 1 g/L , mais on ne peut pas savoir à quel point il est petit car le cas limite où ce paramètre tend vers 0 correspond à la succession immédiate entre une phase purement exponentielle et une phase purement stationnaire. Ceci est tout à fait envisageable dans notre cas puisque le graphique semi-logarithmique (figure 51) se prête tout à fait à une modélisation en deux droites, l'une, inclinée, correspondant à la phase exponentielle et l'autre, horizontale, correspondant à la phase stationnaire.

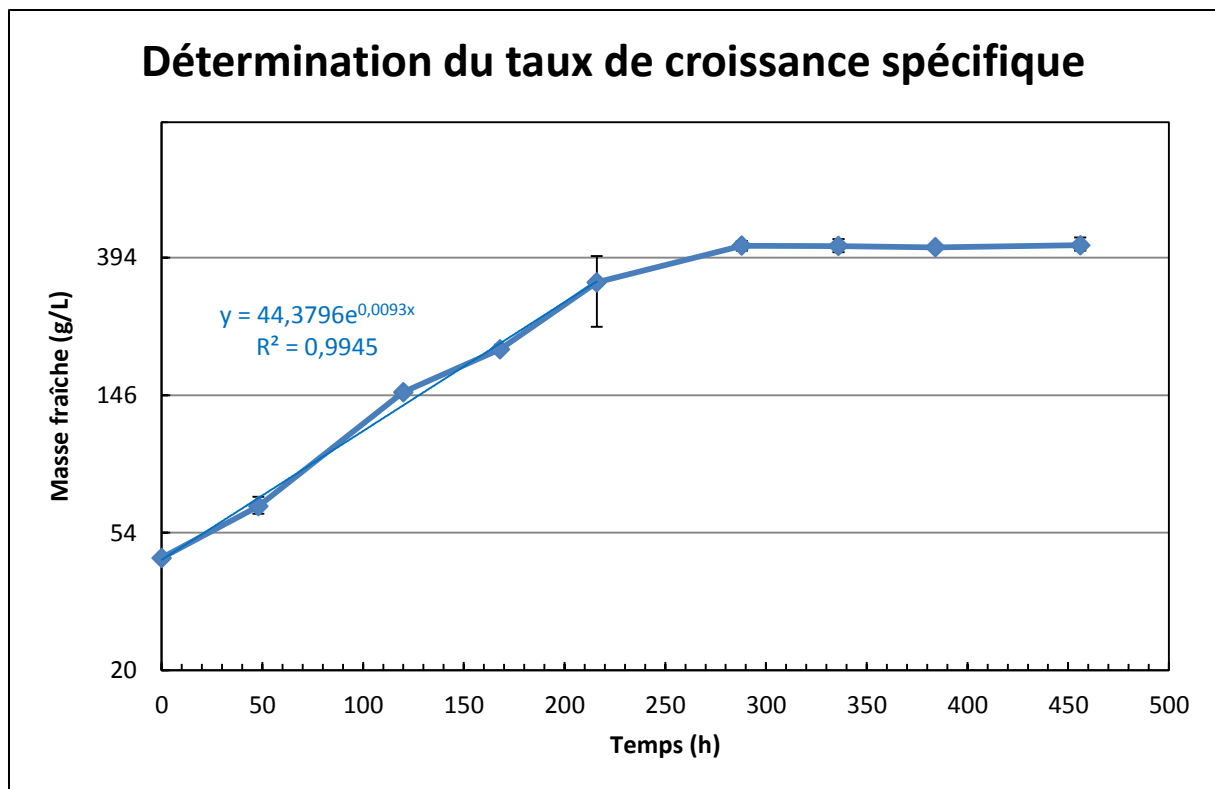


Figure 51 : Graphique semi-logarithmique de croissance en fiole de la souche Concord

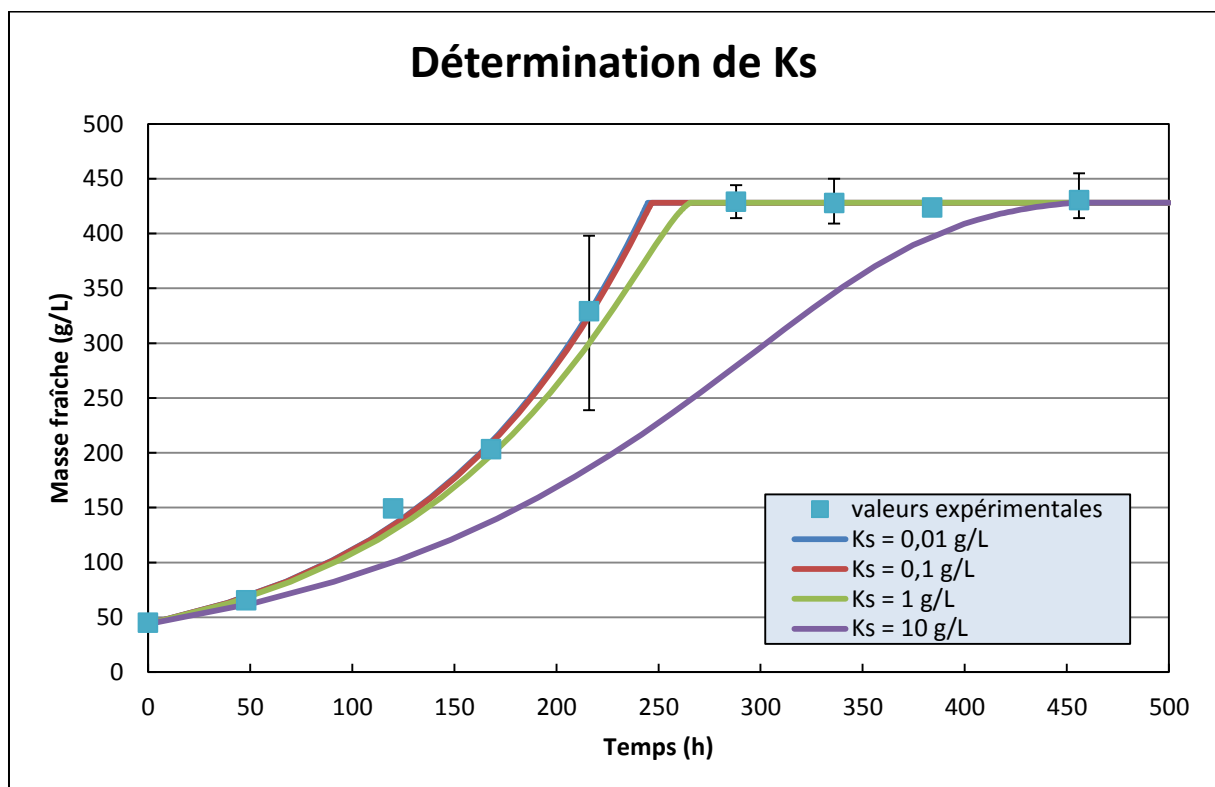


Figure 52 : Allure théorique de la croissance cellulaire selon la valeur de K_s

Le problème tient ici, à ce qu'aucune mesure n'est effectuée dans la phase de transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire, seule phase dans laquelle intervient significativement le paramètre K_s .

Pour essayer d'exploiter au mieux nos données expérimentales, nous avons relâché la contrainte sur le paramètre $\mu_{\max}$. Dans ce cas, il faut effectuer une régression sur les inconnues K_s et $\mu_{\max}$, à l'aide des points expérimentaux.

Pour ce faire, reprenons l'expression précédemment établie :

$$K_s/(S_0+X_0/\alpha) \cdot \ln(S_0 \cdot X/(X_0 \cdot (S_0+X_0/\alpha-X/\alpha))) + \ln(X/X_0) = \mu_{\max} \cdot t$$

En la transformant on obtient:

$$\ln(X/X_0)/t = K_s \cdot \ln(S_0 \cdot X/(X_0 \cdot (S_0+X_0/\alpha-X/\alpha)))/(-t \cdot (S_0+X_0/\alpha)) + \mu_{\max}$$

En posant :

$$x = \ln(S_0 \cdot X/(X_0 \cdot (S_0+X_0/\alpha-X/\alpha)))/(-t \cdot (S_0+X_0/\alpha))$$

$$y = \ln(X/X_0)/t$$

On a alors :

$$y = K_s \cdot x + \mu_{\max}$$

On obtient ainsi une relation affine entre deux grandeurs, x et y , indépendantes des inconnues K_s et $\mu_{\max}$. En portant y en fonction de x on devrait trouver une droite de pente K_s et d'ordonnée à l'origine $\mu_{\max}$. On obtient ainsi les résultats représentés sur la figure 53. Sur cette figure, seuls quatre points sont représentés. Le premier point de la cinétique n'apparaît pas car la valeur $t = 0$ interdit le calcul des coordonnées. Les quatre derniers points (du sixième au neuvième) n'apparaissent pas non plus, mais pour une autre raison. Le sixième point est déjà pleinement dans la phase stationnaire, puisque le suivant (septième) donne une biomasse légèrement inférieure. Or, dans la phase stationnaire, on a :

$X = X_{\max}$ et par définition de α , $S = 0$. Donc pour ces quatre derniers points x est infiniment grand.

On voit, sur la figure 53, que les seuls points qui restent donneraient une droite proche de l'horizontale (donc avec un K_s très faible), confirmant ce que nous avons supposé précédemment, à savoir que ces points appartiennent à la phase exponentielle.

En phase exponentielle, y est donc constant. La relation $y = K_s \cdot x + \mu_{\max}$ donne $x = 0$. Théoriquement, la trajectoire de la figure 53 devrait donc être un segment de droite allant du point $(-\mu_{\max}/K_s ; 0)$ au point $(0 ; \mu_{\max})$. Les quatre points devraient être confondus sur l'axe des ordonnées et leur ordonnée doit donner $\mu_{\max}$. Le paramètre $\mu_{\max}$ peut être calculé comme la moyenne des valeurs de y pour les quatre points de la phase exponentielle. On obtient

0,0090 h⁻¹, ce qui est très proche de la valeur trouvée par régression exponentielle (0,0093 h⁻¹).

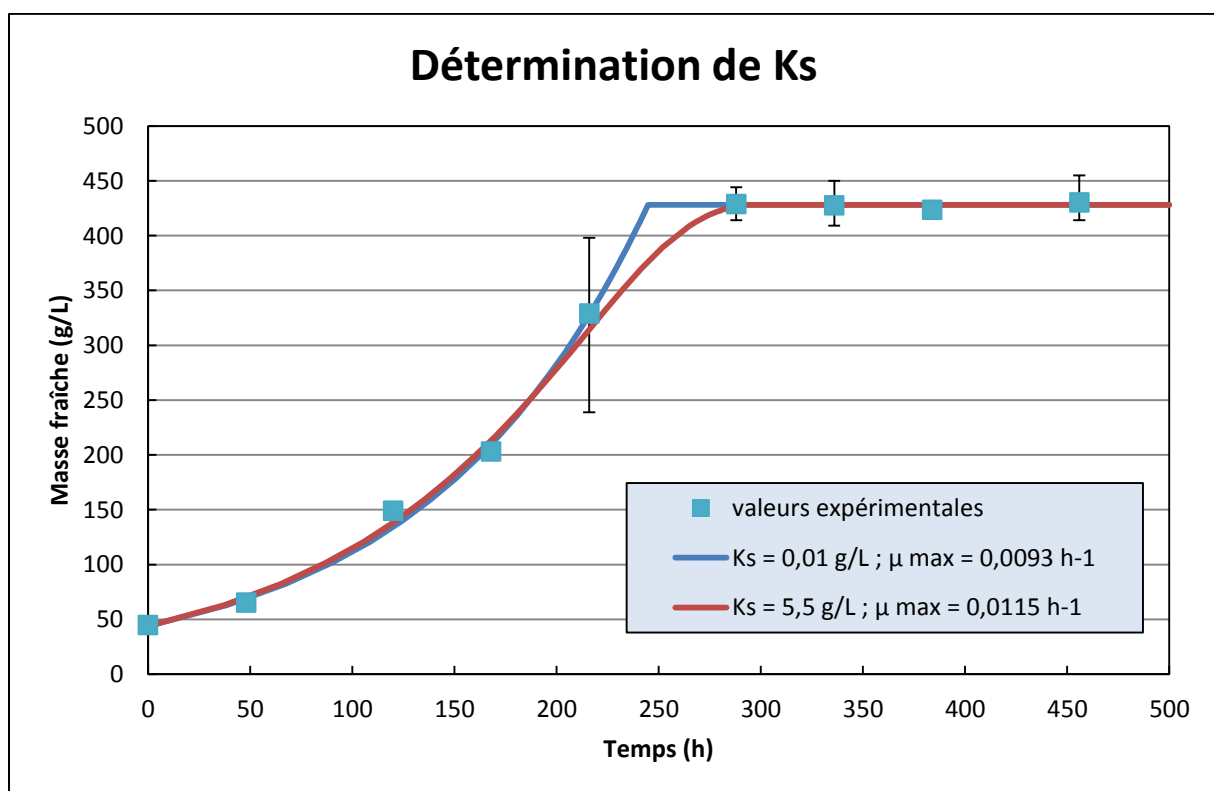
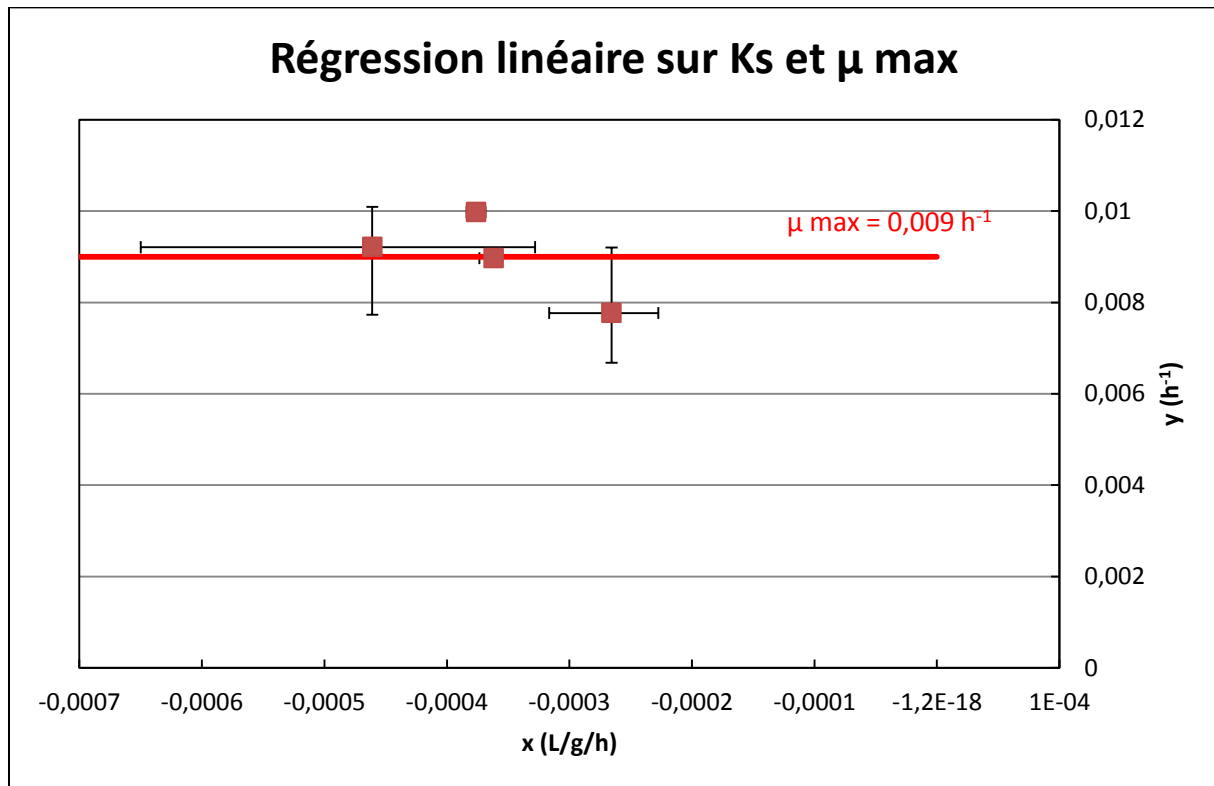


Figure 53 : Détermination de K_s et $\mu_{\max}$

Grâce à la relation (1) donnant le bilan en sucre et à la valeur de α , on peut calculer les valeurs de la concentration en sucre restant pour les différents points de la cinétique. D'autre part, on connaît aussi les valeurs de μ sur la phase exponentielle ($\mu = \mu_{\max}$) et sur la phase stationnaire ($\mu = 0$). Les valeurs de ces deux paramètres (S et μ) sont représentées sur la figure 54 (points bleus). En plus de ces points, sont tracées quatre courbes figurant la relation théorique entre μ et $[sucre]$, pour différentes valeurs de K_s . En cherchant la courbe qui s'ajuste le mieux aux valeurs expérimentales, on peut en conclure que K_s est certainement inférieur à 0,1 g/L.

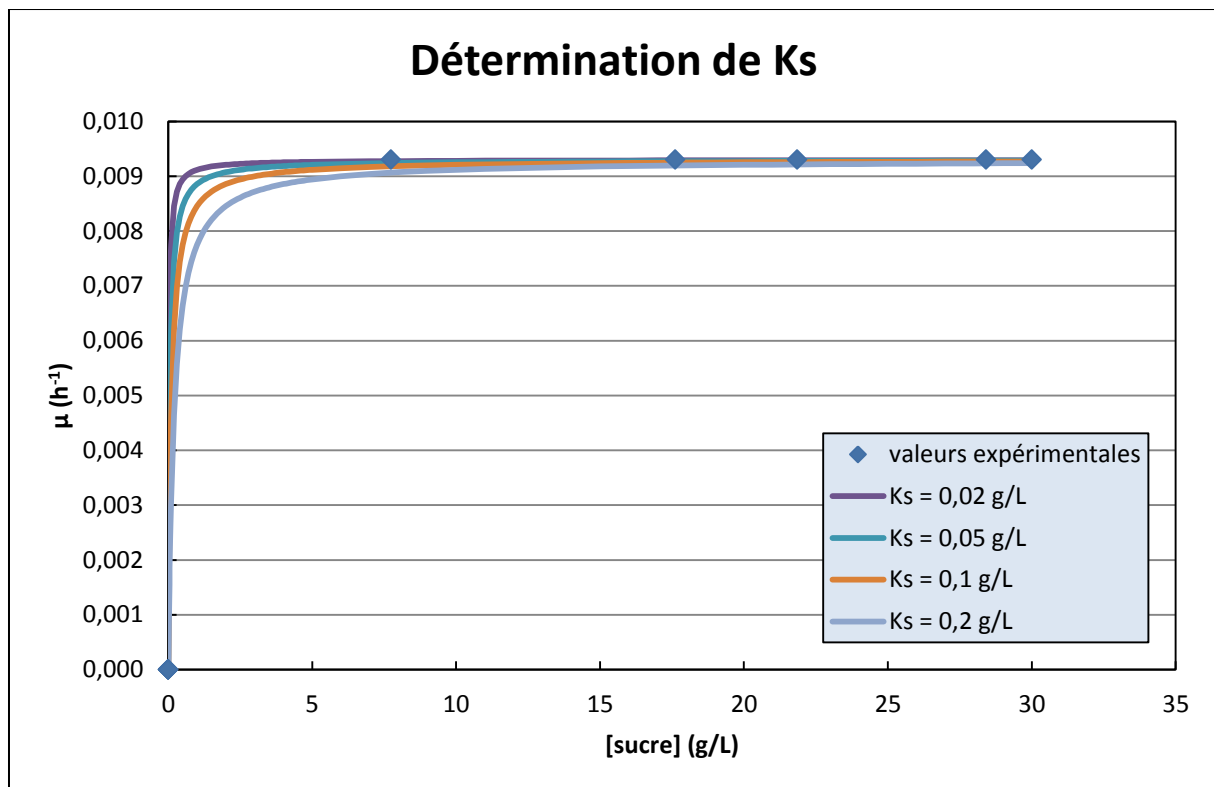


Figure 54 : Différents cas de relation entre μ et $[sucre]_0$ selon la valeur de K_s

Nous avons vu que le sucre est très probablement le nutriment limitant. Afin de confirmer cette hypothèse, examinons le cas des autres nutriments.

Azote :

La concentration adéquate de l'azote chez les plantes vasculaires est généralement de l'ordre de 1,5 % de la masse sèche (Raven *et al.*, 2007). Notons-la $p_N = 1,5 \%$ DW. La quantité d'azote consommée (calculée en concentration) pour la croissance est donc :

$$[N]_{\text{consommé}} = p_N \cdot DW_{\text{produite}} = p_N \cdot m \cdot (MF_{\text{stationnaire}} - MF_0)$$

Soit en utilisant pour le rapport m , la valeur déterminée précédemment (0,028) :

$$[N]_{\text{consommé}} = 0,015 * 0,028 * (428 - 45) = 161 \text{ mg/L}$$

Par ailleurs, l'apport en azote dans le milieu Gamborg est :

$$[N]_{\text{milieu}} = \frac{[KNO_3]_{\text{milieu}} \cdot M_N}{M_{KNO_3}} + \frac{[(NH_4)_2SO_4]_{\text{milieu}} \cdot 2 M_N}{M_{(NH_4)_2SO_4}}$$

$$[N]_{\text{milieu}} = \frac{2500 * 14,0}{101,1} + \frac{134 * 2 * 14,0}{132,7} = 374 \text{ mg/L}$$

Ce calcul permet ainsi de montrer que l'azote n'est pas un nutriment limitant.

Phosphore :

Pour le phosphore, la concentration adéquate est de l'ordre de 0,2 % de la masse sèche (Raven *et al.*, 2007). La quantité de phosphore consommée est donc :

$$[P]_{\text{consommé}} = 21 \text{ mg/L}$$

L'apport dans le milieu Gamborg est :

$$[P]_{\text{milieu}} = \frac{[NaH_2PO_4]_{\text{milieu}} \cdot M_P}{M_{NaH_2PO_4}}$$

$$[P]_{\text{milieu}} = \frac{130 * 31,0}{119,7} = 34 \text{ mg/L}$$

Le phosphore n'est donc pas non plus un nutriment limitant.

Potassium :

La concentration adéquate du potassium est de l'ordre de 1 % de la masse sèche (Raven *et al.*, 2007). La quantité de potassium consommée est donc :

$$[K]_{\text{consommé}} = 107 \text{ mg/L}$$

L'apport dans le milieu Gamborg est :

$$[K]_{\text{milieu}} = \frac{[KNO_3]_{\text{milieu}} \cdot M_K}{M_{KNO_3}}$$

$$[K]_{\text{milieu}} = \frac{2500 * 39,1}{101,1} = 967 \text{ mg/L}$$

Le potassium est aussi en excès.

Ces calculs viennent étayer l'hypothèse que le nutriment limitant est le sucre.

II. Elicitation au méthyljasmonate (MeJA)

La deuxième équation de notre schéma réactionnel représente le phénomène d'élicitation par le MeJA :



L'hypothèse la plus simple, d'un point de vue cinétique, aurait été, là encore, une loi du premier ordre par rapport à la biomasse, ce qui donnerait :

$$v_2 = d[\text{Resvératrol}]/dt = k_2([\text{MeJA}]) \cdot [\text{cell}]$$

Or nous avons vu, dans l'étude en bioréacteur, que la biomasse ralentissait très fortement sa croissance après l'élicitation (effet inhibiteur du MeJA) pour devenir stationnaire, voire décliner. La cinétique de production du resvératrol montre clairement une vitesse croissante alors que la biomasse est déjà en déclin (Figure 55). Par ailleurs, l'étude en bioréacteur a montré que deux modèles (exponentiel et quadratique) pouvaient rendre compte de la production du resvératrol.

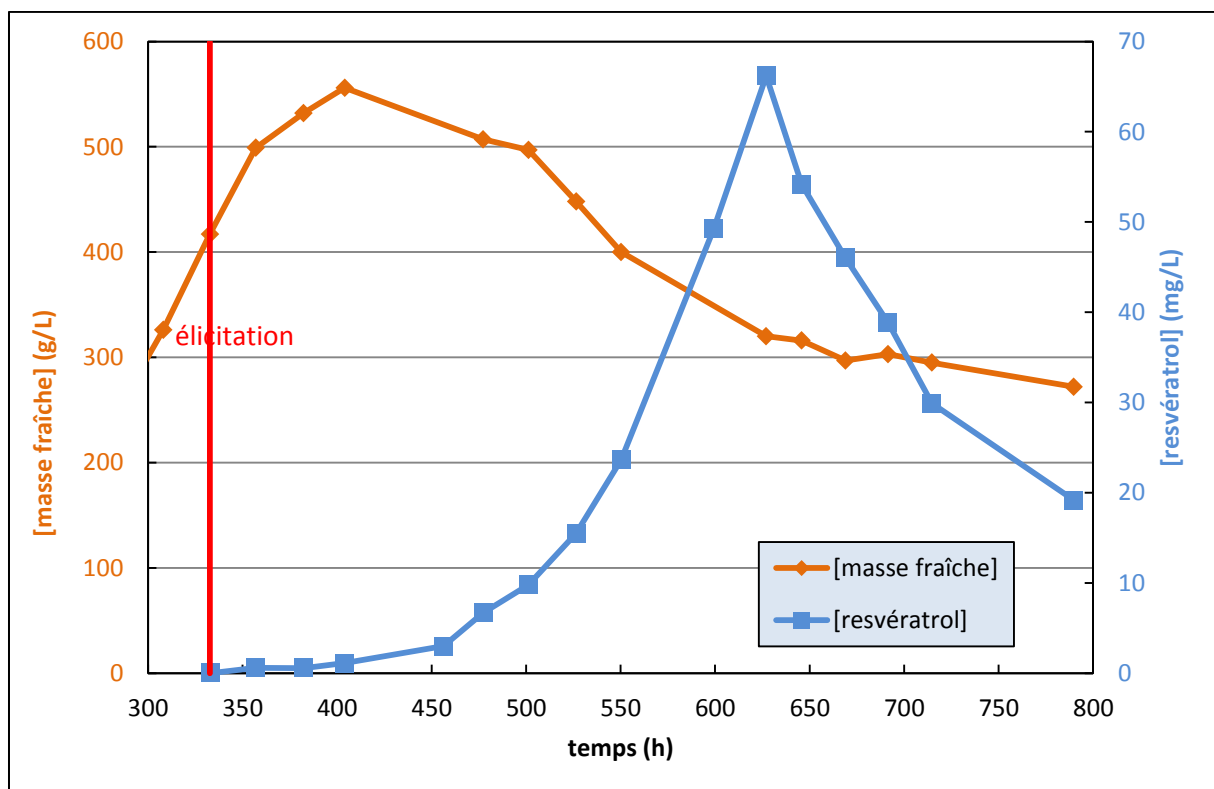


Figure 55 : Evolution de la biomasse et du resvératrol en fonction du temps après élicitation

Sur la figure 55, on peut observer au début, un ralentissement de la croissance cellulaire jusque environ 400 h. Celui-ci est dû à l'influence inhibitrice du MeJA, tandis que la concentration en resvératrol dans le milieu est inférieure à 1 mg/L, concentration à laquelle il n'est pas toxique pour les cellules. Puis la concentration du resvératrol augmente et on observe à ce moment un déclin de la biomasse. Dans une dernière phase, la concentration du resvératrol se met à chuter. Au pic de concentration, on mesure une valeur supérieure à la limite de solubilité du resvératrol citée par Morales *et al.*, 1998, à savoir 48,8 mg/L, ce qui pourrait indiquer une possible sursaturation avec une cinétique de précipitation plus lente que les cinétiques de production et de dégradation du resvératrol.

Oxydation du resvératrol :

Concernant le profil de production de resvératrol, un phénomène reste difficile à expliquer par les modèles élaborés lors de l'étude en bioréacteur : c'est la rupture sans transition entre une phase de production exponentielle ou quadratique et une phase de décroissance tout aussi rapide, phénomène déjà observé par Donnez *et al.* (2011) avec les cellules 41B cultivées en bioréacteur de 2L. Il semblerait que les mécanismes de métabolisation ou de dégradation du resvératrol s'accroissent au moment de cette rupture. L'observation de l'évolution conjointe du taux d'oxygène dissous dans le milieu semble confirmer cette hypothèse. La figure 56 montre les corrélations qui existent entre ces deux grandeurs, après l'éllicitation : dans un premier temps, l'oxygène s'accumule dans le milieu car le MeJA a inhibé la croissance cellulaire, faisant chuter la consommation d'oxygène par les cellules. Vers 170 h après l'éllicitation, le resvératrol commence à être excrété dans le milieu de culture ; à ce moment, le taux d'oxygène décroît, ce qui laisse supposer une consommation d'oxygène par une oxydation modérée du resvératrol. Puis vers 340 h, la concentration du resvératrol chute brusquement, tandis que la décroissance du taux d'oxygène s'accroît. C'est le moment de rupture où l'oxydation semble se faire tout à coup plus intense. Enfin, vers 450 h, quand la concentration du resvératrol a été réduite des deux tiers, l'oxygène s'accumule de nouveau. L'inconnue qui subsiste est la cause de l'accentuation des mécanismes d'oxydation. Serait-elle due à la synthèse de peroxydases par les cellules à ce moment ? Afin de modéliser ces mécanismes et leurs cinétiques, il serait intéressant d'étudier l'oxydation du resvératrol dissous dans du milieu Gamborg, en présence d'un bullage d'oxygène.

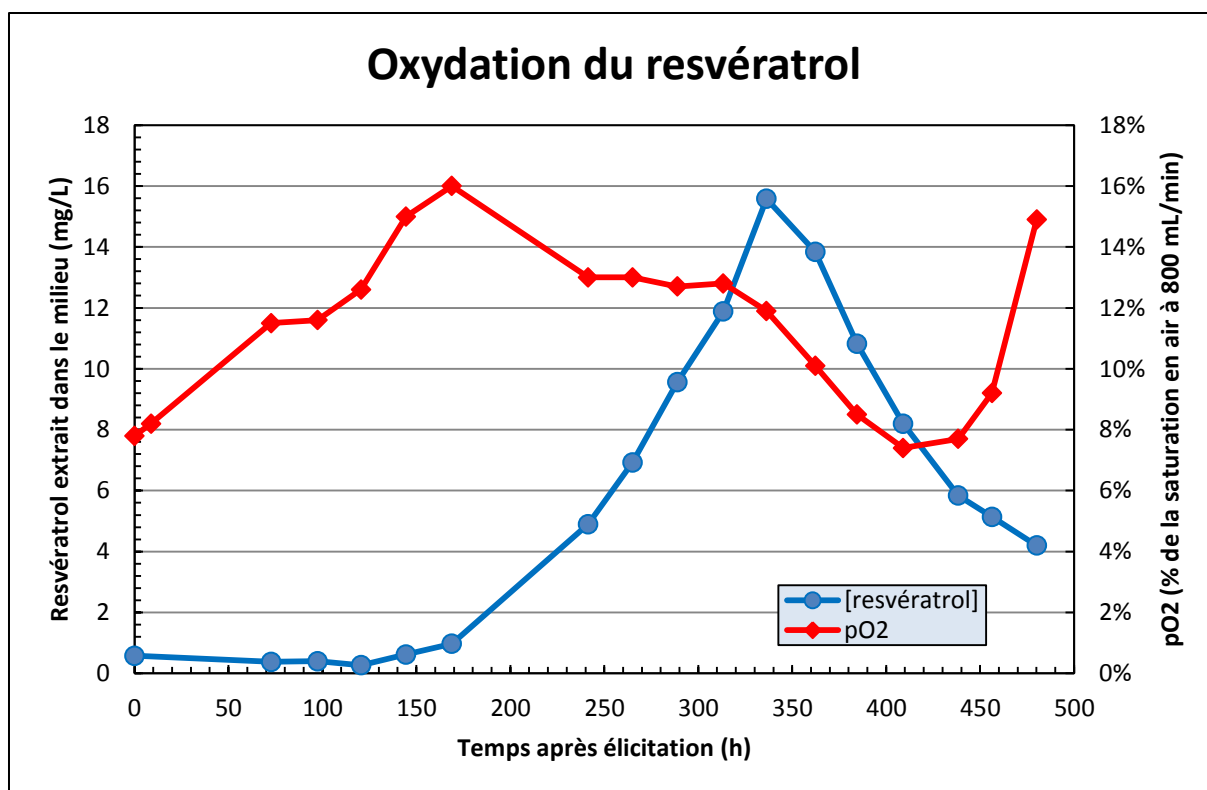


Figure 56 : Corrélations entre la variation du taux d'oxygène dissous et la concentration du resvératrol dans le milieu

Conclusions

Nous avons abordé ici deux points principaux : la modélisation de la croissance cellulaire, d'une part, et celle de la production du resvératrol suite à l'élicitation au méthyljasmonate, d'autre part.

Pour la croissance cellulaire, les études en bioréacteur avaient permis d'appliquer la loi de Monod sur toute la phase de croissance exponentielle avec une très bonne corrélation ($R^2 > 0,99$). Le calcul du taux de croissance spécifique moyen avait donné $\mu_{\text{bioréacteur}} = 0,0085 \text{ h}^{-1}$. A partir des résultats de ces études, nous avons pu déterminer ici le rendement de production de biomasse rapportée à la consommation des sucres. La valeur moyenne obtenue est $\alpha_{\text{bioréacteur}} = 0,36$ avec une bonne linéarité ($R^2 > 0,93$). L'utilisation de cette valeur de α pour étudier la cinétique de croissance en fiole a révélé une contradiction apparente. Cette contradiction a été levée par les considérations suivantes : les mesures de biomasse en bioréacteur sont exprimées en masse sèche, tandis que celles obtenues en fioles sont exprimées en masse filtrée. Le coefficient $m_{\text{bioréacteur}} = 0,0534$ utilisé pour la conversion entre masse sèche et masse filtrée pourrait ne pas être valable en fiole car, dans ce cas, la phase stationnaire est atteinte et les cellules pourraient être dans un état différent, donnant une autre valeur de m ($m_{\text{fiole}} = 0,028$). L'hypothèse la plus probable, retenue ici, est que le rapport α est le même en bioréacteur et en fiole, tandis que le rapport m varie suivant la phase de croissance (exponentielle ou stationnaire).

Partant de l'hypothèse que le nutriment limitant était le sucre (étayée par des calculs sur la consommation des principaux autres nutriments), nous avons cherché à affiner le modèle en déterminant la constante K_s de demi-saturation du sucre. Cette constante caractérise la concentration de sucre à laquelle la valeur du taux de croissance μ a chuté de moitié par rapport à sa valeur en phase exponentielle ($\mu_{\max}$). Ici, la valeur de α calculée précédemment nous est utile car elle permet d'établir une relation entre la concentration de biomasse (X) et sa variation au cours du temps (dX/dt), donnant une équation différentielle dont la solution est X . La conclusion des calculs est que la valeur du paramètre K_s ne peut pas être déterminée avec précision mais qu'elle est assurément inférieure à 5 g/L, peut-être même beaucoup plus faible, expliquant la succession sans transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire.

Pour la production du resvératrol, les études en bioréacteur avaient proposés deux modèles possibles : l'un exponentiel et l'autre quadratique. La difficulté qui réside est l'explication d'un pic très aigü dans la cinétique de production du resvératrol. L'observation des variations du taux d'oxygène nous a amené à supposer ici qu'un mécanisme d'oxydation s'accroît fortement au moment de ce pic. Cette hypothèse mériterait d'être étudiée lors d'expériences complémentaires.

D'autres essais de modélisation ont été menés pour tenter d'expliquer, par des mécanismes de dégradation, la phase de décroissance de la concentration du resvératrol. Mais les données sont encore insuffisantes et aucun modèle n'a permis de rendre compte de façon satisfaisante de la forme de la courbe expérimentale. La modélisation de la production des dérivés du resvératrol est donc encore prématurée.

III. Etude de la localisation de la biosynthèse du resvératrol

Nous avons présenté des éléments préliminaires pour expliquer certains aspects de la cinétique de production du resvératrol. Cependant, ces premières considérations ne parviennent pas encore à former un modèle complet. L'élaboration d'un tel modèle nécessite de prendre en compte de façon plus précise certains mécanismes de la biosynthèse des stilbènes. Au-delà de la voie métabolique et des aspects cinétiques, plusieurs questions se posent en effet concernant la localisation de ces phénomènes à l'échelle de la cellule. Une étude par microscopie confocale nous a permis d'apporter un éclairage important à ce sujet. Cette étude a été précédée par des travaux de vidéomicroscopie qui ont donné une première idée de la localisation de la synthèse (Donnez, 2010).

i. Etude préliminaire par vidéomicroscopie

Dans cette première expérience, des cellules de la variété 41B, préalablement élicitées au MeJA (0,12 mM), sont observées à différents délais après l'élicitation (0h, 8h, 16h, 20h, 24h et 28h). Elles sont éclairées par une lumière monochromatique à 330 nm, qui permet d'exciter le resvératrol. Le rayonnement de fluorescence émis est détecté à travers un filtre (330 – 380 nm).

Les observations des cellules à chaque délai sont rassemblées dans la figure 57. On constate une apparition progressive du resvératrol, particulièrement à la périphérie du noyau et de la paroi cellulaire. La fluorescence se fait plus intense à partir de 20h, permettant de distinguer des zones à fluorescence plus intense à proximité de la paroi, correspondant à des concentrations plus fortes en resvératrol. Celles-ci sont indiquées par des flèches sur la figure. Le centre des cellules émet une fluorescence de moindre intensité. On ne peut pas déterminer si elle provient de la vacuole ou de la paroi et du cytoplasme qui se trouvent au-dessus et en-dessous du plan d'observation. Pour pouvoir répondre à cette question, il est nécessaire d'avoir recours à une autre technique d'observation, montrant la répartition tridimensionnelle du resvératrol. C'est ce que permet l'imagerie par microscopie confocale que nous allons maintenant présenter.

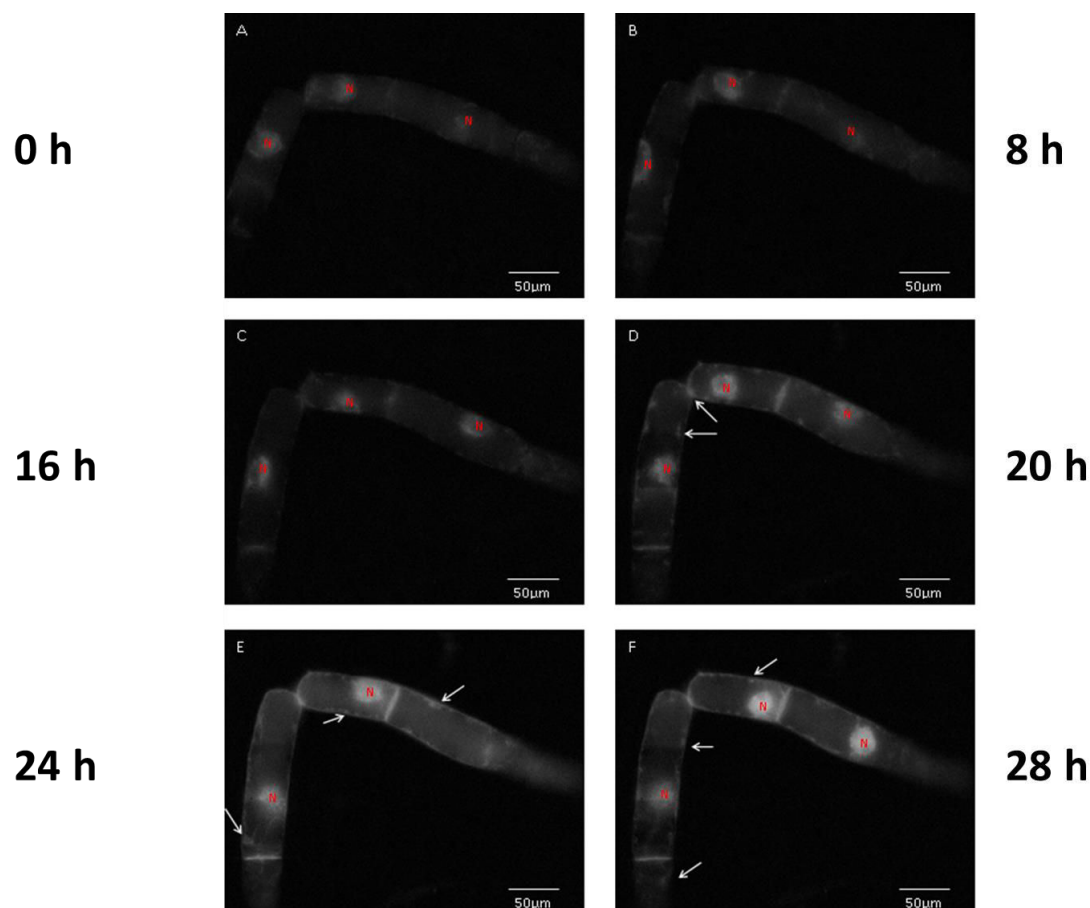


Figure 57 : Cinétique d'apparition du resvératrol observée par vidéomicroscopie (d'après Donnez, 2010).

ii. Observation par microscopie confocale

Des cellules ayant subi le traitement éliciteur décrit plus haut sont cette fois balayées par un rayonnement laser femtoseconde de 715 nm. Le resvératrol émet alors un signal de fluorescence excitée à deux photons qui est collecté à travers un filtre passe-bande (370 – 450 nm) (pour le protocole détaillé, voir Donnez 2010). Les cellules sont observées chaque jour, du premier au sixième jour après l'élicitation. La microscopie confocale permet d'obtenir une image plan par plan des cellules. Sur la figure 58, l'image de gauche montre une superposition de l'observation par microscopie confocale (en bleu) et par transmission en lumière visible (en gris). Elle permet de confirmer que le resvératrol s'accumule effectivement autour du noyau et de la paroi cellulaire, probablement dans le cytoplasme. L'image de droite montre l'observation confocale seule, où il est manifeste cette fois, que le resvératrol ne s'accumule pas dans la vacuole. Ceci est cohérent avec sa nature plutôt apolaire qui le distingue de son dérivé glycosylé, le picéide. Cette présence préférentiellement périphérique dans la cellule est aussi en accord avec la fonction du resvératrol. Cette molécule de défense doit en effet se trouver en première ligne en cas d'attaque de la cellule par un pathogène. L'image de droite

permet aussi de confirmer la présence des structures granuleuses observées en vidéomicroscopie.

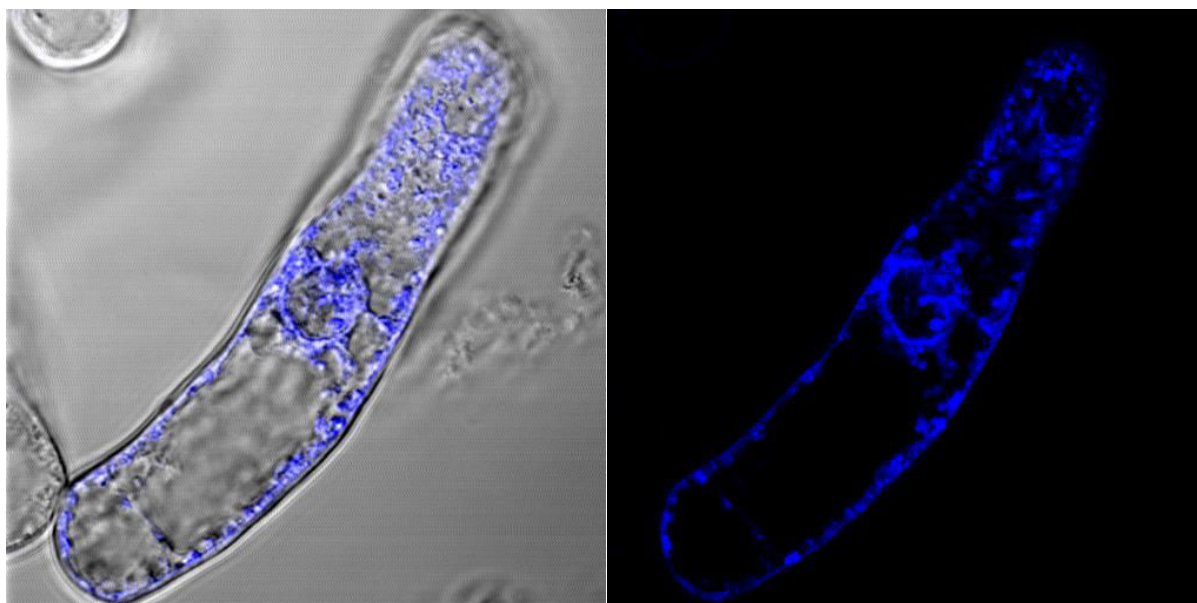


Figure 58 : A gauche : superposition de l'image par microscopie confocale (en bleu) et par transmission en lumière visible (en gris) ; A droite : image par microscopie confocale seule

En réalisant des images de la cellule selon plusieurs plans superposés, on peut reconstituer une vue tridimensionnelle de la répartition du resvératrol. La figure 59 montre ces reconstitutions, réalisées chaque jour depuis le premier jusqu'au sixième jour après l'élicitation. On voit que le resvératrol apparaît très localement le premier jour (on observe seulement quelques taches), probablement synthétisé dans des organites spécifiques. Puis le resvératrol s'accumule progressivement dans la paroi, d'abord en faible concentration (en violet sur la figure). Ce volume périphérique dans lequel le resvératrol s'accumule semblerait correspondre à l'espace compris entre la partie la plus externe de la paroi et la surface externe de la membrane plasmique. On sait que l'incubation de cellules témoins dans une solution de resvératrol provoque l'adsorption de celui-ci sur leur paroi (Adrian, 2006). Cette forte affinité du resvératrol pour la paroi en fait une zone privilégiée de mise en réserve. Le resvératrol pourrait franchir la membrane plasmique par différents mécanismes, par diffusion passive ou par transport actif à l'aide de protéines transmembranaires comme les transporteurs à ATP Binding Cassette (transporteurs ABC) (Suzuki, *et al.*, 2010). Lors du processus d'élicitation, le resvératrol ne reste pas cantonné à la paroi mais il s'accumule majoritairement dans le milieu de culture (Donnez, 2010).

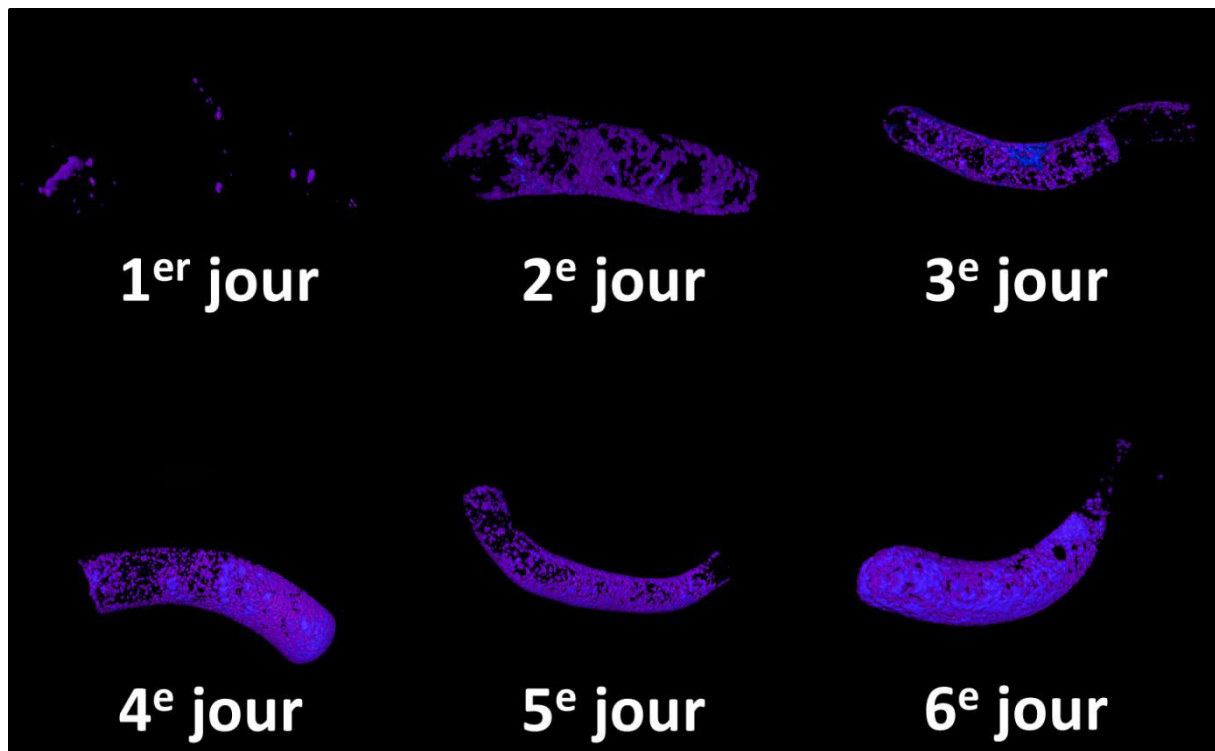


Figure 59 : Cinétique d'apparition du resvératrol, en reconstitution tridimensionnelle (vue externe des cellules)

Quand la totalité de la paroi est quasiment couverte, des zones de plus forte concentration apparaissent (en bleu clair). Par une observation rapprochée de la face interne de la paroi cellulaire (Fig. 60), on peut constater que ces zones de forte concentration correspondent bien à des structures sphériques, accolées à la membrane cellulaire, comme on l'avait présumé lors de l'observation en vidéomicroscopie. Ces structures pourraient correspondre à des vésicules cytoplasmiques qui contiennent la STS, enzyme responsable de la synthèse du resvératrol (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). Lorsqu'elles ont synthétisé suffisamment de resvératrol, ces vésicules pourraient fusionner avec la membrane cellulaire et libérer ainsi leur contenu hors de la cellule, par exocytose, dans l'espace situé entre la membrane et la paroi cellulaire (Fig. 61). Le resvératrol libéré diffuserait alors à travers la paroi, ce qui expliquerait l'existence de petites taches de fluorescence plus intense au niveau de la paroi, sur la figure 59.

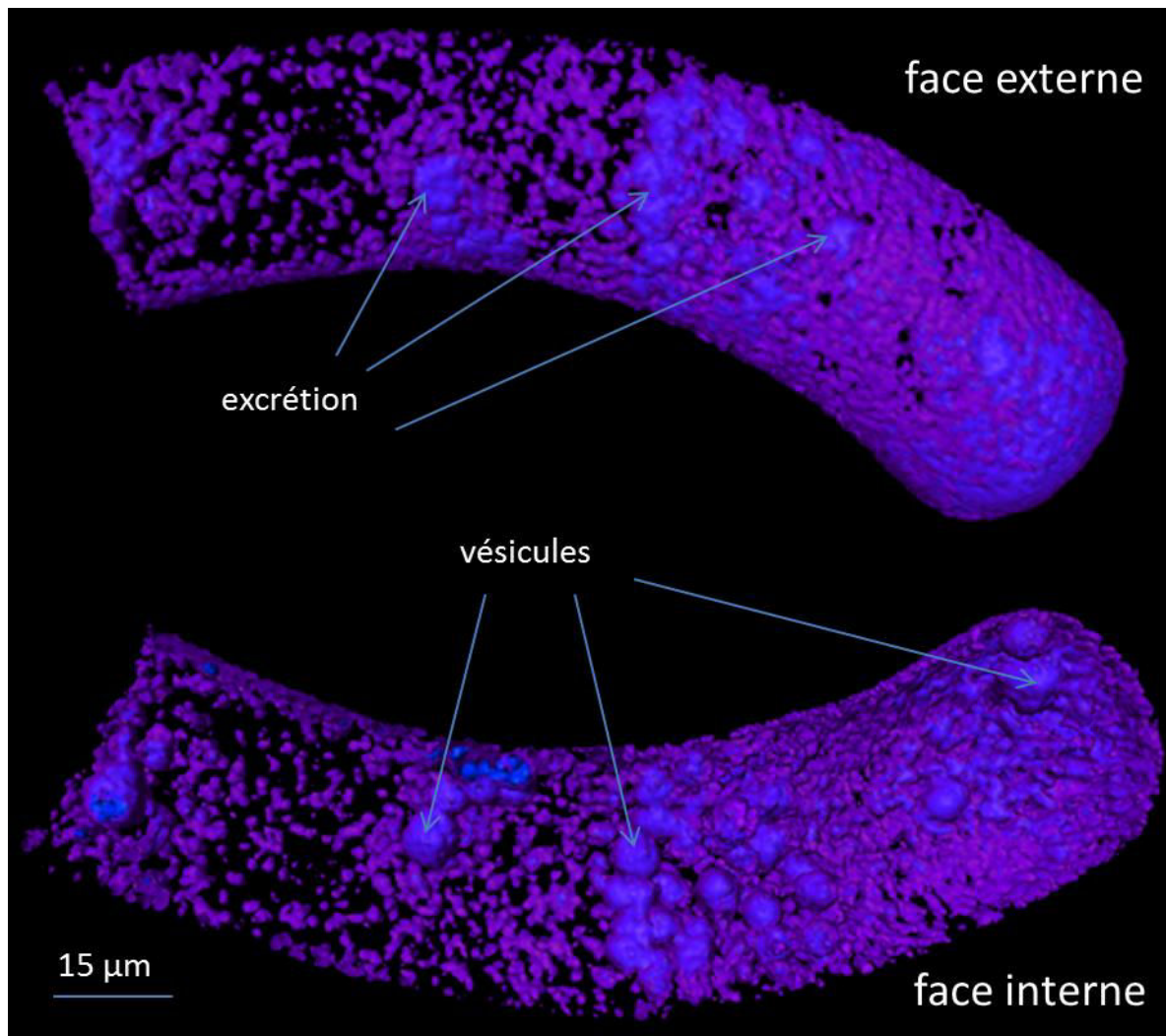


Figure 60 : Observation rapprochée des faces externe et interne de la paroi cellulaire, en reconstruction tridimensionnelle, au 4^e jour après l'élicitation

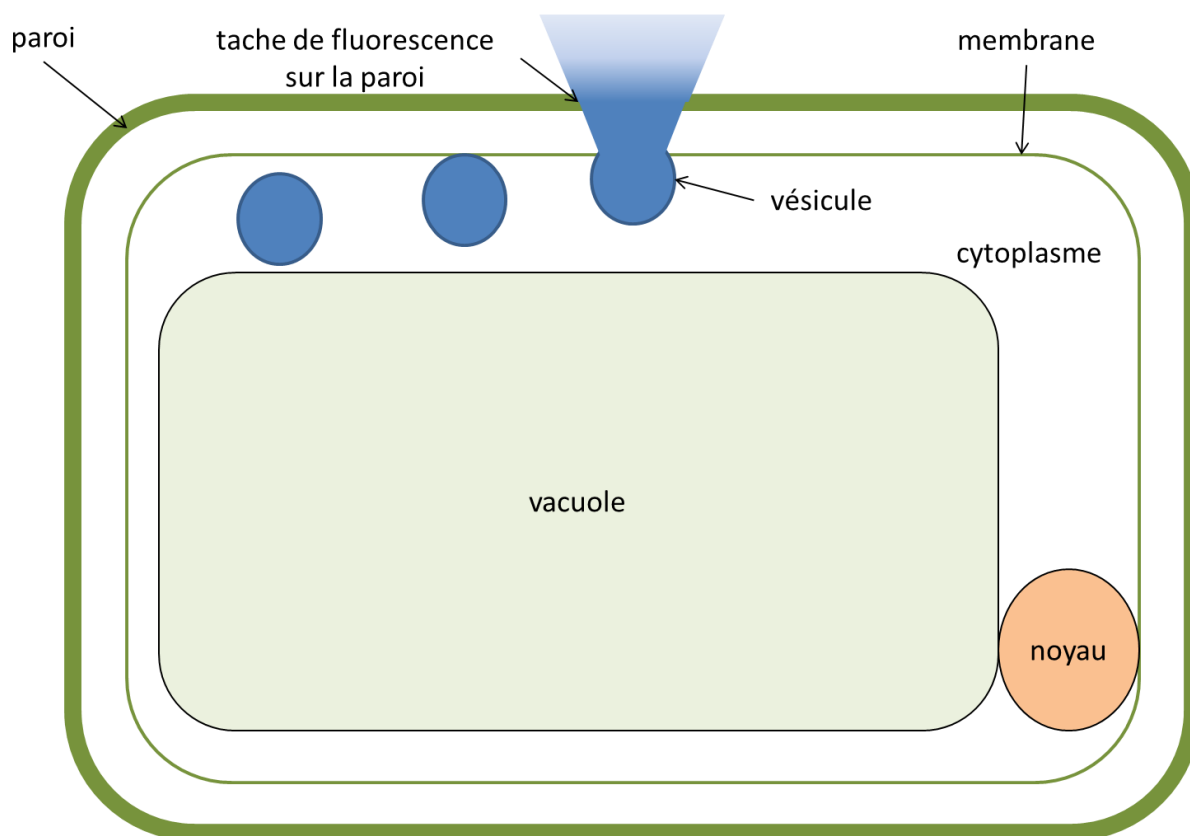


Figure 61 : Hypothèse de l'exocytose des vésicules cytoplasmiques contenant le resvératrol

Conclusions

Les observations faites ici rendent possible une meilleure compréhension de la cinétique précoce d'accumulation du resvératrol dans les cellules. Elles donnent des informations importantes quant à sa localisation : le resvératrol s'accumule dans le cytosol, voire dans la paroi cellulaire, mais en aucun cas dans la vacuole.

En outre, les images de microscopie montrent l'existence de zones de concentrations plus fortes en resvératrol. Ces zones correspondraient à des vésicules cytoplasmiques contenant la STS et elles seraient peut-être le siège de la biosynthèse et de l'excrétion du resvératrol.

Conclusion générale

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'est articulé autour de deux principaux types d'études. D'une part, des études en fioles ont rendu possible l'exploration d'un grand nombre de conditions de culture et d'élicitation différentes. Ceci a amené à dégager certaines tendances générales concernant l'influence de différents paramètres, tels que la concentration de la biomasse, les concentrations en éliciteurs et la durée d'exposition aux éliciteurs. D'autre part, des essais en bioréacteur ont été l'occasion d'aborder un mode de culture de plus gros volume, avec un suivi régulier. Ce travail en bioréacteur a abouti à formuler des éléments de modélisation du système constitué par la suspension cellulaire.

Des résultats ont été obtenus sur plusieurs aspects du système étudié. Tout d'abord la modélisation de la croissance en phase exponentielle a montré une très bonne corrélation entre le modèle et les mesures expérimentales et une reproductibilité tout à fait satisfaisante, que ce soit entre les différents essais en bioréacteur ou comparativement à ce qui a été mesuré en fioles. Ceci a permis de déterminer le taux de croissance spécifique de la souche Concord avec une assez bonne précision ($\mu_{\max} = 0,0085 \pm 0,0009 \text{ h}^{-1}$). Lors de la discussion, nous avons constaté que la phase stationnaire succède presque immédiatement à cette phase exponentielle. Pour autant, la nature du nutriment limitant n'a pas pu être déterminée avec certitude. L'hypothèse principale qui a été avancée est que le nutriment limitant pourrait être le sucre. Partant de cette supposition et de l'équation donnée par la loi de Monod, nous avons conclu que, pour le sucre, la constante de demi-saturation devrait être très petite par rapport aux concentrations en saccharose habituellement apportées dans le milieu ($K_s < 5 \text{ g/L}$). La très courte durée de la phase de transition ne permet pas de déterminer cette constante avec précision, sauf à effectuer des prélèvements en grand nombre et très fréquents afin d'avoir une mesure très précise de la concentration de la biomasse au cours de cette phase. Mais ceci ne garantit pas d'obtenir un résultat précis. Il serait intéressant d'effectuer une cinétique de croissance complète (en fioles et/ou en bioréacteur) depuis la phase exponentielle jusqu'à la phase stationnaire, en effectuant un dosage parallèle des sucres.

Concernant l'élicitation par le jasmonate de méthyle seul, l'étude en fiole a révélé que le rapport $[\text{MeJA}]/\text{MF}$ semblait être le paramètre déterminant pour la production du resvératrol. Il existerait une valeur optimale de ce rapport qui maximise la concentration de resvératrol obtenue dans le milieu de culture. Il est même apparu que la valeur de ce rapport avait une influence sur la cinétique de production. Plus il est faible, plus la cinétique est lente.

Deux hypothèses ont été formulées pour modéliser la production du resvératrol. Chacune d'elle a été étayée par l'explicitation d'un possible mécanisme qui en serait la cause. La première hypothèse est une cinétique exponentielle de production de resvératrol. Celle-ci donnerait, par analogie avec la croissance cellulaire, un taux de production spécifique de $0,0155 \pm 0,0035 \text{ h}^{-1}$. Le mécanisme qui pourrait l'expliquer est une auto-induction que le resvératrol exercerait sur sa synthèse. Une telle cinétique serait cohérente en réponse à l'attaque d'un pathogène qui possède lui-même une croissance exponentielle. L'autre hypothèse est un modèle quadratique. Celui-ci implique que la STS, enzyme catalysant la synthèse du resvératrol, serait produite à une vitesse constante.

La phase de décroissance du resvératrol est *a priori* plus difficile à mettre en adéquation avec un modèle. Ceci est dû principalement à une méconnaissance des mécanismes de dégradation et/ou de métabolisation du resvératrol qui en sont la cause. Quels sont ces différents mécanismes ? Quelles sont leurs vitesses respectives ? La dégradation du resvératrol est-elle purement chimique ou fait-elle appel aussi à des processus enzymatiques ? Par ailleurs, quelle est l'influence des métabolites produits lors de cette phase, sur la synthèse du resvératrol par les cellules ? On ne sait pas non plus quelle est la part de l'inhibition de la croissance et celle de la mort cellulaire programmée. La quantification du nombre de cellules vivantes pourrait apporter des informations précieuses à ce sujet. Le phénomène le plus remarquable est la rupture sans transition entre la phase de croissance et la phase de décroissance de la concentration du resvératrol dans le milieu de culture. La discussion nous a ici conduits à un début d'explication, par l'observation d'une corrélation notable entre les variations du taux d'oxygène dissous et celles de la concentration du resvératrol. Il semblerait que la brusque décroissance de la concentration du resvératrol soit à associer à une oxydation de la molécule. L'élément inconnu reste la cause qui déclenche l'oxydation à ce moment-là. Serait-ce la libération par les cellules, suite à la mort cellulaire programmée, de substances qui catalysent l'oxydation ? Un dosage des potentiels produits d'oxydation (par HPLC ?) pourrait nous éclairer à ce sujet.

L'existence d'un pic aussi aigu dans le profil de production du resvératrol représente un obstacle à contourner si l'on envisage une production industrielle. En effet, ce phénomène rendrait très aléatoire la possibilité de récolter le milieu de culture au moment où la concentration du resvératrol est maximale. Les résultats obtenus en fioles avec l'ajout de méthyl- β -cyclodextrine nous apportent heureusement une solution prometteuse. L'étude en fioles nous a effectivement montré que cette molécule permettait d'atteindre des concentrations de resvératrol à peu près 50 fois supérieures à celles obtenues en élicitation avec le jasmonate de méthyle seul. La méthyl- β -cyclodextrine a un effet éliciteur indéniable puisqu'elle provoque à elle seule la synthèse du resvératrol. Cependant, les concentrations les plus importantes, et de loin, sont le résultat d'une élicitation combinée avec le jasmonate de méthyle. L'obtention de concentrations aussi élevées pour un métabolite secondaire (2500 mg/L) ne peut pas s'expliquer par un simple effet éliciteur. C'est la capacité de la méthyl- β -cyclodextrine à encapsuler les molécules de resvératrol qui rend compte d'une bonne part de leur effet. A ce propos, nous avons avancé plusieurs hypothèses compatibles entre elles. La cyclodextrine permet tout d'abord d'augmenter considérablement la solubilité du resvératrol dans le milieu aqueux puisqu'elle est elle-même très soluble dans l'eau, contrairement au resvératrol qu'elle va abriter dans un espace hydrophobe. La deuxième hypothèse vient répondre au problème de l'oxydation éventuelle du resvératrol ou des autres processus de dégradation ou de métabolisation. L'encapsulation du resvératrol pourrait le préserver de toutes ces transformations. Elle pourrait par ailleurs préserver les cellules des effets toxiques du resvératrol. Ceci est confirmé par les mesures de concentrations en biomasse à l'issue des essais avec la méthyl- β -cyclodextrine seule : la biomasse ne se réduit pas autant qu'en présence du seul jasmonate de méthyle. Enfin, l'emploi de la cyclodextrine seule conduit à une synthèse réduite de l' ϵ -viniférine, ce qui confirme l'inhibition de la métabolisation du resvératrol.

La méthyl- β -cyclodextrine pourrait donc représenter un bon moyen de contourner le problème posé par la brusque dégradation du resvératrol. Son inconvénient majeur reste cependant son coût élevé. L'autre limite qu'elle présente est la question de son innocuité. Est-il nécessaire de l'éliminer dans l'élaboration d'un produit fini ? Toujours est-il que son étude a permis de voir que le fait d'isoler la molécule de resvératrol du reste du milieu était une solution pour avoir une excellente production. A partir de là, des alternatives peuvent être envisagées si elles offrent des moyens similaires. Suffit-il d'extraire le resvératrol en continu pour lui éviter d'atteindre sa limite de solubilité dans le milieu et d'entrer en contact prolongé avec les cellules ? Si oui, n'importe quel procédé d'extraction est une solution. Nous avons vu que l'extraction liquide-liquide par solvant présentait un risque écologique mais il est possible de se tourner vers une extraction liquide-solide à l'aide d'une résine.

Ces études apportent ainsi suffisamment d'éléments qui rendent crédibles une production du resvératrol à l'échelle industrielle. Il reste à mieux connaître tous les mécanismes enzymatiques qui mènent à sa synthèse et ceux responsables de son catabolisme. L'autre volet à développer est la modélisation en bioréacteur, notamment en présence de cyclodextrine.

Références

Adrian, M. (2006). Mécanisme de defense de la vigne : élitation, production et rôle des phytoalexines, applications. HDR.

Andre, P., & Renimel, I., LVMH Recherche (2010). Protecting and regenerating composition. US 7 718 203 B2.

Arichi, H., Kimura, Y., & Okuda, H. (1982). Effects of stilbene components of the roots of *polygonum cuspidatum* sieb. et zucc. on lipid metabolism. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30(5), 1766-1770.

Aritomi, M., & Donnelly, D. M. X. (1976). "Stilbene glucosides in the bark of *Picea sitchensis*". *Phytochemistry* 15(12), 2006.

Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., Krisa, S., & Mérillon, J.-M. (2004). Production of highly ¹³C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Journal of Biotechnology*, 109(3), 301-308.

Barger, J. L., Kayo, T., Vann, J. M., Arias, E. B., Wang, J., Hacker, T. A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J. D., Leeuwenburgh, C., Allison, D. B., Saupe, K. W., Cartee, G. D., Weindruch, R., & Prolla, T. (2008). A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One*, 3(6), article number: e2264.

Bauer, J. H., Goupil, S., Garber, G. B., & Helfand, S. L. (2004). An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 12980-12985.

Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R., & Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337-342.

Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2008). What is xenohormesis? *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3(1), 149-156.

Beerling, D. J., Bailey, J. P., & Conolly, A. P. (1994). Biological flora of the british isles - *fallopia japonica* (houtt.) ronse decraene (*reynoutria japonica* houtt.; *polygonum cuspidatum* sieb. & zucc.). *Journal of Ecology*, 82(4), 959-979.

Belchi-Navarro, S., Almagro, L., Sabater-Jara A. B., Fernandez-Perez, F., Bru, R., & Pedreno, M. A. (2013). Early signaling events in grapevine cells elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62, 107-110.

Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., & Mérillon, J.-M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 493-499.

Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 1(7), 233-240.

Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A., Humphry, M., Borel, S., Petétot, J. M., Métraux, J.-P., & Nawrath, C. (2007). A permeable cuticle in arabidopsis leads to a strong resistance to *botrytis cinerea*. *EMBO Journal*, 26(8), 2158-2168.

Bordone, L., & Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), 298-305.

Bru, M. R., & Pedreno, G.M.L.D.E. (2006). Method for the production of resveratrol in cell cultures. *US 2006/0205049 A1*.

Chen, J., Hall, D. E., Murata, J., & De Luca, V. (2006). L-alanine induces programmed cell death in *V. labrusca* cell suspension cultures. *Plant Science*, 171(6), 734-744.

Chevassus-au-Louis, N. (2000). La paradoxale saga du taxol. *La Recherche* 333.

Chong, J., Poutaraud, A., & Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177(3), 143-155.

Chu, X., Sun, A., & Liu, R. (2005). Preparative isolation and purification of five compounds from the chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1097(1-2), 33-39.

Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R. D., Hancock, J. T., & Neil, S. J. (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal*, 24, 667-677.

Davis, T. M. E., Karunajeewa, H. A., & Ilett, K. F. (2005). Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. *Medical Journal of Australia*, 182(4), 181-185.

Decendit, A., & Mérillon, J. M. (1996). Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 15, 762-765.

Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., & Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 13454-13459.

Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Jannin, B., & Latruffe, N. (2006). Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, 7(4), 423-442.

Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., & Courot, E. (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 27(12), 706-713.

Donnez, D. (2010). Etude de la bioproduction des stilbènes dans les suspensions cellulaires de *Vitis* 41B : élicitation et mécanismes de l'induction de la biosynthèse. Université de Reims Champagne-Ardenne.

Donnez, D., Kim, K.-H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clément, C., & Courot, E. (2011). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, 46(5), 1056-1062.

Durner, J., Wendehenne, D., & Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10328-10333.

Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185-209.

Esau, K. (1965). Plant Anatomy, 2nd Edition. John Wiley & Sons. 767 pp.

Ferri, M., D'Errico, A. L., Vacchi Suzzi, C., Franceschetti, M., Righetti, L., Bagni, N., & Tassoni, A. (2007). Use of rifampicin for resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspensions. In P. Jeandet, C. Clément, & A. Conreux (Eds.), *Macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine* (pp. 95–98). Paris: Lavoisier.

Ferri, M., Tassoni, A., Franceschetti, M., Righetti, L., Naldrett, M. J., & Bagni, N. (2009). Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*, 9(3), 610-624.

Ferri, M., Dipalo, S. C. F., Bagni, N., & Tassoni, A. (2011). Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. *Food Chemistry*, 124(4), 1473-1479.

Fornara, V., Onelli, E., Sparvoli, F., Rossoni, M., Aina, R., Marino, G., & Citterio, S. (2008). Localization of stilbene synthase in *vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma*, 233(1-2), 83-93.

Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, 341(8852), 1103-1104.

Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.

Geahlen, R. L., & McLaughlin J. L. (1989). Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 165(1), 241-5.

Guillon, S., Tremouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M., & Gantet, P. (2006). Hairy root research: Recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 341-346.

Ho, C. W., & Kuo, H. S. (2008). In vitro resveratrol rich callus tissues derived from *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc. and method for producing the same. US 2008/0160560 A1.

Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 191-196.

Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.-F., Weissenbach, J., Quétier, F., & Wincker, P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449(7161), 463-467.

Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B. F., Meunier, P., Peyron, D., & Trollat, P. (1995a). Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 316-319.

Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., & Trollat, P. (1995b). Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 1-4.

Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Paradiso, F., Cocina, R. A., Bolettieri, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., & Courot, E. (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *Biofactor*, 36, 331-341.

Jeandet, P., Delaunois, B., Aziz, A., Donnez, D., Vasserot, Y., Cordelier, S., & Courot, E. (2012). Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 579089, 14 p.

Jones, D. A., & Takemoto, D. (2004). Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 48-62.

Joseph, J. A., Fisher, D. R., Cheng, V., Rimando, A. M., & Shukitt-Hale, B. (2008). "Cellular and Behavioral Effects of Stilbene Resveratrol Analogues: Implications for Reducing the Deleterious Effects of Aging". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(22), 10544–10551.

Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., & Malone, D. M. (1997). Plant cell suspension cultures: Some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59(1-2), 39-52.

Kim, J. S., Lee, S. Y., & Park, S. U. (2008). Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology*, 7, 3788-3790.

Klarzynski, O., & Fritig, B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences*, 324, 953-963.

Kliebenstein, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: A view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environment*, 27, 675-684.

Kopp, P. (1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'french paradox'? *European Journal of Endocrinology*, 138(6), 619-620.

Kouakou, T. H., Teguo, P. W., Valls, J., Kouadio, Y. J., Decendit, A., & Merillon, J.-M. (2006). First evidence of trans-resveratrol production in cell suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 405-409.

Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., & Merillon, J.-M. (1999). Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Methyl jasmonate induction and ¹³C biolabeling. *Journal of Natural Products*, 62(12), 1688-1690.

Kundu, J. K., & Surh, Y. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269(2), 243-261.

Kwon, J. Y., Seo, S. G., Heo, Y. S., Yue, S., Cheng, J. X., Lee, K. W., & Kim, K. H. (2012). "Piceatannol, Natural Polyphenolic Stilbene, Inhibits Adipogenesis via Modulation of Mitotic Clonal Expansion and Insulin Receptor-dependent Insulin Signaling in Early Phase of Differentiation". *Journal of Biological Chemistry* 287(14), 11566–11578.

Langcake, P., & Pryce, R. J. (1977). "A new class of phytoalexins from grapevines". *Experientia* 33(2), 151–152.

Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Chèze, C., Deffieux, G., & Merillon, J.-M. (1998). Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Reports*, 17(12), 946-950.

Lee, D., Cuendet, M., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., Fong, H. H., Pezzuto, J. M., & Kinghorn, A. D. (2001). "A novel cyclooxygenase-inhibitory stilbenolignan from the seeds of *Aiphanes aculeata*". *Organic Letters* 3(14), 2169–71.

Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martínez-Zapater, J. M., Bru, R., & Pedreno, M. A. (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Research Notes*, 1, 132.

Lin, H. S., Yue, B. D., & Ho, P. C. (2009). Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 23, 1308-15.

Liu, Z., Frasconi, M., Lei, J., Brown, Z. J., Zhu, Z., Cao, D., Iehl, J., Liu, G., Fahrenbach, A. C., Botros, Y. Y., Farha, O. K., Hupp, J. T., Mirkin, C. A., & Stoddart, J. F. (2013). Selective isolation of gold facilitated by second-sphere coordination with α -cyclodextrin. *Nature Communications*, 4, 1855.

Loon, L. C. (1985). "Pathogenesis-related proteins". *Plant Molecular Biology* 4(2-3), 111–116.

Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis". *Nature* 407(6801), 233–241.

Massey, F. P., Roland Ennos, A., & Hartley, S. E. (2007). Herbivore specific induction of silica-based plant defences. *Oecologia*, 152(4), 677-683.

Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A. M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S. F., Bennett, S., Dolan, M. C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, 68(14), 1992-2003.

Mikstacka, R., Przybylska, D, Rimando, A. M., & Baer-Dubowska, W. (2007). "Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by trans-resveratrol methyl ethers". *Molecular Nutrition and Food Research* 51(5), 517–24.

Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394.

Morales, M., Bru, R., Garcia-Carmona, F., Ros Barcelo, A., & Pedreno, M. A. (1998). Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(3), 179-187.

Mulabagal, V., & Tsay, H. S. (2004). Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2, 29-48.

Münzenberger, B., Heilemann, J., Strack, D., Kottke, I., & Oberwinkler, F. (1990). "Phenolics of mycorrhizas and non-mycorrhizal roots of Norway spruce". *Planta* 182.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Review* 1, 69-79.

Nicks, F., Borguet, Y., Delfosse, S., Bicchielli, D., Delaude, L., Sauvage, X., & Demonceau, A. (2009). Microwave-assisted ruthenium-catalyzed reactions. *Aust J Chem*, 62, 184-207.

Nonomura, S., Kanagawa, H., & Makimoto, A. (1963). Chemical constituents of *Polygonaceous* plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon. (*Polygonum cuspidatum* SIEB et ZUCC). *Yakugaku Zasshi* 83, 988-990.

Nopo-Olazabal, C., Condori, J., Nopo-Olazabal, L., & Medina-Bolivar, F. (2014). Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of *Vitis rotundifolia* treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 50-69.

Palamara, A. T., Nencioni, L., Aquilano, K., De Chiara, G., Hernandez, L., Cozzolino, F., Ciriolo, M. R., & Garaci, E., (2005). Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *Journal of Infectious Diseases*, 191(10), 1719-1729.

Paxton, J. D., (1980). A new working definition of the term « phytoalexin. » *Plant Disease*, 64, 734.

Paxton, J. D., (1981). Phytoalexins – A working redefinition. *Journal of Phytopathology*, 101(2), 106-109.

Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., Jamieson, H.A., Zhang, Y., Dunn, S.R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L.A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P. J., Becker, K. G., Navas, P., Ingram, D. K., Wolf, N. S., Ungvari, Z., Sinclair, D. A., & de Cabo, R. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metabolism*, 8(2), 157-168.

Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J. B., Tabacchi, R., Gindro, K., & Viret, O. (2003). "Δ-Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18), 5488–5492.

Pillarisetti, S. (2008). A review of Sirt1 and Sirt1 modulators in cardiovascular and metabolic diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 3(3), 156-164.

Pilloy, J. (2006). La lutte contre le paludisme : le marché de l'artémisinine et des dérivés. *Medecine Tropicale*, 66, 554-557.

Piver, B., Berthou, F. O., Dreano, Y., & Lucas, D. L. (2003). Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by ε-viniferin, the dimer of resveratrol: Comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sciences* 73(9), 1199-1213.

Rausher, M. D. (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, 411(6839), 857-864.

Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2007). *Biologie végétale*, 2^e édition, De Boeck (ISBN 978-2-8041-5020-4)

Rayne, S., Karacabey, E., & Mazza, G. (2008). Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and transviniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 335-340.

Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339, 1523-1526.

Repka, V., Fischerova, I., & Šilharova, K. (2004). Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum*, 48(2), 273-283.

Reymond, P., & Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 404-411.

Rimando, A. M. (2006). "Pterostilbene's Healthy Potential". *Agricultural Research* 54(11-12), 6-7.

Rocha-Gonzalez, H. I., Ambriz-Tututi, M., & Granados-Soto, V. (2008). Resveratrol: A natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 14(3), 234-247.

Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast*, 8(6), 423-488.

Romero-Pérez, A. I., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventós, R. M., & De La Torre-Boronat, M. C. (1999). "Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(4), 1533–1536.

Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14, 340-58.

Roupe, K. A., Yáñez, J. A., Teng, X. W., & Davies, N. M. (2006). Pharmacokinetics of selected stilbenes: Rhapontigenin, piceatannol and pinosylvin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(11), 1443-50.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8(10), 1809-1819.

Schnee, S., Viret, O., & Gindro, K. (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6), 128-133.

Shikishima, Y., Takaishi, Y., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., & Ashurmetov, O. (2001). "Phenylbutanoids and stilbene derivatives of *Rheum maximowiczii*". *Phytochemistry* 56(4), 377–381.

Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5(1), 9-23.

Shu, N., Zhou, H., & Hu, C. (2006). "Simultaneous determination of the contents of three stilbene oligomers in *Caragana sinica* collected in different seasons using an improved HPLC method". *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29(4), 608–12.

Shulaev, V., Silverman, P., & Raskin, I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385, 718-721.

Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., & Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 199-208.

Siemann, E. H., & Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), 49-52.

Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzeliuss, J. P., van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Metraux, J. P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X., and Pieterse, C. M. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760-770.

Stenglein, S. A., Arambarri, A. M., Sevillano, M. C. M., & Balatti, P. A. (2005). Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens varies among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Leguminosae, Phaseoleae) Flora–Morphology, Distribution. *Functional Ecology of Plants*, 200, 285–295.

Stervbo, U., Vang, O., & Bonnesen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, 101(2), 449-457.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., & Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35, 235-70.

Sung, S. H., Kang, S. Y., Lee, K. Y., Park, M. J., Kim, J. H., Park, J. H., Kim, Y. C., Kim, J., & Kim, Y. C. (2002). "(+)- α -Viniferin, a Stilbene Trimer from *Caragana chamlague*, Inhibits Acetylcholinesterase". *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, 125.

Suzuki, M., Jasinski, M., Martinoia, E., Nishikawa, Y., Wada, K., Yamada, K., Yamaki, S., Matsumoto, S., & Shiratake, K. (2010). ABC transporter VvPDR1/VvABCG1 from grape berry skin. Poster présenté au 15ème Workshop, Adelaide 2010 (Australia), Plant Membrane Biology.

Swift, H. F. (1920). Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. *Journal of Experimental Medicine*, 69-75.

Szewczuk, L. M., Lee, S. H., Blair, I. A., & Penning, T. M. (2005). Viniferin Formation by COX-1: Evidence for Radical Intermediates during Co-oxidation of Resveratrol. *Journal of Natural Products*, 68(1), 36-42.

Takaoka, M.J. (1940). Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.), *J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University* 3, 1–16.

Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A. J., Perry, B., & Bagni, N. (2005). Jasmonates and na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. barbera cell cultures. *New Phytologist*, 166(3), 895-905.

Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F., & Cammue, B. P. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*, 13, 63-68.

Tian, T., Sun, Q., Shen, J., Zhang, T., Gao, P., & Sun, Q. (2008). Microbial transformation of polydatin and emodin-8- β -d-glucoside of polygonum cuspidatum sieb. et zucc into resveratrol and emodin respectively by rhizopus microsporus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 861-866.

Ton, J., van Pelt, J. A., van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 27-34.

Tukey, H. B. (1966) The story of the Concord grape. *Fruit Var Hort Digest* 20:54-55.

Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellerino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Biology*, 16(3), 296-300.

van Etten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., & Farmer, E. E. (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. *Plant Cell*, 6, 1191–1192.

van Loon, L. C., & Antoniw, J. F. (1982). Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Plant Pathology*, 88, 237-256.

van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135-162.

Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M., & Pugin, A. (2006). Integrated signalling network involving calcium, nitric oxide and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 429-440.

Vercauteren, J., Castagnino, C., & Delaunay, J.-C., Caudalie. (2003). Compositions based on Resveratrol. US 6,572,882 B1

Vitrac, X., Krisa, S., Decendit, A., Vercauteren, J., Nühlich, A., Monti, J.-P., Deffieux, G., & Merillon, J.-M. (2002). Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in vitis vinifera cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 95(1), 49-56.

Vitrac, X., Bornet, A. L., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J. C., Mérillon, J. M., & Teissédre, P. L. (2005). "Determination of Stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(14), 5664–5669.

Wagner, G. J. (1991). Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiology*, 96(3), 675-679.

Wang, H., Liu, L., Guo, Y. X., Dong, Y. S., Zhang, D. J., & Xiu, Z. L. (2007). "Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*". *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(4), 763–768.

Wang, W., Tang, K., Yang, H.-R., Wen, P.-F., Zhang, P., Wang, H.-L., & Huang, W.-D. (2010). Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. cabernet sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2-3), 142-152.

Waterhouse, A. L., & Lamuela-Raventos, R. M. (1994). The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry*, 37(2), 571-573.

Waters, E. J., Shirley, N. J., & Williams, P. J. (1996). "Nuisance Proteins of Wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 3-5.

White, R. F. (1979). Acetylsalicylic-acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99, 410-412.

Wibowo, A., Ahmat, N., Hamzah, A. S., Sufian, A. S., Ismail, N. H., Ahmad, R., Jaafar, F. M., & Takayama, H. (2011). "Malaysianol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops aromatica*". *Fitoterapia* 82(4), 676-681.

Wilkens, A., Paulsen, J., Wray, V., & Winterhalter, P. (2010). Structures of two novel trimeric stilbenes obtained by horseradish peroxidase catalyzed biotransformation of trans-resveratrol and (-)- ϵ -viniferin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6754-6761.

Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5 (4), 300-307.

Wood, J. G., Regina, B., Lavu, S., Hewitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M., & Sinclair, D. A. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430(7000), 686-689.

Wu, S., & Chappell, J. (2008). Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 145-152.

Yao, C. S., Lin, M., Liu, X., & Wang, Y. H. (2005). "Stilbene derivatives from *Gnetum cleistostachyum*". *Journal of Asian Natural Products Research* 7(2), 131–7.

Zhang, H.-S., Zhou, Y., Wu, M., Zhou, H., & Xu, F. (2009). Resveratrol inhibited tat-induced HIV-1 LTR transactivation via NAD⁺-dependent SIRT1 activity. *Life Sciences*, 85(13-14), 484-489.

Zhao, R.-Z., Liu, S., & Zhou, L.-L. (2005). Rapid quantitative HPTLC analysis, on one plate, of emodin, resveratrol, and polydatin in the chinese herb *polygonum cuspidatum*. *Chromatographia*, 61(5-6), 311-314.