

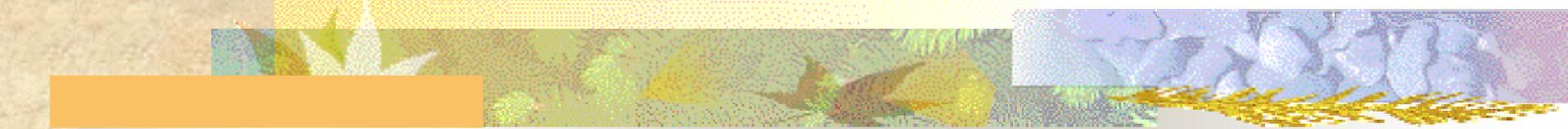
Productions végétales et valorisation pharmaceutique





Le marché pharmaceutique mondial

- # 300 Milliard d'€
 - 50% USA, 30% UE, 20% Japon
- 2% du CA de l'industrie globale
- 7,6% du PIB pour OCDE
- 20% des pays bénéficient de 85% du budget santé
- Des marges importantes (80%)



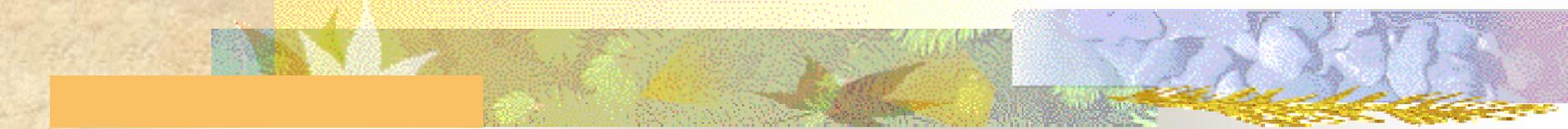
Les substances naturelles végétales dans l'industrie pharmaceutique

- Grande diversité de molécules
 - Structures chimiques connues :
Végétaux = 4 X Microorganismes
- Des molécules actives :
 - 75% de la population mondiale se soigne avec des plantes. 25% du marché USA des produits pharmaceutiques repose sur des actifs végétaux
 - Activités anticancéreuse, anti-virales...



Nature chimique des substances végétales à intérêt pharmaceutique

- Métabolites primaires
 - Sucres (polysaccharides, hétérosides)
 - Lipides (simples)
 - Amino-acides et protéines...(hétérosides cyanogénétiques)
- Métabolites secondaires
 - Les plus développés dans l'industrie pharmaceutique



Introduction aux métabolites secondaires végétaux

- Définition, exemples
- Aspects historiques
- Principales classes de métabolites secondaires
- Principales fonctions connues chez les végétaux
- Intérêt économique

Définition, exemples

Un composé qui est ...

- présent à faible concentration chez les plantes (mg.g^{-1} MS)
- historiquement supposé être non essentiel pour la vie de la plante (ce qui est faux...)

Exemples :

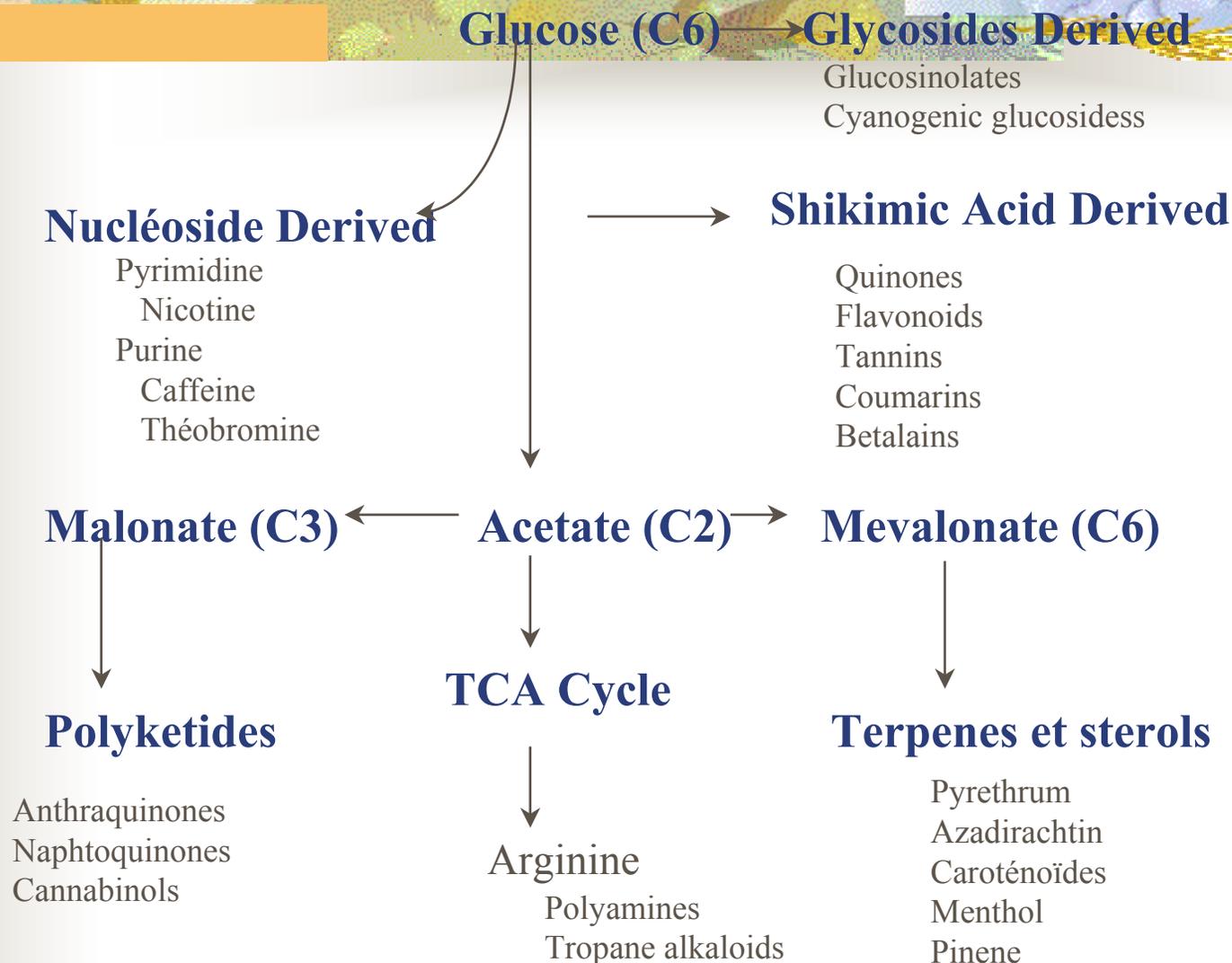
- Colorants naturels végétaux
- Fragrances végétales
- Actifs pharmaceutiques et cosmétiques
- Additifs et arômes alimentaires

Chimie

Cosmétique

Pharmacie

Alimentaire



Principaux groupes de métabolites secondaires végétaux

Aspects historiques

- Partie prenante de l'histoire des Hommes et des civilisations
- Découvertes contemporaines de l'avènement de la chimie
- Quelques avancées récentes
 - Phytochimie (depuis 1950)
 - Chemotaxonomie

Principales classes de métabolites secondaires végétaux

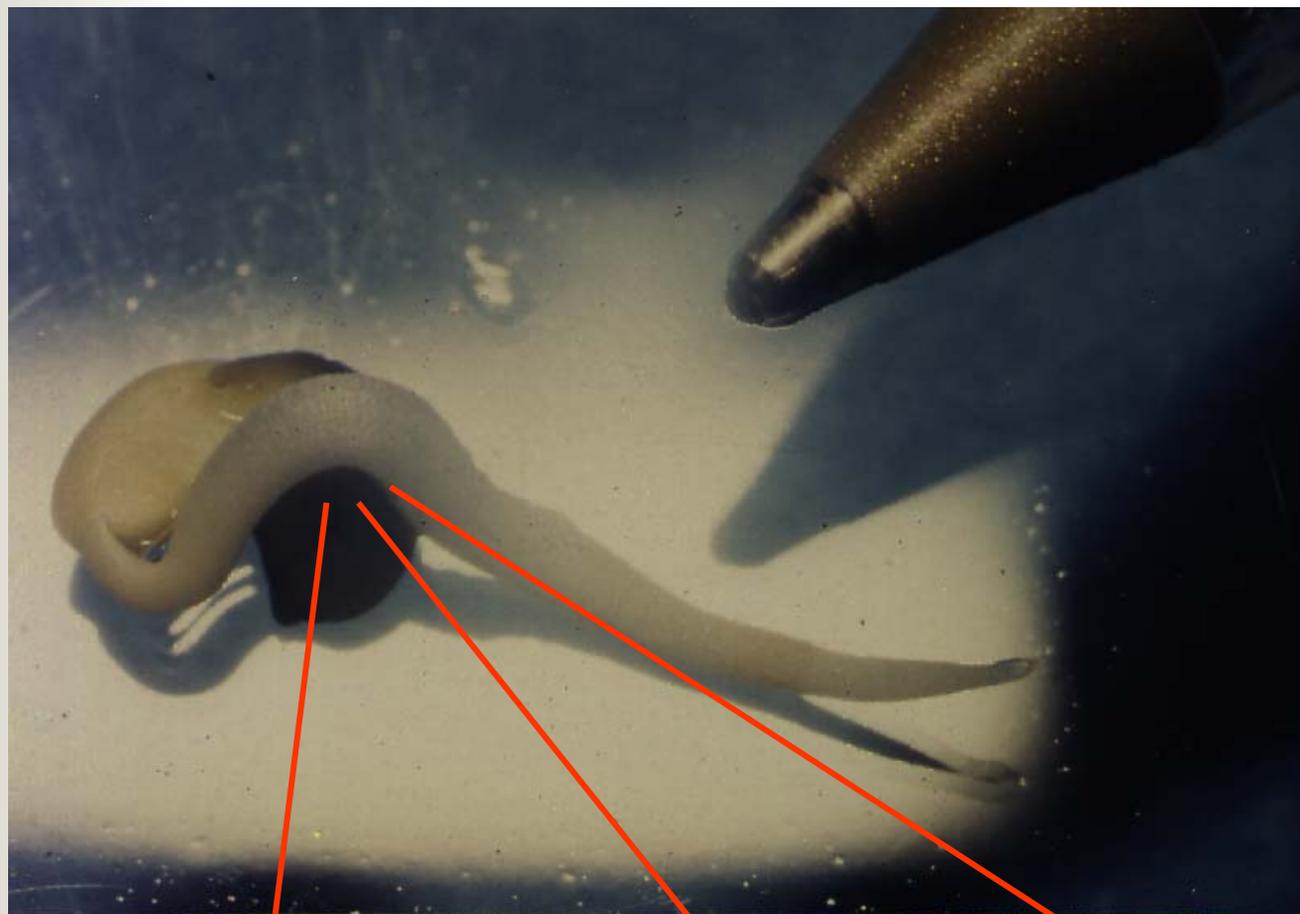
- Terpènes
 - Huiles essentielles, caroténoïdes, stéroïdes
- Alcaloïdes
 - Nicotinique, morphinique...
- Phénoliques
 - Lignines, flavonoïdes, coumarines

Principales fonctions des métabolites II^{aires} chez les végétaux

- Pigmentation
- Action anti-herbivore (insectes/mammifères)
- Composés antifongiques & antibactériens (phytoalexines)
- Signalisation chimique (symbioses)
- Substances de croissance
-

Essentiel pour l'adaptation des plantes au milieu naturel...

Exemple d'une graine bien défendue...



Psoralea cinerea
(Légumineuse)

Allelopathie
(inhibition de germination)

Phytoalexines
(racines, tiges)

Signalisation chimique
(flavonoïdes, Rhizobium)

Intérêt économique

1/ Molécules à activité thérapeutique remarquable

Ex : pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) ou If (taxus sp.) pour la production de d'anticancéreux

Impossibilité de produire par chimie de synthèse



2/ Molécules bénéficiant d'une excellente image

Image « naturelle », engouement pour la phytothérapie, ou comment faire de la transgénèse sans le dire...

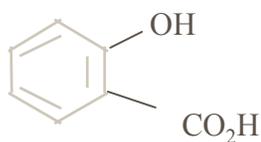
Le problème de la production des métabolites II^{aires}

- Synthèse organique
- ■ Culture de plantes au champ
- ■ Approches biotechnologiques : cultures cellulaires végétales
- ■ Production par génie génétique ?

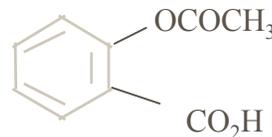
Synthèse organique : les plantes comme modèle

- Souvent possible, à bas prix

■ Ex : aspirine



Acide salicylique



Acide acétyl-Salicylique (50 000 t/an)

- Mais, ce n'est pas toujours possible...

Culture de plantes au champ

- Plantes médicinales

- ~8000 ha en France
- Culture peu coûteuse

- Mais, ce n'est pas toujours possible...

Organisation de la vente

- Pharmacopée : 1200 plantes

- Vente libre : 34 plantes
 - Consommées en l'état (plantes condimentaires, herbes aromatiques comme thym, laurier, estragon, persil et épices comme le cumin, coriandre, genièvre ...),
 - Utilisées/transformées par les industries alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques (bouleau, marron d'Inde, millepertuis, henné, etc.)

Le marché français

- Importation : 70 à 80 % des volumes utilisés
- Volumes importés : 19 000 t/an
- Balance commerciale 1998
 - En l'état : - 212 MF
 - Transformées : - 642 MF

Production française

■ Cueillette

■ Régions de montagne

- myrtilles : 5 à 10 000 t/an
- Gentiane
- Cynorhodon
- ...





→ 2000 t/an

Production française

■ Culture

- 12 000 t/an, # 8 000 ha, environ 100 plantes
- Production souvent très morcelée, et de quelques ha

Structuration de la filière

- Office : ONIPPAM
- Institut technique : ITEIPMAI

Production française

- Anjou : 200 ha
 - Menthe poivrée, camomille, sauge
- Région Parisienne 450 ha
 - Menthe, bardane, mélisse
- Champagne-Ardennes 3500 ha
 - Œillette







Production française

- Sud Est : 1000 ha
 - Haute Provence : menthe poivrée, thym, fenouil
 - Var : anis, Carvi, coriandre
 - Vaucluse : thym, sauge, hysope
 - Drôme : Thym, romarin, tilleul, marjolaine

Concurrence

- Europe méridionale
- Balkans
- Afrique septentrionale
 - Ex : cynar, prix 1999
 - Maroc : 4 à 6 F/kg (suivant qualité)
 - Bulgarie-Hongrie : 5 à 7 F/kg
 - Roumanie : 9 à 12 F/kg
 - France : 8 à 22 F/kg

Concurrence

- Marché mondial

- Fluctuation des cours :
 - Ex : camomille romaine
 - 1998 : 80 à 90 F/kg
 - 1999 : 60-80 F/kg

- Les PAM \neq produits de consommation courante

- Prévoir de vendre avant de produire

Conduite d'une culture

■ Temps de travail :

Camomille romaine : heures/ha

- Pépinière : 130
- Préparation du sol : 10
- Installation de la culture : 45
- Entretien mécanique : 40
- Entretien manuel : 160
- Traitements/fertilisation : 15
- Récolte manuelle : **1800**
- Séchage : **225**

- TOTAL : 2385

Conduite d'une culture

- Objectifs majeurs :
 - Mécanisation de la récolte
 - Mécanisation du séchage
 - Qualité de la production

Le problème de la qualité

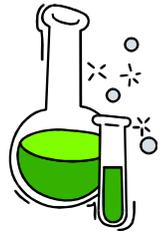
- Quelques critères de qualité
 - Pharmacologique (teneur en principes actifs)
 - Géographique (terroir, date de récolte)
 - Pureté
 - Chimique : herbicides, métaux lourds, radioéléments
 - Bactériologique

- Fraudes
 - Essences frelatées
 - Substitutions : Ginseng/gingembre, gélules...

Cultures *in vitro* pour la production de métabolites II^{aires}

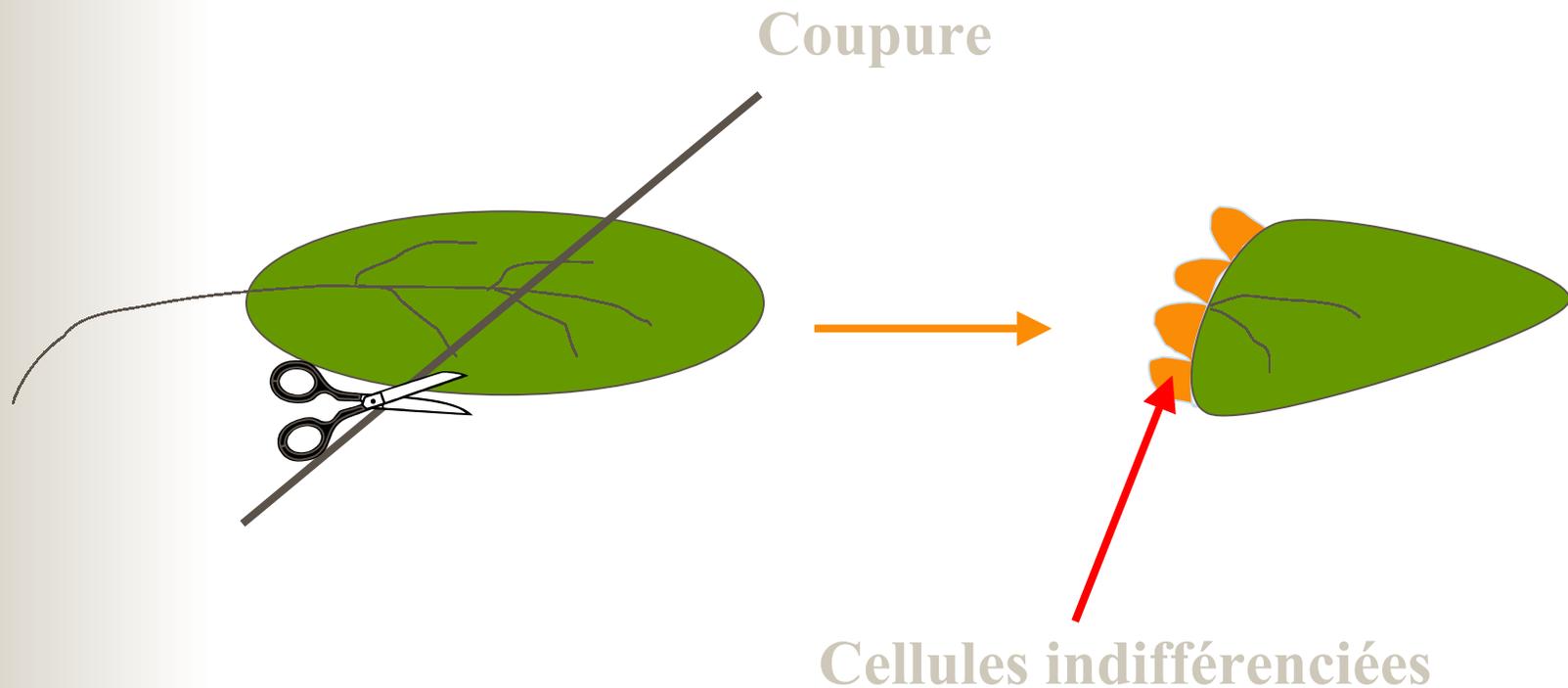
- Quelques rappels
- Principes de base pour la production à partir de suspensions de cellules végétales
 - Croissance, biomasse
 - Production de molécules actives

Quelques rappels



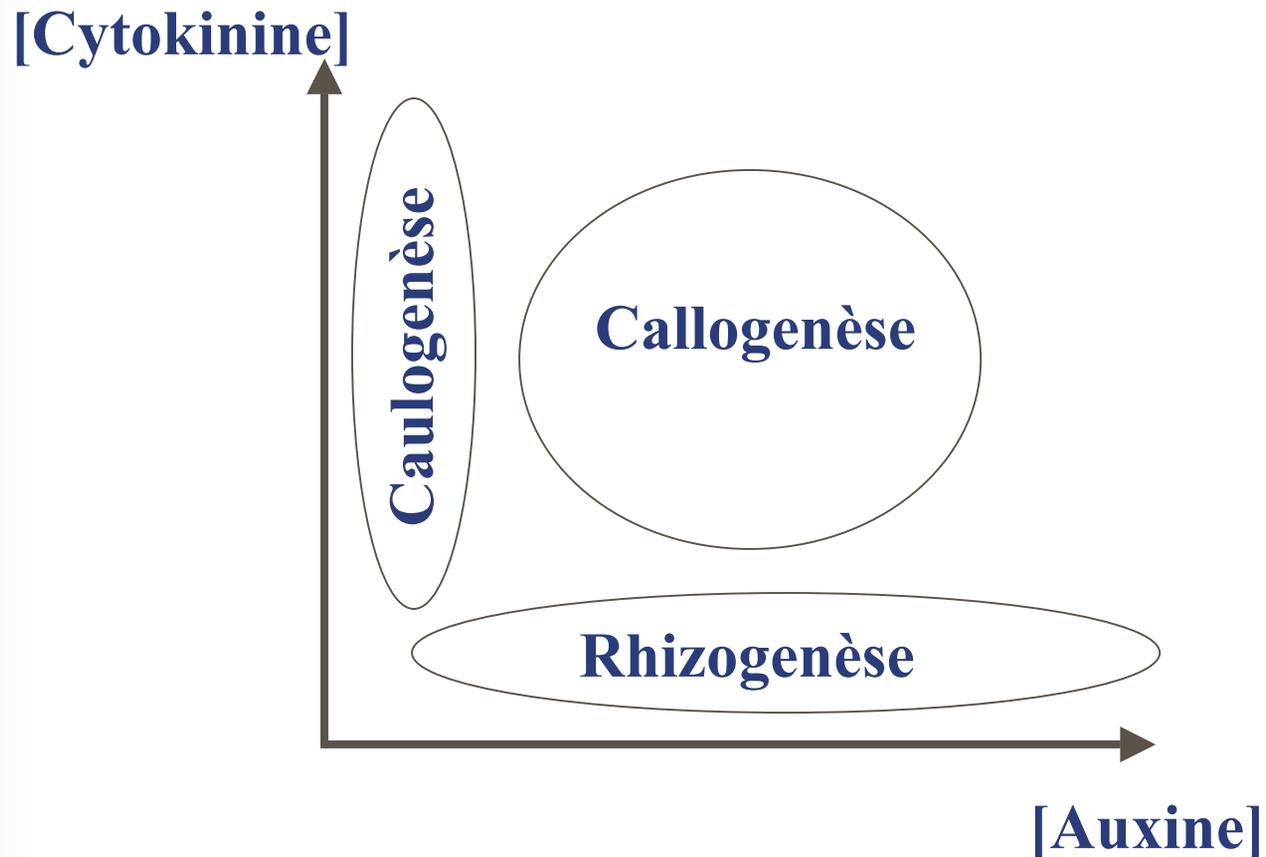
- **Matériel végétal stérile et conditions aseptiques**
- **Milieu de culture adapté (source de carbone, macroéléments, microéléments, vitamines, autres...)**
- **Equilibre hormonal adéquat pour l'organogenèse végétale**
 - e. i. **Auxines (AIA, acide naphthalène acétique, 2. 4. D., ...)**
 - Cytokinines (Zéatine, Kinétine, BAP...)**

Comment obtenir un cal et des cellules indifférenciées ?

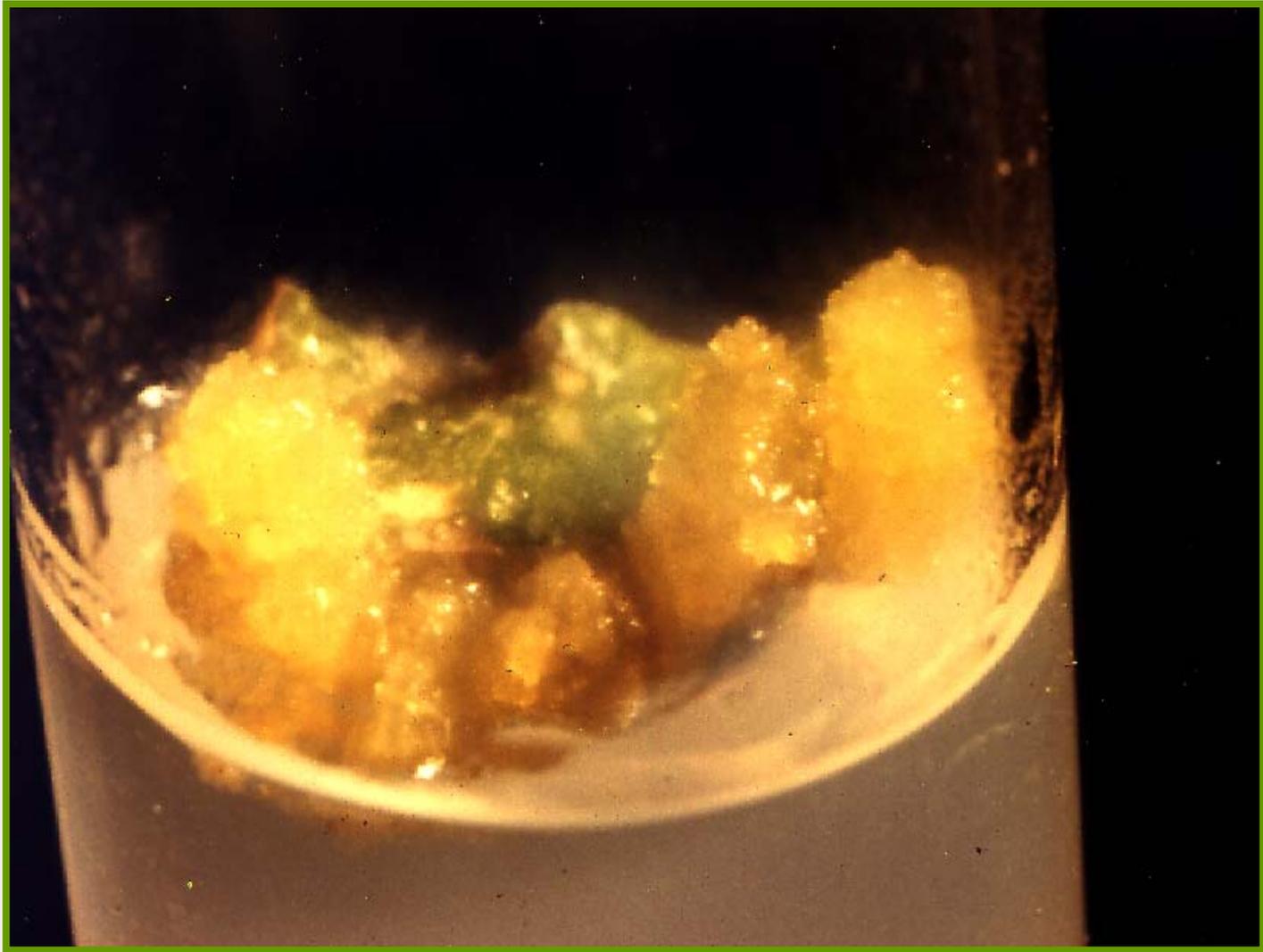


Comment contrôler le développement des végétaux *in vitro* ?

Skoog et Miller (1957)

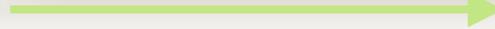




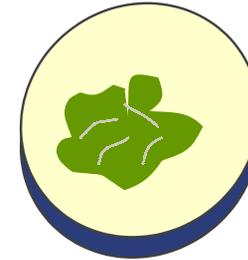




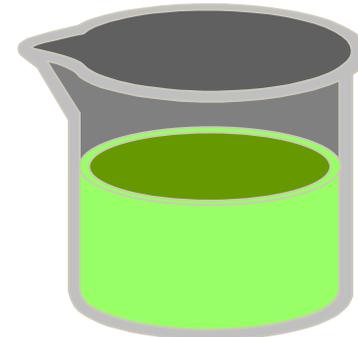
Production in vitro



Milieu Solide



Cal



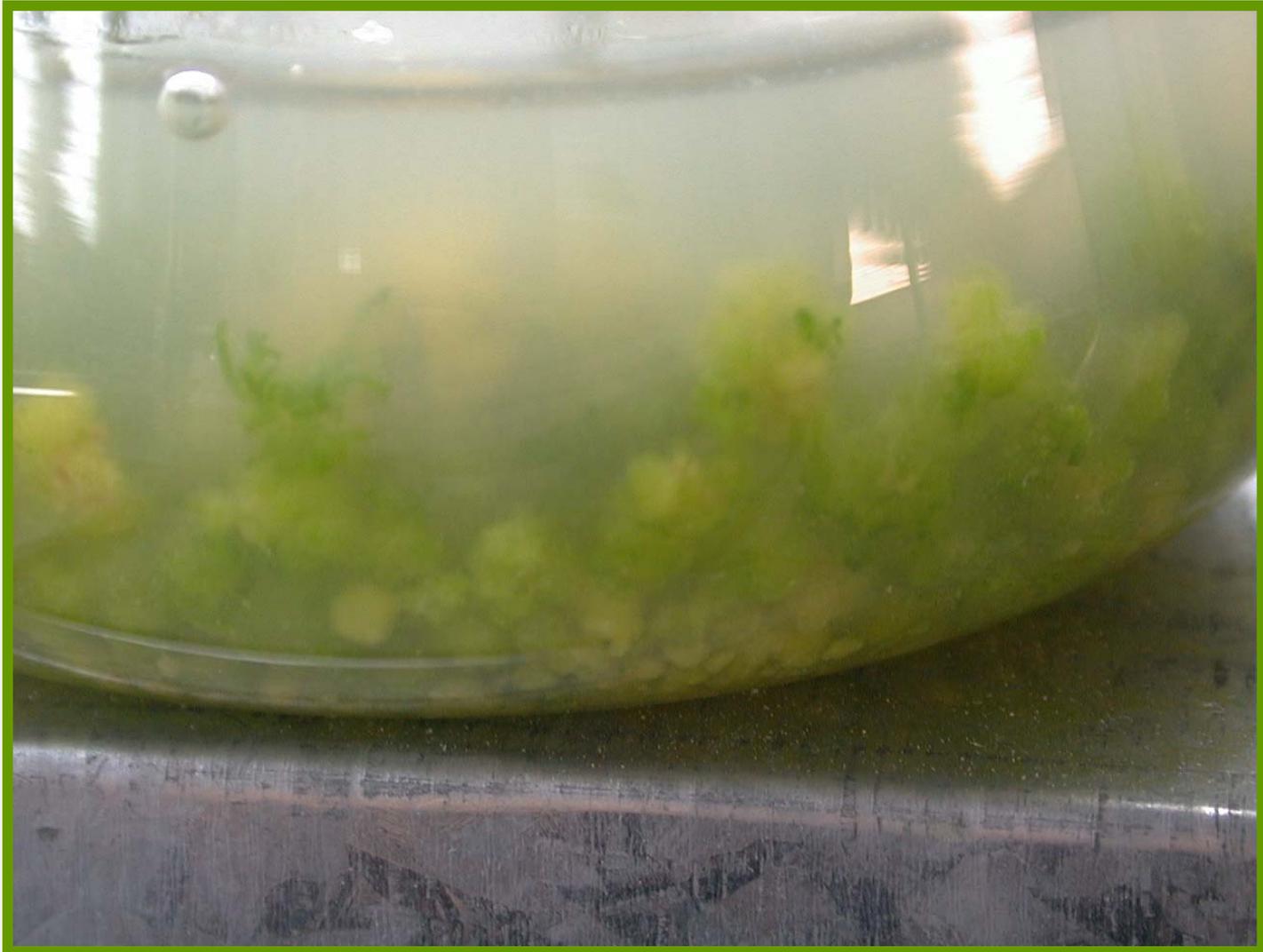
Suspension de cellules

Voie directe en milieu liquide



Obtention de suspensions cellulaires



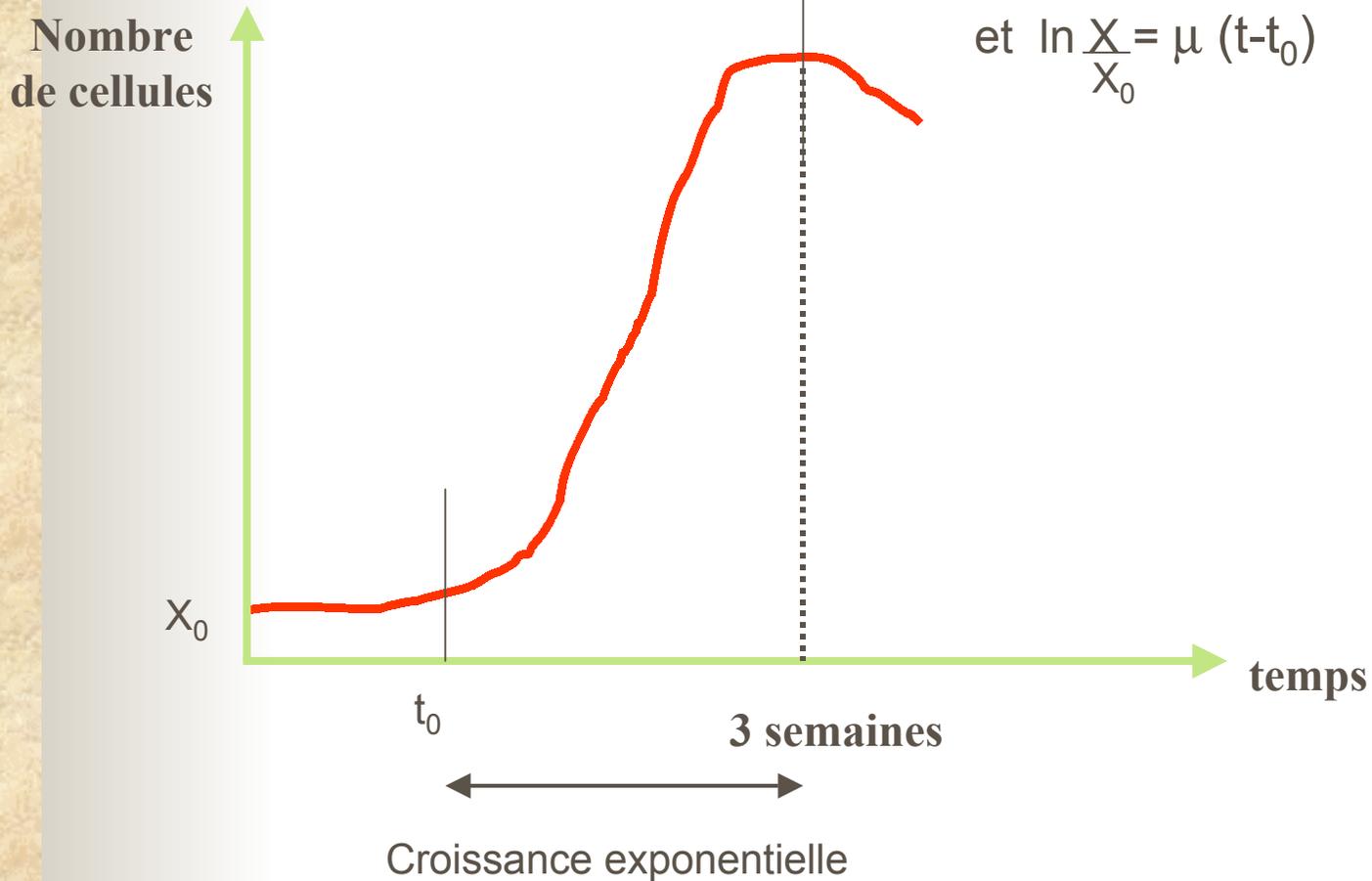


Principes de base

- La plupart des métabolites secondaires sont intracellulaires, intravacuolaires

Quantité produite = **biomasse** produite X **concentration**

• Biomasse



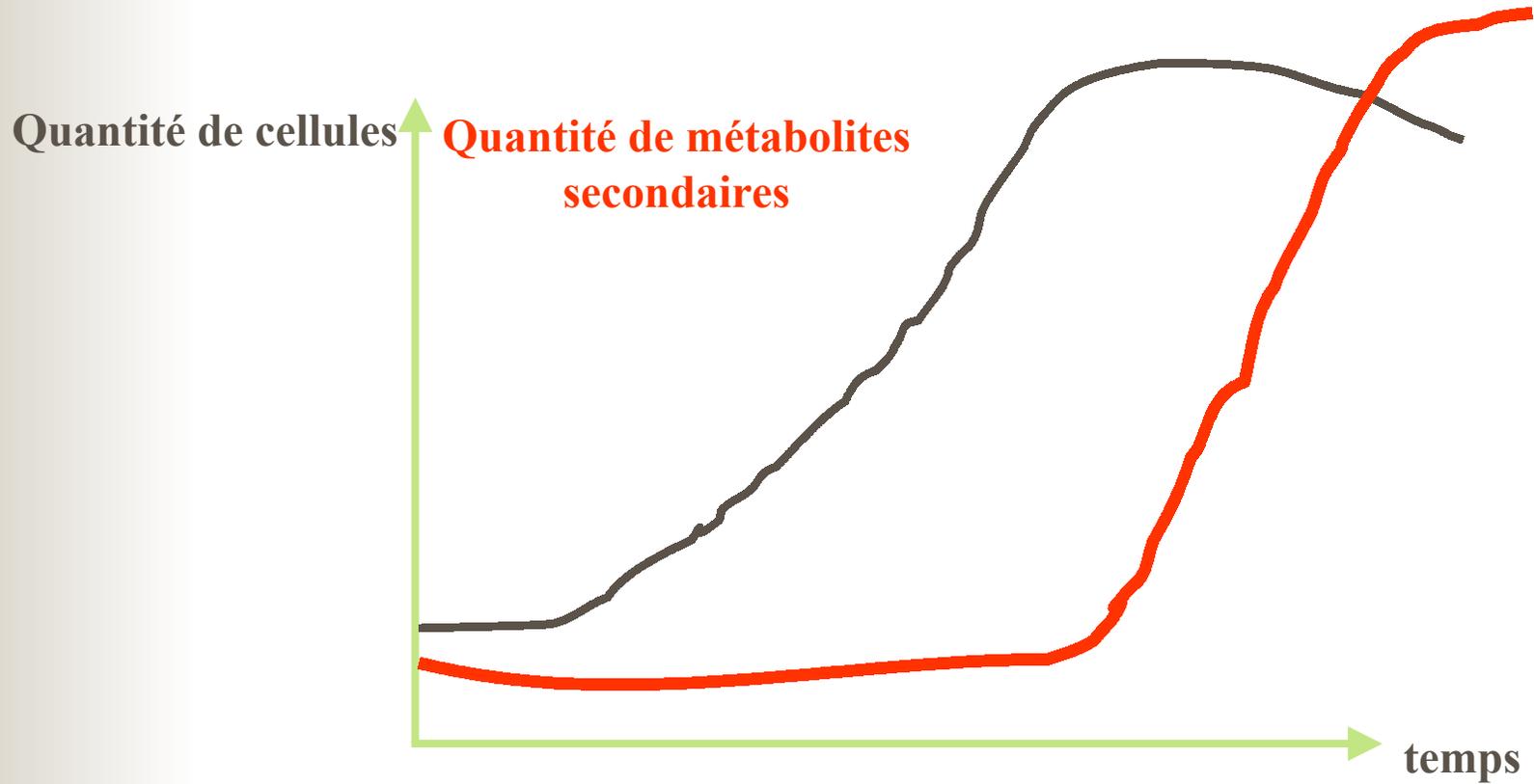
• Biomasse

Quelques facteurs limitants :

- Transferts de masse gaz-liquide (oxygène)
- Sensibilité au cisaillement (≤ 100 t/min)
- Homogénéisation du milieu :
 - Sédimentation
 - Attachement
 - Contact cellules-liquide

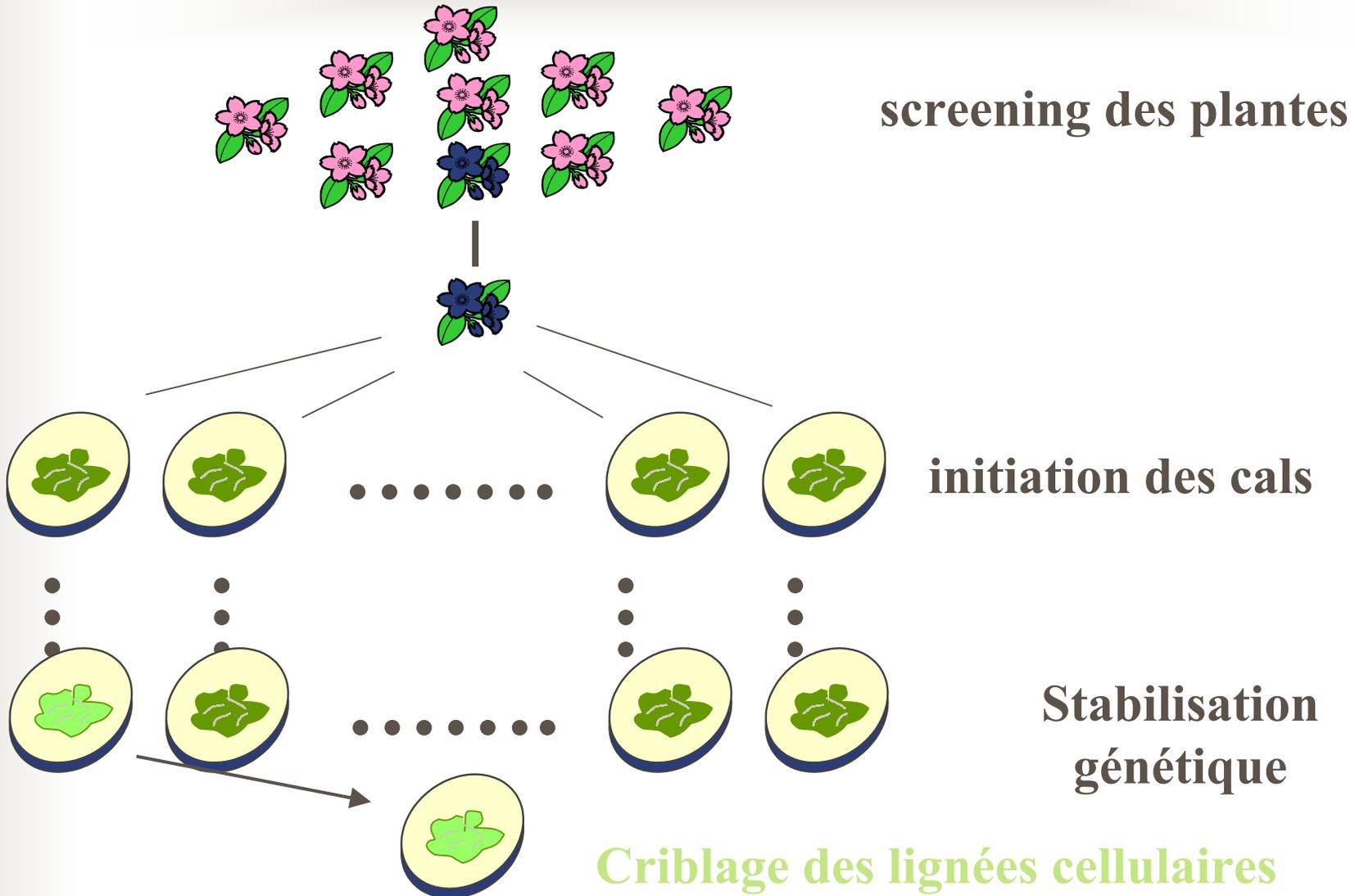
Espèce végétale (cals)	Temps de doublement (en jours)
<i>Nicotiana tabacum</i>	0,63
<i>Nicotiana tabacum</i>	1,7
<i>Catharanthus roseus</i>	2,2
<i>Quassia amara</i>	5,2
<i>Psoralea cinerea</i>	16

• Production de métabolites



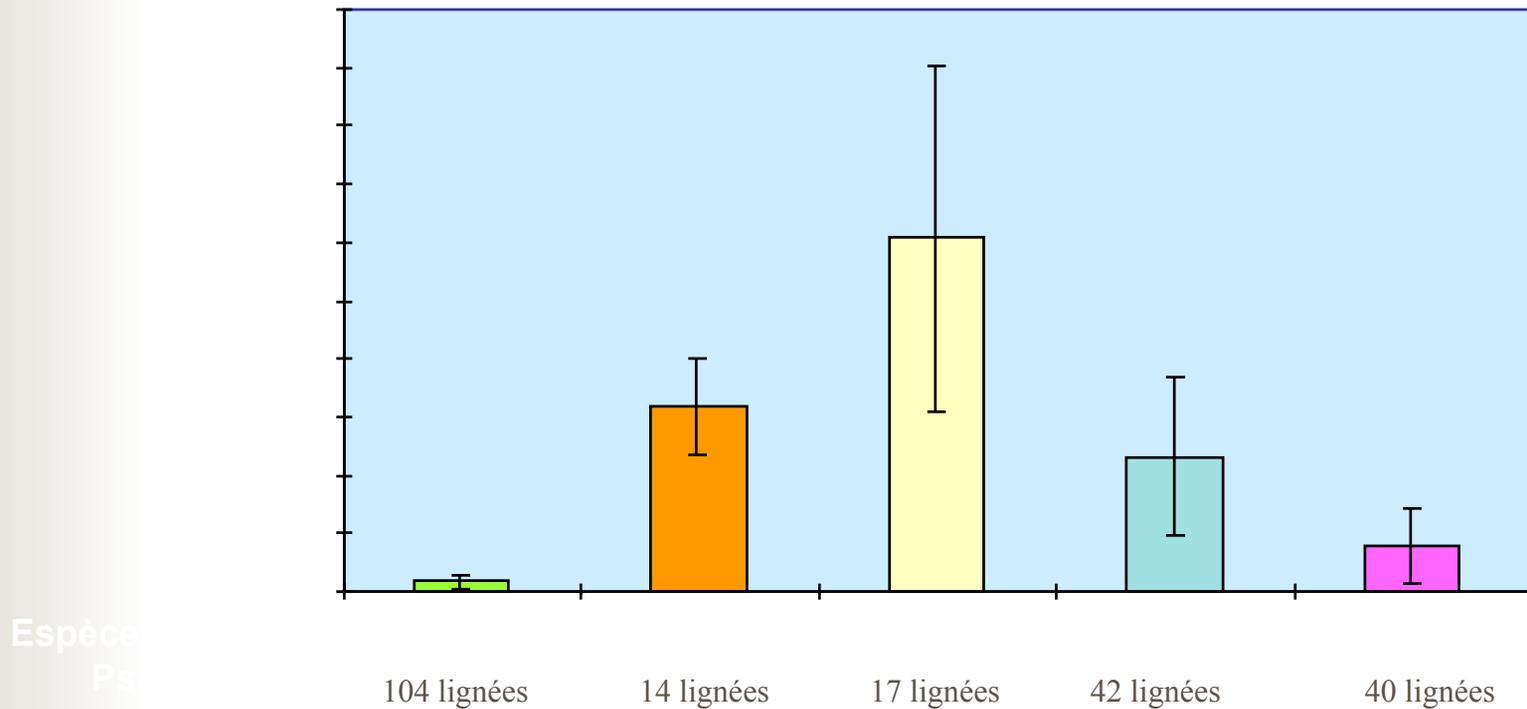
→ Découplage croissance/synthèse de Métabolites li^{aires}

Criblage des plantes et évaluation de la production



- **Production de métabolites**

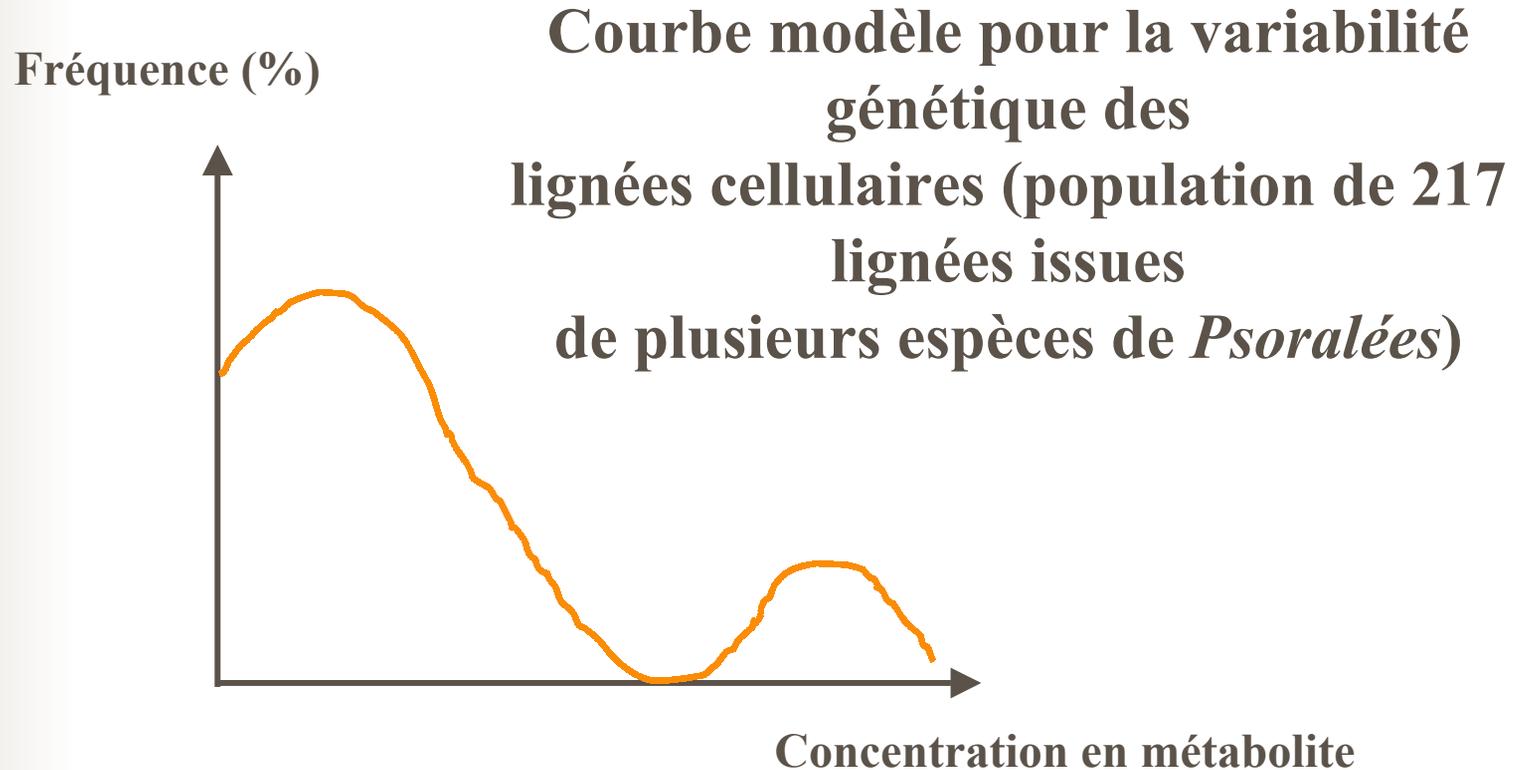
Concentration en isoflavones (Daidzeine)



Criblage des lignées cellulaires

Bouque et al., 1998

- **Production de métabolites**



Bouque 1997

Amélioration de la production de métabolites secondaires

- Elicitation
- Immobilisation de cellules
- Utilisation de précurseurs
- Perméabilisation de cellules

Elicitation

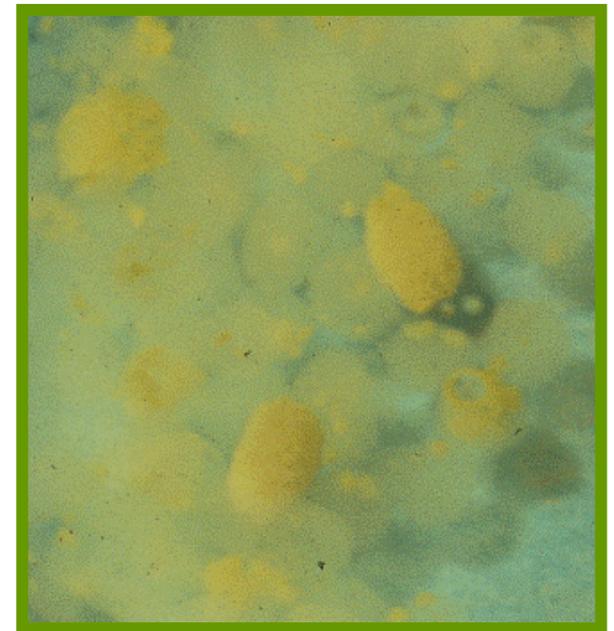
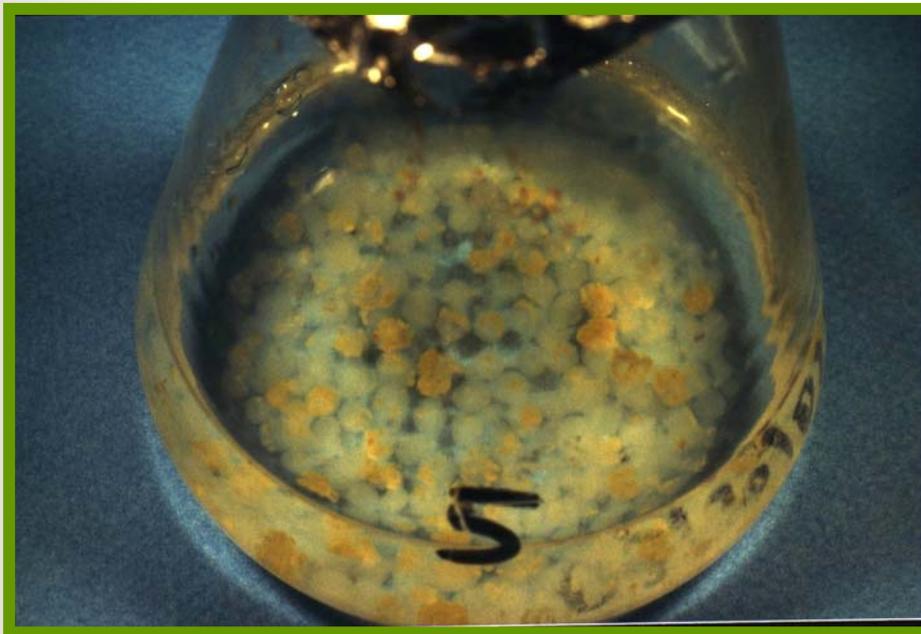
- Pour les produits de type phytoalexines
- Éliciteurs biotiques (champignons inactivés...)
- Éliciteurs abiotiques (UV, froid, minéraux...)



Production X 10, 100, etc...

Immobilisation de cellules

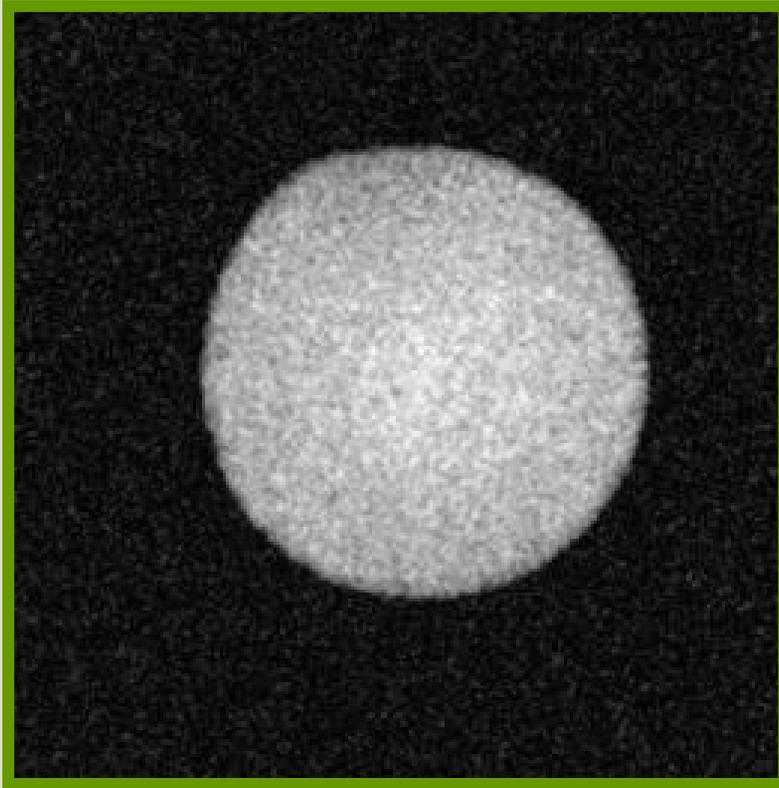
- Encapsulation de cellules dans une matrice de polymère



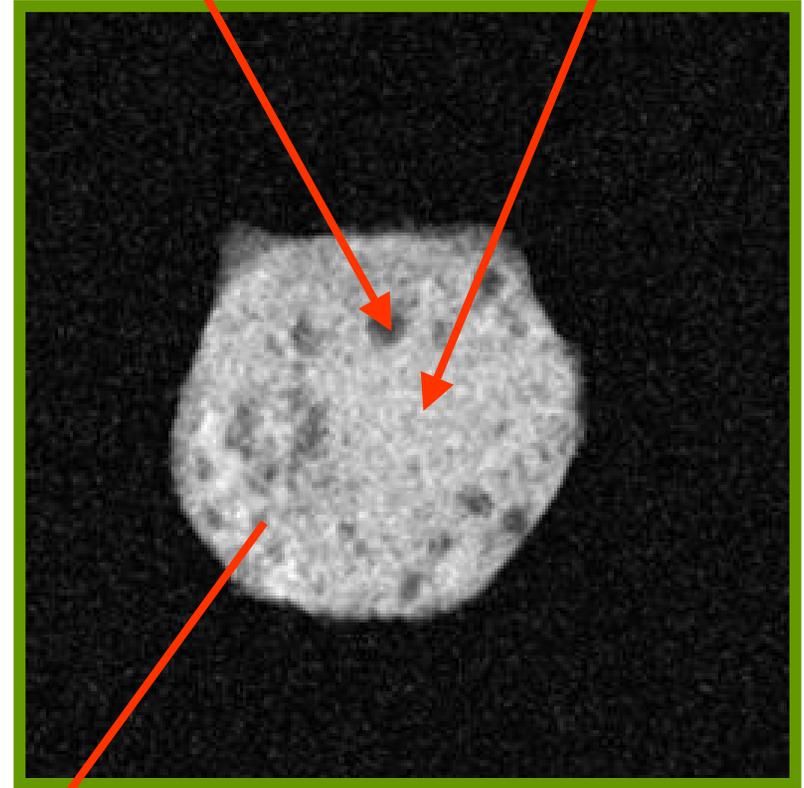
Environnement matriciel
cellules pseudo-organisées

Amélioration in vitro

Possibilité d'ajout
d'éliciteurs



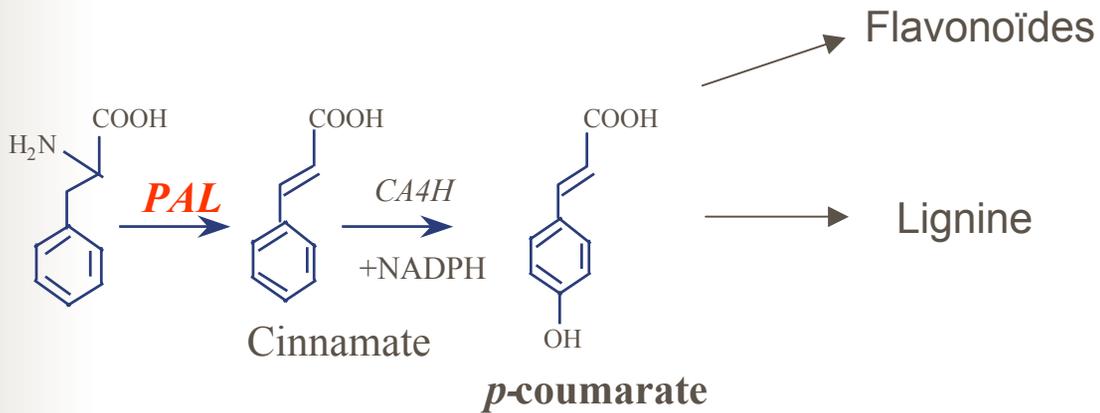
Bille d'alginate vide



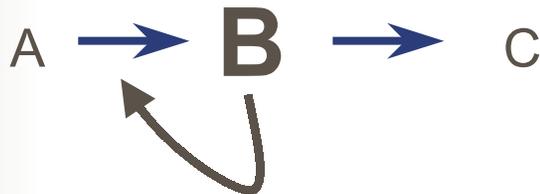
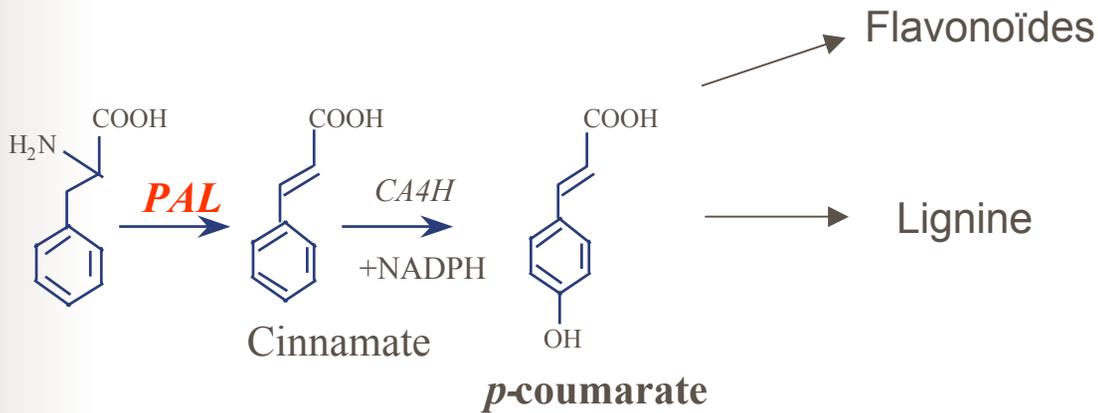
Bille d'alginate avec
cellules encapsulées

Excrétion

Utilisation de précurseurs



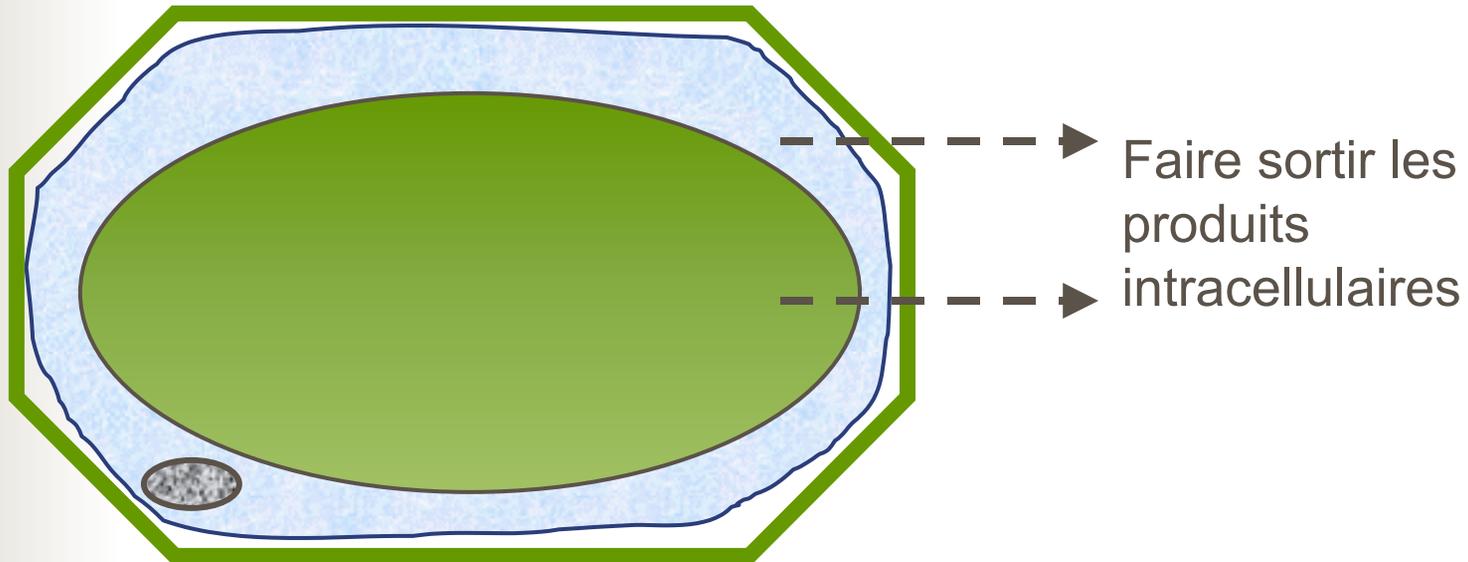
Utilisation de précurseurs



effets feedback

coût B / coût C ?

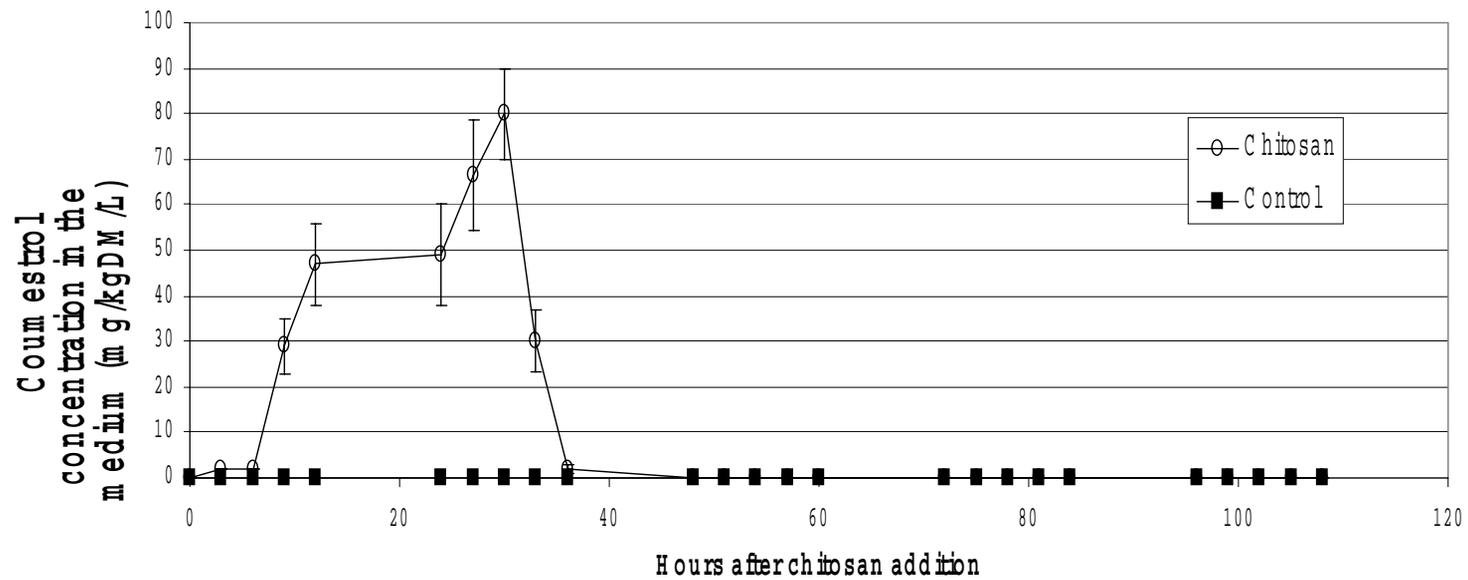
Perméabilisation de cellules



Petite taille moléculaire des métabolites secondaires

⇒ perméabilisation des membranes phospholipidiques

Perméabilisation des cellules

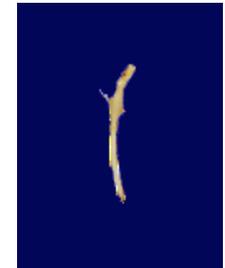
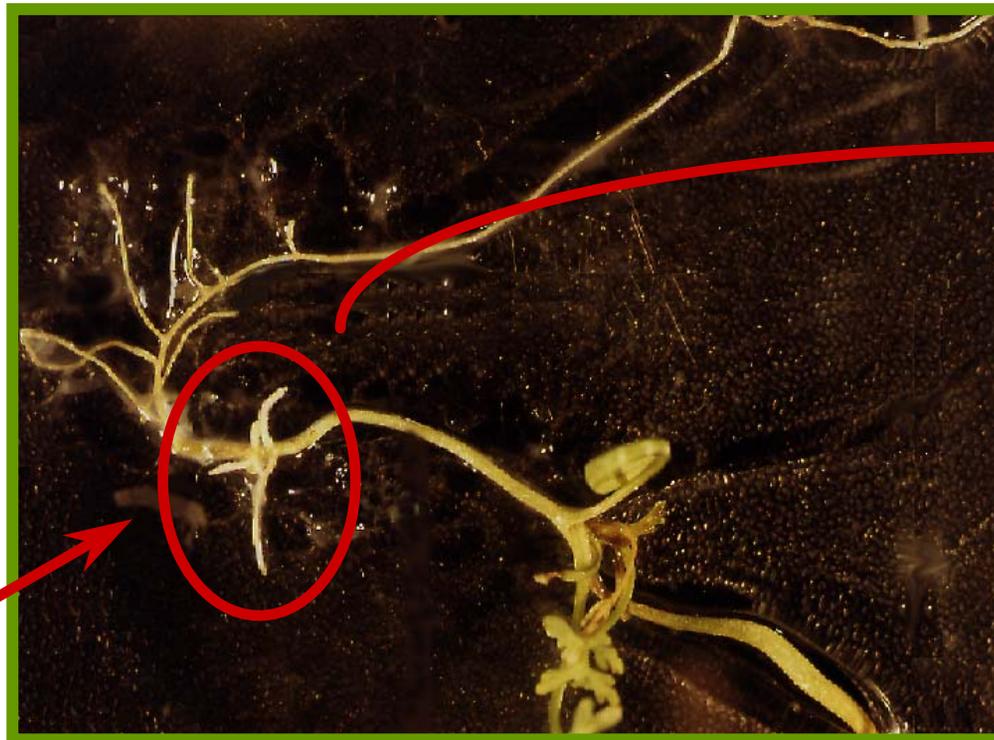


Stratégies alternatives aux suspensions cellulaires

- Racines transformées (hairy roots)
 - Croissance
 - Production de molécules
 - Stabilité génétique
- Cultures de tiges feuillées
- Co-cultures d'organes et/ou cellules

Hairy roots

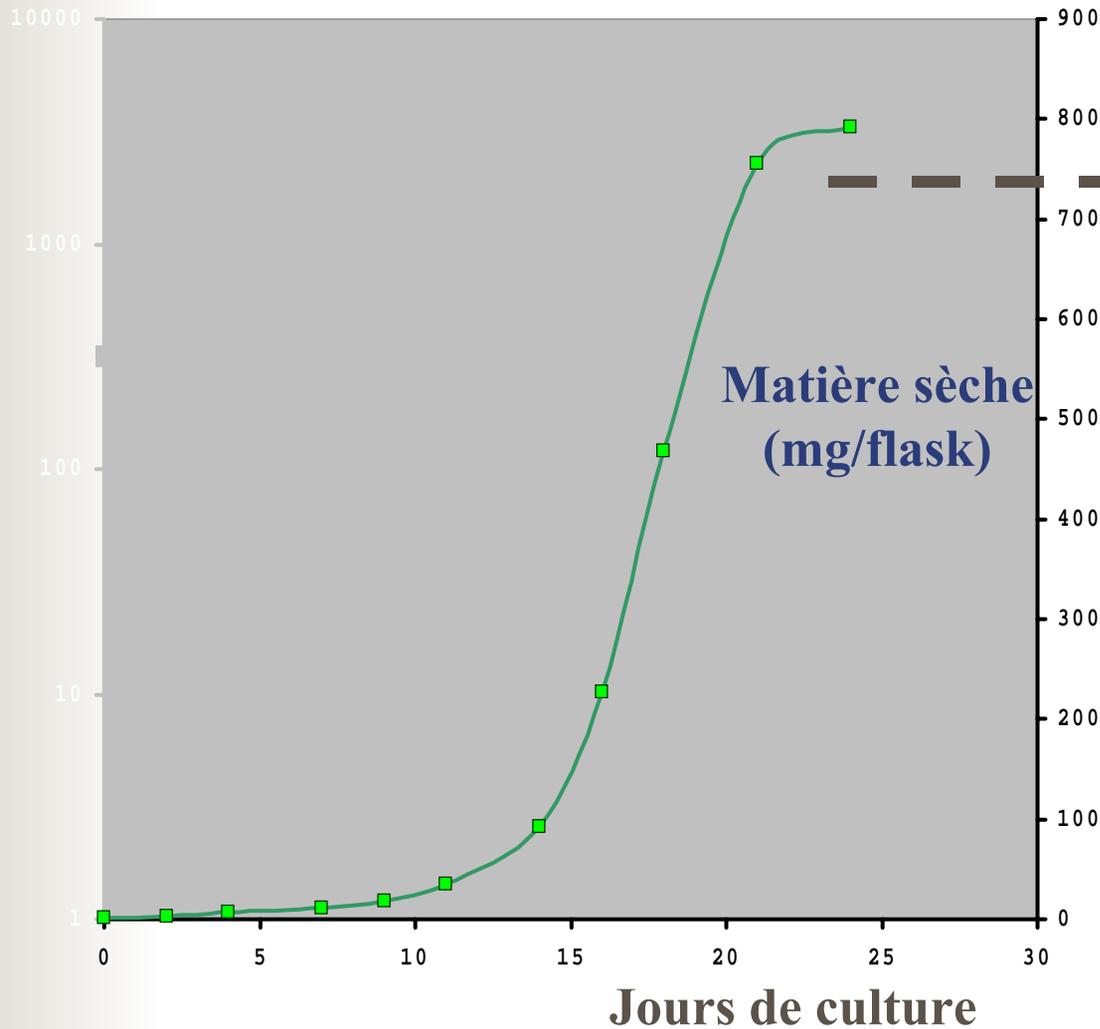
Principe de la culture





Hairy roots de *Psoralea lachnostachys*

La croissance



Modèle de croissance exponentiel,

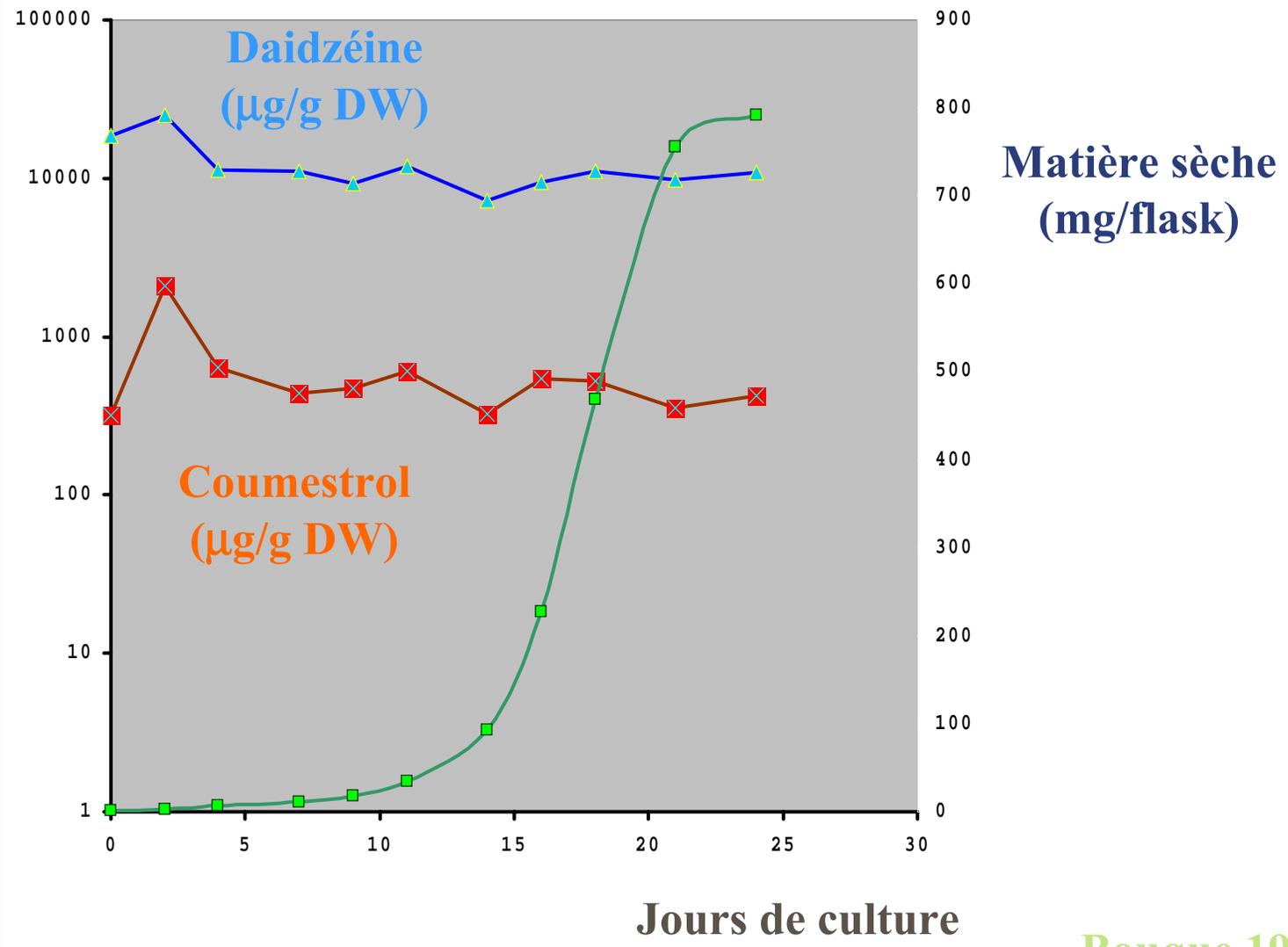
Pourtant la croissance racinaire est linéaire

(Bouque et al., 1999)

La croissance

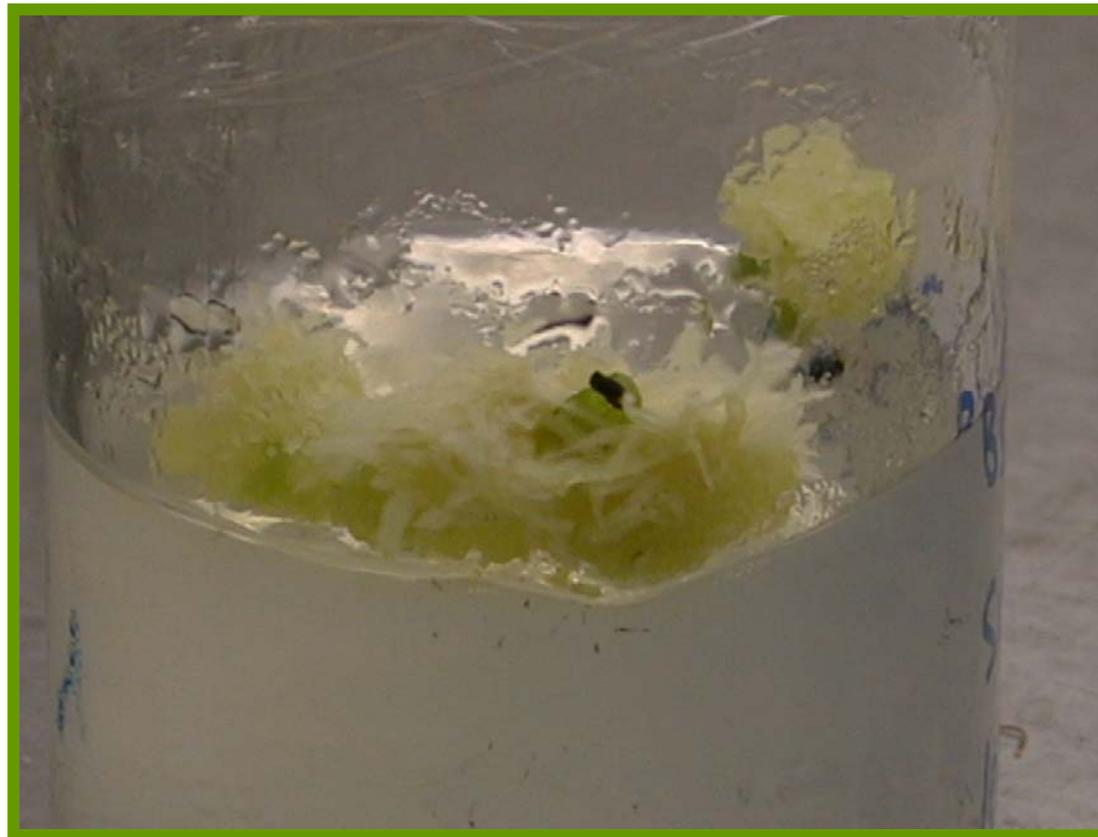


Production de métabolites secondaires



Stabilité génétique

- Bonne
- Risques de dérive sans pression de sélection

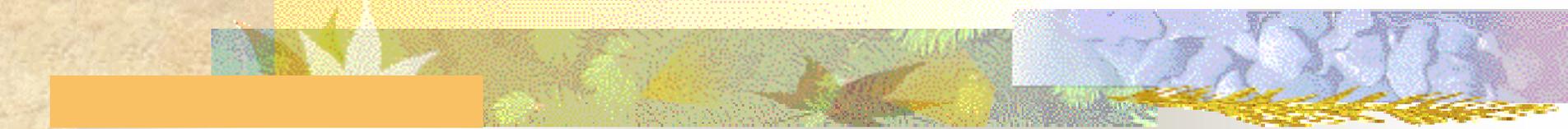


Cultures de tiges feuillées

- Shoots
- Shooty teratoma (*Agrobacterium tumefaciens*)



Tiges feuillées de *Ruta graveolens*



Production à un stade industriel

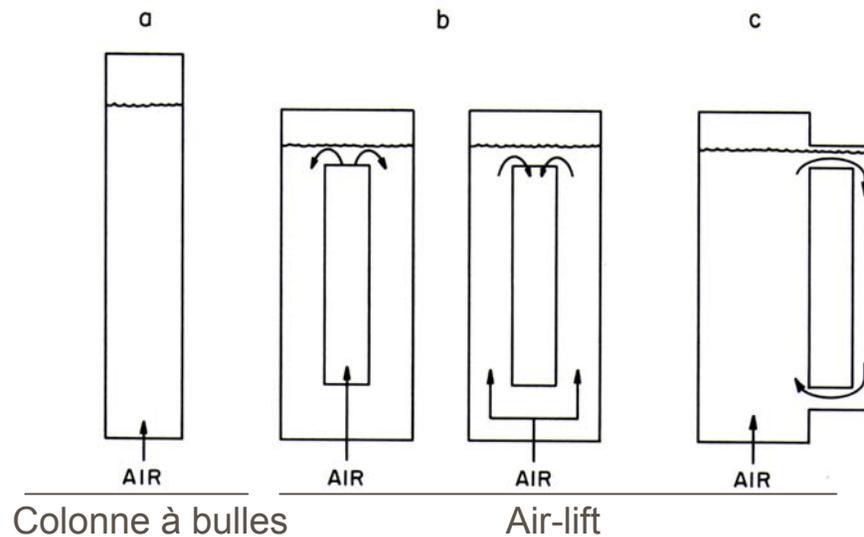
- Les facteurs critiques de la montée en échelle
 - Transferts de masses
 - Sensibilité au cisaillement
 - Homogénéisation du milieu
- Les bioréacteurs
 - Procédés de fermentation
 - exemple

Montée en échelle (scale up)

- Transfert de masse (oxygène)
 - Demande 10 X plus faible que pour des microorganismes

Montée en échelle (scale up)

- Sensibilité au cisaillement (shear stress)
 - Agitation pneumatique



Montée en échelle (scale up)

- Homogénéisation
 - Sédimentation cellulaire
 - PO_2 limitante dans les zones de sédimentation

Montée en échelle (scale up)

■ Facteurs critiques

	Agitation mécanique	Colonne à bulles	Air-lift
Transfert d'oxygène	+++	++	+
Faible cisaillement	+	++	+++
Homogénéisation du milieu	+++	+	++

Les types de bioréacteurs

- Procédés de fermentation
 - Procédés discontinus : batch / fed batch
 - Procédés continus : chemostat / perfusion

- exemples



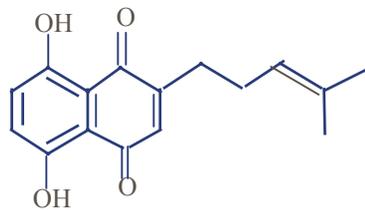
Fermenteur pilote

Bubble flask
« maison »

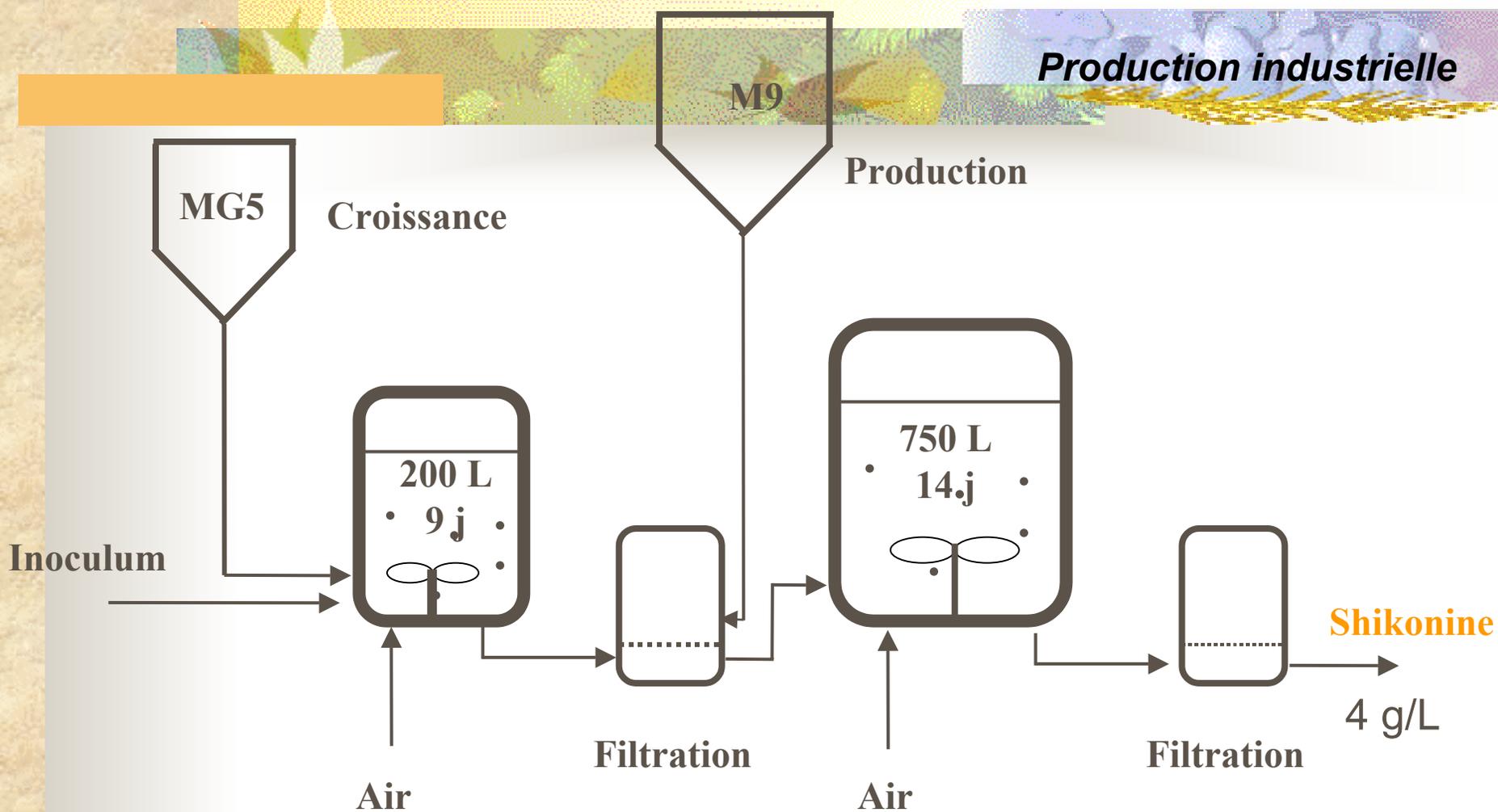


Les types de bioréacteurs

■ Le procédé à shikonine



- Colorant
- Actif dermatologique



Procédé de production de shikonine

Tabata et al.
Mitsui Corp.

Conclusions

- Culture *in vitro* ou culture au champ ?

Espèces	Produit	Ratio <i>in vitro/in planta</i>
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotine	2
<i>Coleus blumei</i>	Ac. Rosmarinic	5
<i>Lithospermum</i>	Shikonine	5
<i>Papaver somniferum</i>	Morphine	<<1
<i>Atropa belladonna</i>	Atropine	<<1
<i>Catharanthus roseus</i>	Vinblastine	0

Production industrielle

Société	Produit	Plante	Année
Japan Tobacco	Ubiquinone	<i>N. tabacum</i>	1976
Svoboda Moscou	Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	1979
Mitsui Petrochem	Shikonine	<i>Lithospermum</i>	1983
Nitto Denko	Ginseng	<i>P. ginseng</i>	1985
Natterdam All.	Ac. Rosm.	<i>Coleus blumei</i>	1986
Escargenics USA	Vanilline	???	1989
Bethesda Research	Phosphodiesterase	???	1985

Coût minimum pour la production en bioréacteur : 1500 € /kg

Génie métabolique des végétaux



Génie métabolique : définition

- « It's the improvement of cellular activities by manipulation of enzymatic, transport, and regulatory functions of the cell with the use of recombinant DNA technology »
(J.E. Bailey, 1991)

Génie métabolique : notions

- Approche multidisciplinaire
 - Biologie moléculaire (gènes codant des activités enzymatiques limitantes)
 - Biochimie (voies de biosynthèse)
 - Biotechnologie (cultures cellulaires, bioréacteurs)
- Objectif : contrôler le métabolisme des cellules pour la production de composés valorisables

Génie métabolique : notions

- Les technologies d'ADN recombinant sont un outil essentiel pour le génie métabolique mais ne sont pas tout...

Génie métabolique : notions

- L' expression d'un gène hétérologue ne suffit pas pour obtenir une protéine fonctionnelle :
 - Proteolyse (gènes antisens)
 - Competitive pathways (gènes antisens)
 - postmaturation, structure 3D
 - localisation cellulaire (channeling : membrane associated multienzyme complexes)

Intérêt du modèle végétal

- Production de composés « homologues » (métabolites secondaires synthétisés naturellement par les végétaux)



- Production de composés « hétérologues » (non synthétisés naturellement par les végétaux)

Composés homologues : comment produire ?

Production difficile

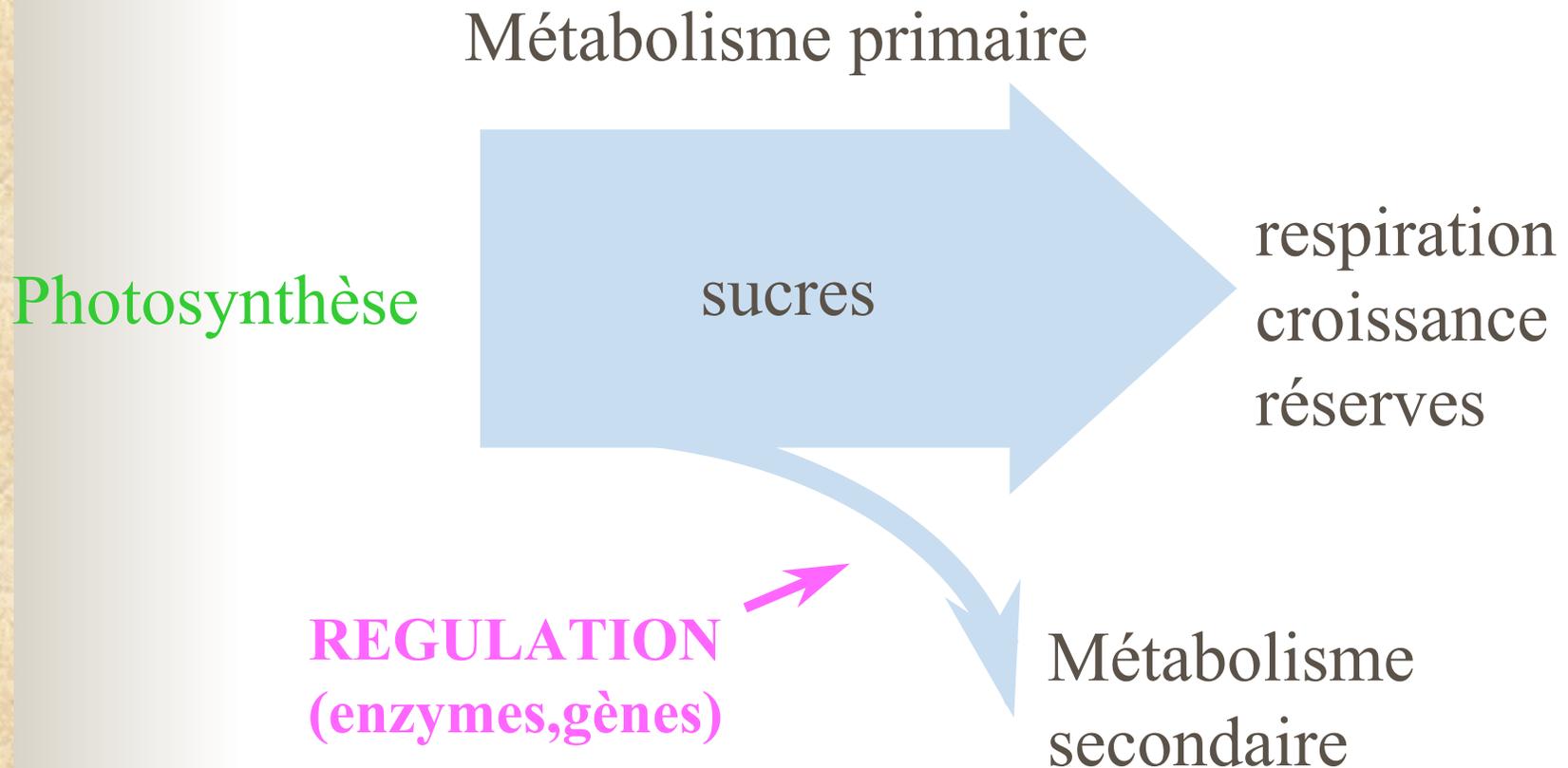
Ex : pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*)

Alcaloïdes indoliques : anticancéreux
1 M \$ /kg

Production faible, *in planta* ou *in vitro*

Possibilité de produire plus en modifiant génétiquement les espèces végétales correspondantes ?

Liaisons métabolisme primaire & secondaire

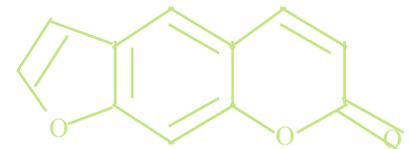


Modification des voies de biosynthèse

Cas de la voie des phénylpropanoïdes

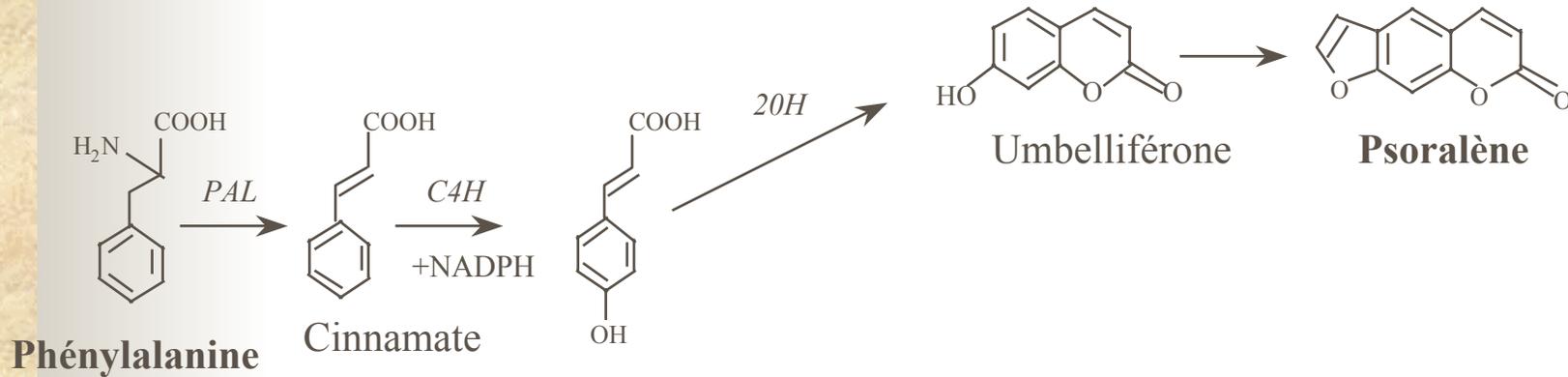
Comme à tous les végétaux supérieurs car permet la synthèse de la lignine

Métabolite d'intérêt = psoralènes

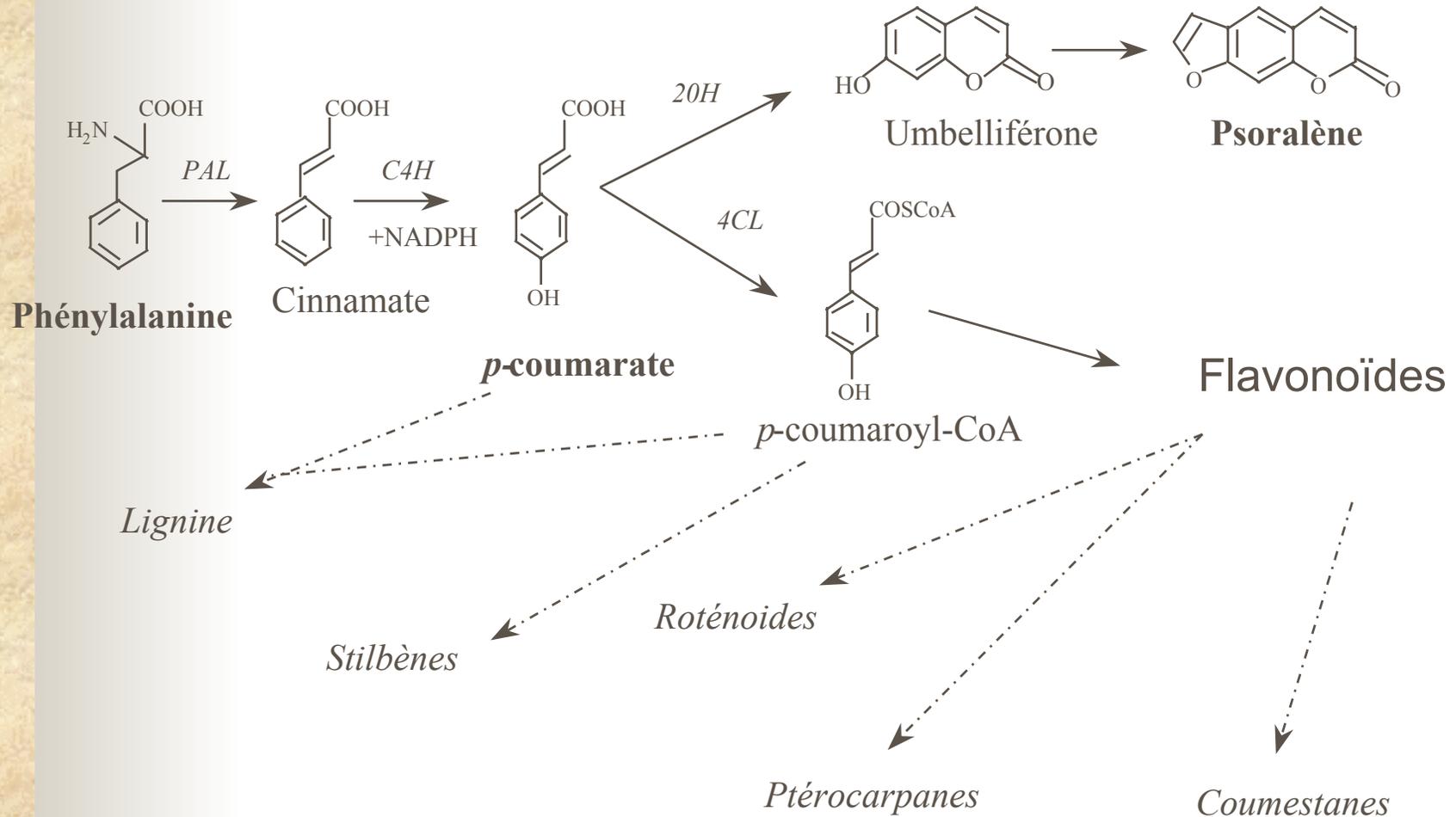


Psoralène

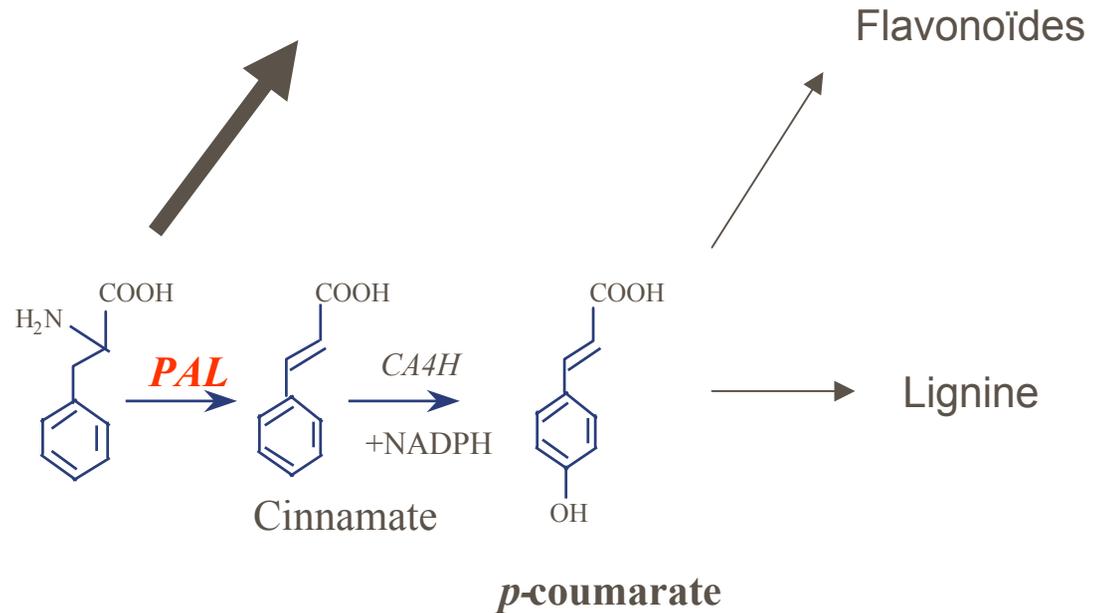
Cas de la voie des furocoumarines



Cas de la voie des furocoumarines

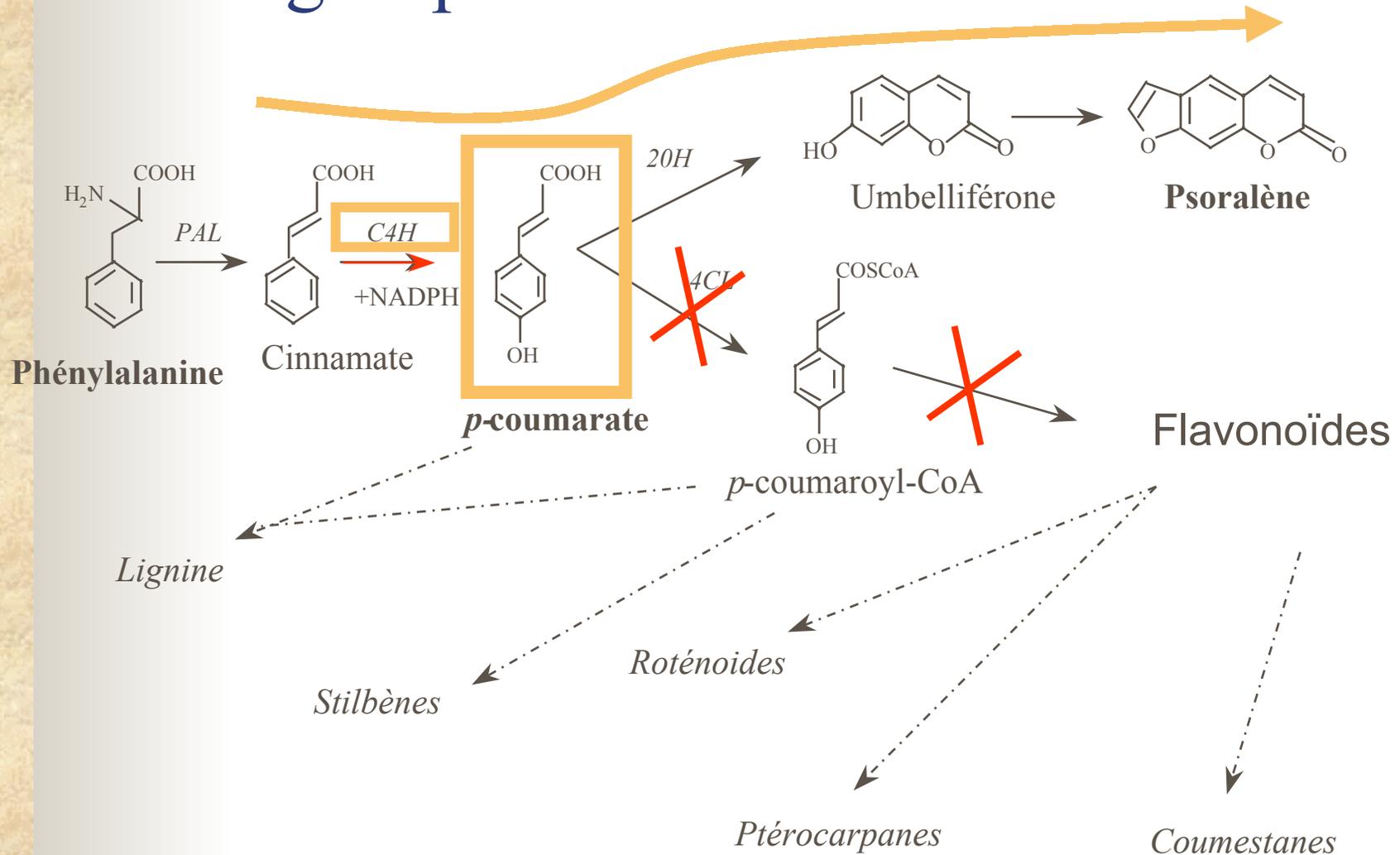


Métabolisme primaire



Liaisons métabolisme primaire et secondaire

stratégies possibles



Exemple de la cinnamate 4 hydroxylase (C4H)



C4H = monooxygénase de la classe P-450

Localisation subcellulaire : membranaire

L 'expression des gènes codant pour la C4H est fortement régulée dans le temps de l 'espace (gène reporteur GUS dans les cellules qui lignifient)

Eliciteurs : blessure, ions métalliques

Modification génétique de l'activité C4H, par introduction du gène C4H de la luzerne (sens ou antisens) chez le tabac (Sewalt et al., 1997)

Sens : activité enzymatique X 2

Pas d'effet sur le contenu en lignine, sur la qualité de la lignine

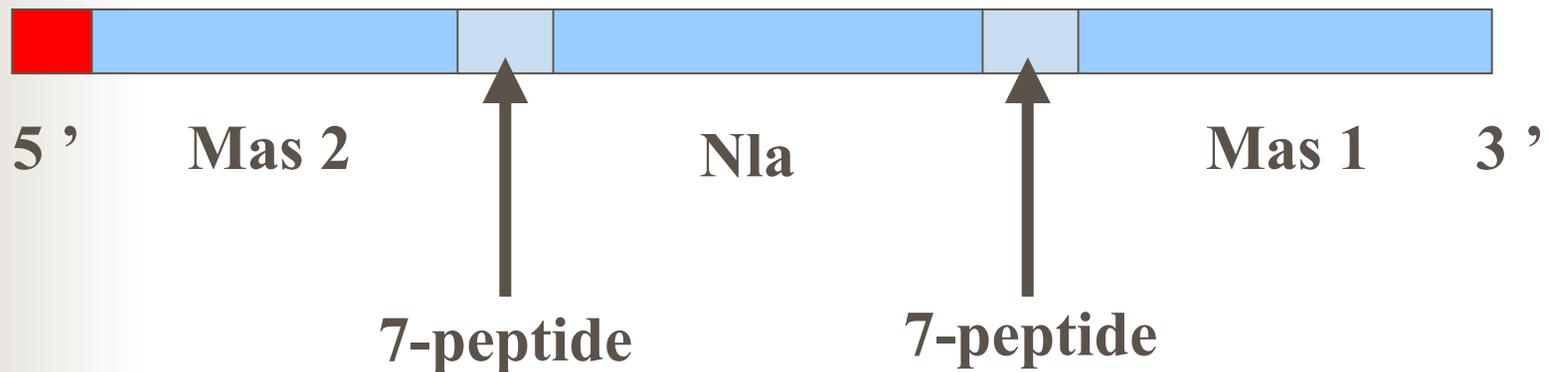
Antisens : activité enzymatique - 80%

**Contenu en lignine/5
qualité de lignine différente**

Problème de l'expression coordonnée de plusieurs gènes

Première construction polygénique pour agir sur le métabolisme secondaire (Beck von Bodman et al., 1995)

3 gènes eucaryotiques exprimés par un seul promoteur végétal et couplés de manière translationnelle



Conclusions « composés homologues »

L'approche « génie métabolique » est complexe mais constitue une voie d'avenir

Composés hétérologues

La plante = bioréacteur, hôte de gènes « exogènes »,
neométabolisme

Intérêts du modèle plante : culture au champ peu coûteuse,
absence de risque de contamination plante/Homme

Inconvénients : problème de la maturation des protéines,
compétition avec d'autres organismes hôtes (levures...),
acceptation de la plante transgénique
comme source de médicament ?

1/ Planticorps

- **Anti - herpes (HSV) de la souris (produit chez le soja)**
- **Anti Streptococcus mutans (produit chez le tabac)**
Protection contre la carie

2/ Plantigènes

- **Vaccins oraux, à partir de végétaux comestibles plates hôtes : PdT, bananes...**

3/ Autres protéines thérapeutiques

- **Lipase gastrique (gène du chien, mais transgénique, mucoviscidose) Meristem Therapeutic (limagrain-RP)**



vintegrale.rm

Conclusion « composés hétérologues »

**Conclusion : fonctionne,
plusieurs produits en développement**

**Mais, si pas d 'acceptation des plantes transgéniques
en Europe ?**