ÉTUDE DE LA SYNTHÈSE DU RESVÉRATROL ET DE SES DÉRIVÉS (VINIFÉRINES) PAR DES SUSPENSIONS DE CELLULES DE VIGNE ET OPTIMISATION DE LA PRODUCTION EN BIORÉACTEUR[1]

par Thomas **Chastang**

1. Introduction

Le resvératrol et ses dérivés (notamment les viniférines) sont présents dans de nombreuses plantes aussi variées que des fruits rouges, les arachides, certains pins, la renouée du Japon ou encore la vigne. Leur synthèse représente pour les plantes un moyen de défense naturel contre les agressions. En effet, celles-ci les produisent généralement lorsqu'elles détectent la présence d'un champignon pathogène (mildiou, oïdium, pourriture grise…). Ce processus naturel, appelé élicitation (stimulation des défenses de la plante), peut être reproduit en laboratoire, ce qui a permis une étude plus approfondie de la production du resvératrol.

Par son pouvoir anti-oxydant, le resvératrol a éveillé de nombreux intérêts depuis quelques décennies. En effet, sa découverte dans le vin a contribué à porter un regard nouveau sur la molécule [1]. 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* » [2, 3, 4, 5, 6]. 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. L'obtention du resvératrol par des cellules de vigne, cultivées en suspension dans un milieu nutritif liquide, s'est révélé être un moyen particulièrement avantageux pour cela.

Le travail présenté ici s'est intéressé à cette dernière solution. Il a commencé par une étude des cellules de vigne cultivées en fioles. Chaque fiole contient 100 millilitres de suspension cellulaire, échelle qui est habituellement utilisée en laboratoire. Le choix de l'éliciteur (molécule utilisée pour déclencher la synthèse) s'est porté sur le méthyljasmonate. Nous avons également eu l'occasion d'examiner l'influence d'un autre éliciteur, la cyclodextrine.

L'étude a ensuite été transposée à l'échelle de la culture en bioréacteur de 5 litres (cuve en verre fermée hermétiquement et maintenue stérile), premier pas vers la bioproduction. Ceci a permis un suivi détaillé, sur une plus longue durée (800 heures = 33 jours) de la croissance de la biomasse et de la production du resvératrol.

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.

---

[1] Thèse soutenue le 24-03-2014 à Châtenay-Malabry, École centrale de Paris , dans le cadre de École doctorale Sciences pour l'Ingénieur (École Centrale Paris) , en partenariat avec Laboratoire de génie des procédés et matériaux (Châtenay-Malabry, Hauts de Seine) (laboratoire).

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

2. Étude en fioles (100 millilitres de suspension)

Le travail accompli a d'abord consisté à étudier les cellules de vigne en les cultivant en suspension dans un milieu nutritif liquide, dans des fioles contenant 100 millilitres de suspension. Cette étude a eu pour objectif de mieux connaître le comportement de deux souches de vigne (41B et Concord) en faisant varier différents paramètres.

Les premiers essais en fiole ont concerné la variété 41B, 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 cyclodextrine. Cette dernière a été testée seule, afin de comparer son influence à celle du méthyljasmonate seul. La cyclodextrine a ensuite été utilisée combinée au méthyljasmonate (double élicitation).

L'élicitation par le méthyljasmonate seul donne des concentrations relativement faibles de resvératrol (4,9 milligrammes par litre en moyenne). En revanche, la cyclodextrine permet d'obtenir des concentrations près de 25 fois plus élevées (120 milligrammes par litre en moyenne). Enfin, la double élicitation donne des concentrations record (plus de 1,7 gramme par litre en moyenne et plus de 2,5 grammes par litre sur certains essais). Les mêmes essais ont été menés sur la souche Concord. Les résultats obtenus sur cette souche confirment ce qui précède.

Puisque la variété Concord produit du resvératrol dans les mêmes proportions que la variété 41B, nous avons cherché à l'étudier plus précisément. Voici, ci-après, la caractérisation de sa croissance en fiole. Comme les cellules suivent une croissance exponentielle, la biomasse est multipliée par deux au bout d'une période appelée temps de doublement. Ce temps de doublement a été déterminé (Figure 1A, en échelle semi logarithmique). Il est de 3,1 jours. La croissance s'arrête lorsque la biomasse (masse fraîche) atteint 428 grammes par litre ; cette phase stationnaire est due à l'épuisement du sucre dans le milieu de culture.

1A **1B**

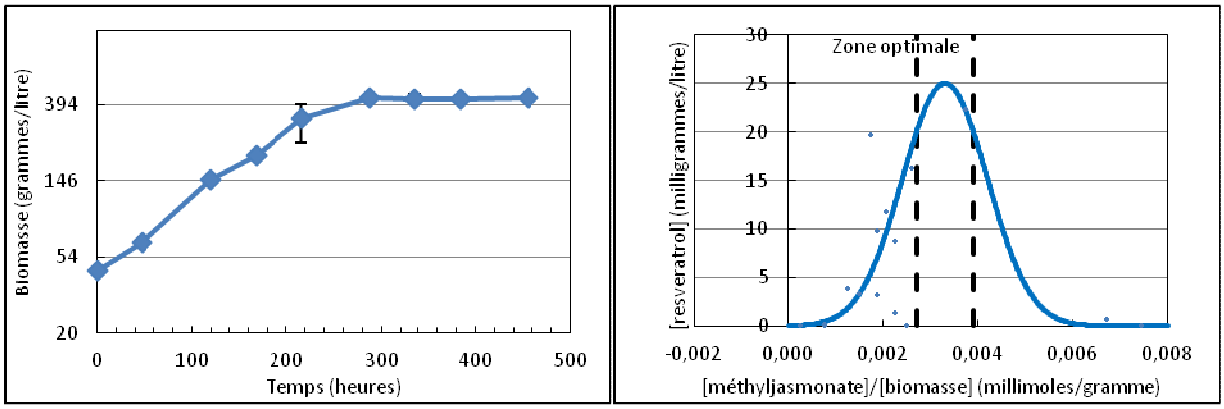

Figure 1A : Croissance des cellules Concord, en fiole, représentation semi-logarithmique.

Figure 1B : Influence du rapport [méthyljasmonate]/[biomasse] sur la production de resvératrol.

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. Les paramètres que l'on peut faire varier sont les suivants : la concentration de la biomasse dans la suspension, le délai entre la mise en culture et l'élicitation au méthyljasmonate (phase de croissance sans éliciteur), la concentration en méthyljasmonate et enfin la durée entre l'élicitation au méthyljasmonate et l'arrêt de l'expérience.

Un paramètre est ressorti comme déterminant : c'est le rapport entre les concentrations de méthyljasmonate et de biomasse (noté [méthyljasmonate] / [biomasse]). La figure 1B exprime la valeur de la concentration de resvératrol en fonction de ce rapport.

On peut ainsi déterminer une zone de rapport optimal [méthyljasmonate] / [biomasse] pour la production de resvératrol qui se trouve entre 0,003 et 0,004 millimoles/gramme.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

L'autre aspect qui ressort de l'étude des suspensions en fioles est la grande production de resvératrol consécutive à l'action de la cyclodextrine. Celle-ci est encore plus marquée dans le cas de la double élicitation (cyclodextrine – méthyljasmonate).

Concernant la variété de vigne utilisée pour produire le resvératrol, notre choix s'est porté sur la souche Concord qui a une croissance rapide et se montre résistante au stress mécanique. Elle est donc particulièrement bien adaptée pour l'étude en bioréacteur qui est abordée dans ce qui suit.

3. Étude en bioréacteur de 5 litres

Après son étude en fioles (100 millilitres), la culture des cellules de la variété Concord a été continuée à l'échelle de 5 litres afin de s'orienter vers un procédé de bioproduction du resvératrol. Les cultures réalisées en bioréacteur ont été utilisées pour mesurer et modéliser la production de resvératrol, provoquée par l'élicitation de la culture au méthyljasmonate.

Les cultures de cellules végétales nécessitent un taux d'ensemencement élevé (concentration de biomasse au moment de la mise en culture), de l'ordre de 2 grammes de masse sèche par litre, contrairement aux cultures de micro-organismes couramment utilisés dans l'industrie et dont la croissance est beaucoup plus rapide. Dans notre expérience, le bioréacteur est ensemencé par des suspensions cultivées en fioles auxquelles on ajoute du milieu de culture jusqu'à obtenir le volume souhaité. L'ensemencement direct de 5 litres aurait requis un volume substantiel de suspensions cellulaires en fioles. Ce problème a été contourné en ensemençant un plus petit volume de milieu, puis en procédant à deux ajouts de milieu au cours de la culture. Ceci a laissé le temps aux cellules de coloniser la totalité du volume, en trois phases de croissance.

Trois cultures de cellules de vigne ont ainsi été menées en bioréacteur. Pour chacune de ces cultures, la quantité de biomasse a été tracée en fonction du temps (Figure 2A). Les cellules suivent une croissance exponentielle. Ainsi, la biomasse est multipliée par deux au bout d'une période appelée temps de doublement. Ce temps de doublement a été mesuré pour chacune des cultures. Il est en moyenne de 3,4 jours (variant de 3,1 à 3,8 jours). La phase de croissance de la biomasse s'est étendue sur environ deux semaines (330 heures) jusqu'à l'élicitation (injection du méthyljasmonate pour déclencher la production du resvératrol), moment auquel la croissance cesse d'être exponentielle. Cependant, même si elle n'est plus exponentielle, la croissance s'est prolongée jusqu'à trois semaines de culture (500 heures), atteignant 45 grammes de biomasse (en masse sèche) dans 5 litres de culture. La capacité des cellules végétales à croître en quantité suffisante est un aspect critique de leur culture en bioréacteur. Il n'est pas évident de transférer en bioréacteur, un protocole de croissance en fioles. Ceci peut être un obstacle pour monter en échelle. Les concentrations de biomasse ont atteint, dans nos expériences, 7 à 10 grammes de masse sèche par litre, ce qui est honorable à cette échelle. Pour la 3e expérience, une courte phase stationnaire (arrêt provisoire de la croissance) a été observée immédiatement après le premier ajout de milieu (entre 150 et 180 heures, figure 2A, courbe verte). La croissance a été plus rapide après la phase stationnaire qu'avant. Deux temps de doublement différents ont donc été mesurés pour cette expérience. Ainsi, dans les trois expériences, quatre phases de croissance exponentielle ont été relevées.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

2A **2B**

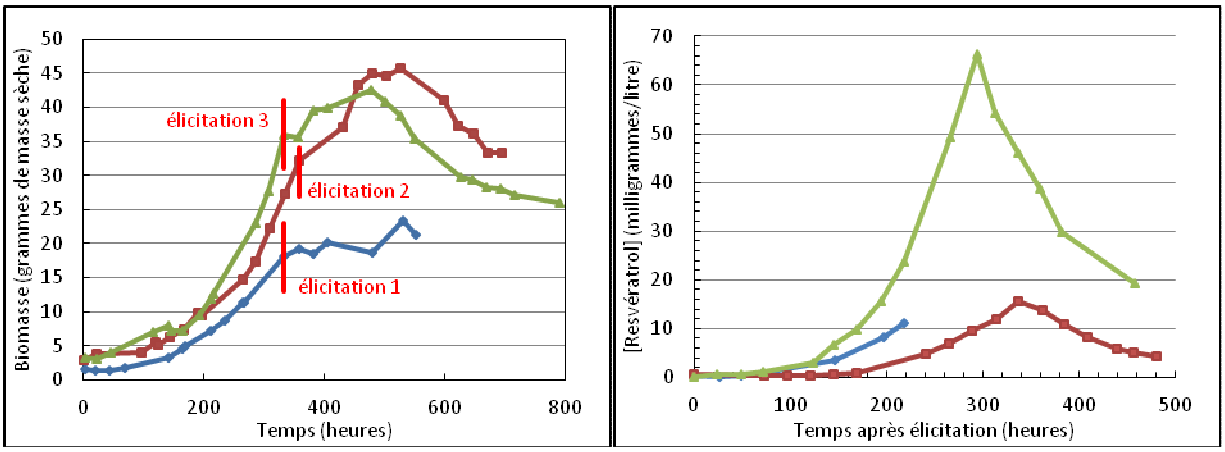

Figure 2A : Profil de croissance des cellules végétales Concord en bioréacteur de 5 litres.

Figure 2B : Production de resvératrol après élicitation.

En bleu : 1er essai. En rouge : 2e essai. En vert : 3e essai.

La concentration du resvératrol dans le milieu est restée à peu près nulle pendant les premiers jours qui ont suivi l'élicitation, 3 à 7 jours (71 à 169 heures) selon les expériences (Figure 2B). Cette concentration a ensuite augmenté selon une progression non linéaire jusqu'à un maximum (16 à 66 milligrammes par litres ; 294 à 336 heures après élicitation). Après avoir atteint ce pic, la concentration du resvératrol a diminué de façon également non linéaire. Ce profil a été observé pour la deuxième et la troisième expérience alors que la première expérience a été arrêtée avant d'atteindre la concentration maximale de resvératrol.

4. 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 (destruction) de ces dernières pour libérer davantage de resvératrol ? Quel est le mécanisme d'excrétion du resvératrol ? Est-il passif (diffusion à travers la paroi cellulaire), actif (provoqué par la cellule) 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 responsable de sa production dans la cellule ?

Une étude par microscopie nous a permis d'apporter un éclairage important concernant la localisation de la synthèse du resvératrol à l'échelle de la cellule. Des cellules de vigne ayant subi un traitement éliciteur ont été éclairées par un rayonnement laser. Le resvératrol émet alors un signal de fluorescence (pour le protocole détaillé, voir [7]). Le type de microscopie utilisé (microscopie confocale) permet d'obtenir une image plan par plan des cellules. La figure 3A montre une superposition de l'observation par microscopie confocale (en bleu) et par microscopie classique (en gris). Elle permet de montrer que le resvératrol s'accumule autour du noyau et de la paroi cellulaire, probablement dans le cytosol (mince couche de liquide se trouvant le long de la paroi et du noyau). La figure 3B montre l'observation confocale seule, où il est manifeste que le resvératrol ne s'accumule pas dans la vacuole (grand espace sombre au centre de la cellule, rempli de liquide). Cette présence préférentiellement périphérique dans la cellule est en accord avec la

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

fonction du resvératrol. Cette molécule de défense doit en effet se trouver en première ligne en cas d'attaque de la cellule par un champignon ou une bactérie.

3A **3B** **3C**

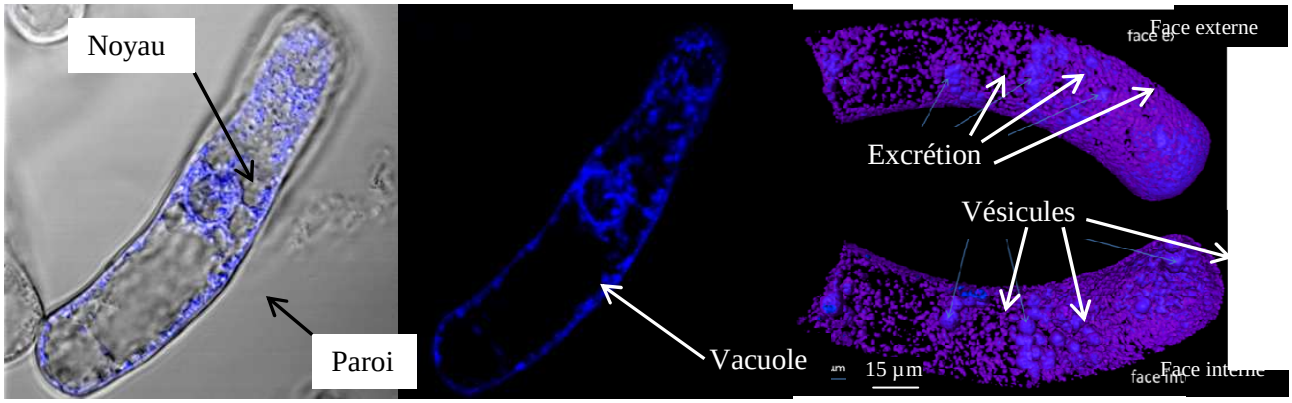

Figure 3A : Superposition de l'image par microscopie confocale (en bleu) et en lumière visible (en gris).
Figure 3B : Image par microscopie confocale seule.
Figure 3C : Faces externe et interne de la paroi cellulaire, en reconstruction tridimensionnelle.

En réalisant des images de la cellule selon plusieurs plans superposés, on peut reconstituer une vue tridimensionnelle de la répartition du resvératrol. Par une observation rapprochée de la face interne de la paroi cellulaire (Figure 3C), on peut constater des zones de forte concentration (bleu clair) correspondant à des structures sphériques, accolées à la paroi. Ces structures pourraient correspondre à des vésicules qui contiennent une enzyme responsable de la synthèse du resvératrol [8, 9]. Lorsqu'elles ont synthétisé suffisamment de resvératrol, ces vésicules pourraient libérer leur contenu hors de la cellule.
Les observations faites ici rendent possible une meilleure compréhension de la cinétique précoce d'accumulation du resvératrol dans les cellules. Les vésicules observées seraient peut-être le siège de la biosynthèse et de l'excrétion du resvératrol.

5. Conclusion

Le travail réalisé 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. 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.

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 temps de doublement de la souche Concord avec une assez bonne précision (3,4 ± 0,4 jours).

L'étude en fiole a révélé que le rapport [méthyljasmonate]/[biomasse] semblait être le paramètre déterminant pour la production du resvératrol. Il existerait une valeur optimale de ce rapport qui maximise la concentration de resvératrol.

La phase de décroissance de la concentration du resvératrol est *a priori* plus difficile à modéliser. Ceci est dû principalement à une méconnaissance des mécanismes de dégradation du resvératrol qui en sont la cause. Quels sont ces différents mécanismes ? Quelles sont leurs vitesses respectives ? 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. L'observation d'une corrélation notable entre les variations du taux d'oxygène dissous et celles de la concentration du resvératrol nous a conduits à un début

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

d'explication : la brusque décroissance de la concentration du resvératrol pourrait être due à une oxydation de la molécule.

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 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 méthyljasmonate seul. Les concentrations les plus importantes, et de loin, sont le résultat d'une élicitation combinée avec le méthyljasmonate. L'obtention de concentrations aussi élevées pour une molécule comme le resvératrol (2,5 grammes par litre) ne peut pas s'expliquer par un simple effet éliciteur. C'est la capacité de la cyclodextrine à encapsuler les molécules de resvératrol qui rend compte d'une bonne part de leur effet. Ainsi, la cyclodextrine permet 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 encapsuler dans un espace hydrophobe. L'encapsulation du resvératrol peut aussi le préserver de sa dégradation et préserver par ailleurs les cellules des effets toxiques du resvératrol. Ceci est confirmé par les mesures de concentrations en biomasse.

La 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 par solvant présentait un risque écologique mais il est possible de se tourner vers une extraction 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 sa dégradation. L'autre volet à développer est la modélisation en bioréacteur, notamment en présence de cyclodextrine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SIEMANN E. H. et CREASY L. L., 1992. – Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture,* **43**(1), 49-52.

(2) RENAUD S et de LORGERIL M., 1992. – Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet,* **339**, 1523-1526.

(3) FRANKEL E. N., WATERHOUSE A. L. et KINSELLA J. E., 1993. – Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet,* **341(**8852), 1103-1104.

(4) JEANDET P., BESSIS R., MAUME B. F., MEUNIER P., PEYRON D. et TROLLAT P., 1995. – Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **43**(2), 316-319.

(5) JEANDET P., BESSIS R., SBAGHI M., MEUNIER P. et TROLLAT P., 1995. – Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* **46,** 1-4.

(6) STERVBO U., VANG O. et BONNESEN C., 2007. – A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry,* **101**(2), 449-457.

(7) DONNEZ D., 2010. – Étude 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.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

(8) FORNARA V., ONELLI E., SPARVOLI F., ROSSONI M., AINA R., MARINO G. et CITTERIO S., 2008. – Localization of stilbene synthase in vitis vinifera L. during berry development. *Protoplasma*, **233**(1-2), 83-93.

(9) WANG W., TANG, K., YANG H.-R., WEN P.-F., ZHANG P., WANG H.-L. et 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.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.