

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) DANS LA  
LEVURE MÉTHYLOTROPHE *PICHLIA PASTORIS* COMME UN OUTIL  
DE DIAGNOSTIC DU PROCÉDÉ DE FERMENTATION

ANNE-LAURE PÉRARD  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)

JUIN 2000

©Anne-Laure Pérard, 2000.



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-57423-7

**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DE LA GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) DANS LA  
LEVURE MÉTHYLOTROPHE *PICHA PASTORIS* COMME UN OUTIL  
DE DIAGNOSTIC DU PROCÉDÉ DE FERMENTATION

présenté par : PÉRARD Anne-Laure

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., président

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. GROLEAU Denis, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. GARNIER Alain, Ph.D., membre

## REMERCIEMENTS

Un grand merci à mes directeurs de recherche, Denis Groleau, Mario Jolicoeur et Michel Perrier, pour leur disponibilité, leur soutien, leur gentillesse et leur aide financière.

Merci à Catherine pour sa présence continue, ses multiples conseils, son aide pour les manips, le partage de notre bench, les relectures...

Merci à toutes les personnes du groupe de Denis Groleau qui m'ont apporté leur soutien pendant mon passage à l'IRB, plus particulièrement, Denis B. pour la maîtrise de Photoshop, Jean-François J. pour mes débuts en fermentation, Jean-François V. et Michel D. pour les réparations sur le fermenteur, Anke, Louise, Maria, Marianne pour leur aide dans le labo, Martin pour son aide méticuleuse, Michael pour les analyses au HPLC, Michelle L. pour les corrections en anglais, Ovidiu pour les gels, Wayne pour la purification de la souche, Dany, Manon, Mario, Patricia, Teffanie pour leur sympathie au quotidien.

Merci à Luc Lavoie pour les analyses au HPLC à Polytechnique.

Un merci particulier à Muriel pour ses bons conseils et sa relecture active.

Un grand merci à Sandrine et Damien qui m'ont permis et aidée à faire ce choix.

Une pensée finale à ceux qui m'ont apporté un soutien à fois ponctuel mais réel tout au long du séjour à Montréal, mes parents, mes frères, Adeline, l'équipe du forum 98, les amis de France et les expats de Montréal.

## RÉSUMÉ

Ce projet de recherche s'inscrit dans le domaine de la production de protéines hétérologues en bioréacteur dans une levure méthylotrophe de plus en plus utilisée *Pichia pastoris*. L'optimisation de tels procédés peut être exigeante : il est souvent difficile d'interpréter des résultats tirés d'expériences en Erlenmeyers et les méthodes pour mesurer la quantité de protéines sont longues et plus qualitatives que quantitatives. Des outils de diagnostic et de monitoring sont toujours recherchés en vue de comprendre, améliorer et optimiser ce type de production. Depuis quelques années, la GFP, Green Fluorescent Protein<sup>1</sup>, est devenue de plus en plus populaire en recherche voire en industrie car elle peut devenir fluorescente après une simple excitation lumineuse. Cette protéine a l'avantage d'être très stable, ne nécessite aucun cofacteur pour être active et la détection de la fluorescence est non-envahissante. Elle apparaît donc comme un outil avantageux car la fluorescence est facile à quantifier.

Dans ce cadre, le projet traite plus particulièrement de la production intracellulaire de GFP dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* en bioréacteur de 20 litres. L'objectif principal du projet était de montrer que la GFP peut être utilisée comme une protéine modèle, un outil de diagnostic et de monitoring. Ce projet était réalisable car le clonage de la GFP dans *Pichia pastoris* et des essais de production en bioréacteur avaient été réussis. L'objectif des premières expériences était d'apprendre les techniques de base en microbiologie et en fermentation microbienne afin de devenir opérationnelle et de déterminer les conditions de culture en bioréacteur. Dans un deuxième temps, plusieurs fermentations en bioréacteur de 20 L ont été réalisées pour obtenir des résultats reproductibles en vue de modéliser la production intracellulaire de GFP dans *Pichia pastoris*.

---

<sup>1</sup> Protéine à fluorescence verte

Pour réaliser nos travaux tels que mentionnés, nous avons utilisé *Pichia pastoris*, une levure méthylotrrophe (capable de croître sur méthanol) car elle rassemblerait les avantages des micro-organismes bien connus que sont la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Comme nous avons travaillé avec une souche de *Pichia pastoris* de phénotype Mut<sup>S</sup> (utilisation lente du méthanol), notre système de culture se caractérise ainsi : une phase de croissance en cuvée sur le glycérol et une phase de production intracellulaire de GFP avec alimentation discontinue en méthanol.

*Pichia pastoris* est un système productif puisque nous avons obtenu, sans effort d'optimisation, un niveau de GFP allant jusqu'à 27,5 mg/g de masse cellulaire. La fluorescence  $F$  (unité arbitraire) de la GFP est bien proportionnelle à sa concentration  $[GFP]$  en g/L ( $[GFP] = 2 \cdot 10^{-5} F$ ). La production de GFP sature au bout d'environ 100 heures de fermentation et la dégradation de la GFP n'en est pas la cause car elle est stable dans ce cas. Plusieurs hypothèses ont été proposées : 1) une inhibition liée à l'accumulation de GFP dans la cellule, 2) la présence d'un substrat limitant  $S$  ou 3) une accumulation d'un composé toxique dans le milieu. Dans ce projet, nous avons exploité la deuxième hypothèse en modélisant la synthèse de GFP par l'emploi d'une loi de Michaelis-Menten mettant en évidence un substrat limitant inconnu. Ce modèle, effectué uniquement en phase d'induction, est caractérisé par une constante de temps ( $\tau = 52$  h), un paramètre d'affinité du substrat limitant ( $\alpha = 0,6$ ) et une concentration limite en GFP ( $[GFP]_i = 0,33$  g/L). Vu les analyses, nous savons que le substrat limitant  $S$  n'est ni un élément majeur (C, O, H, N, P, S), ni l'un des ions testés  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$  ou  $Ca^{2+}$ . Le substrat  $S$  pourrait être le fer, un ou des oligo-éléments ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ ), des vitamines, des acides aminés ou des ATP, car nous ne les avons pas quantifiés.

Grâce aux résultats obtenus, plusieurs éléments nous encouragent à utiliser la GFP comme un outil dans la production de protéines hétérologues chez *Pichia pastoris*. Comme la GFP est très stable et que sa fluorescence est proportionnelle à sa concentration, nous pouvons quantifier rapidement et facilement la GFP synthétisée. Grâce au modèle, nous avons un outil pour déterminer le temps optimal de récolte des

cellules en fonction du niveau de production désiré. Grâce à la mesure de la fluorescence, soit discontinue (nos expériences), soit continue (grâce à une sonde à fluorescence), il sera possible de tester l'influence de différents paramètres, de déterminer le substrat limitant, d'essayer de nouvelles stratégies de production...etc. L'intérêt ultime d'utiliser la GFP en fermentation microbienne est de fusionner le gène de la GFP avec celui d'une protéine d'intérêt en vue de suivre la production de celle-ci ou d'avoir les deux gènes côte à côte sous le contrôle du même promoteur. Des expériences doivent être mises en œuvre pour établir des relations entre la fluorescence et la concentration de la protéine d'intérêt. La GFP est stable mais le couplage des protéines le sera-t-il ? Les modèles développés avec la GFP seule seront-ils toujours valables ? La GFP est un outil prometteur qui permettra d'apporter des réponses.

## ABSTRACT

The subject of this research is heterologous protein production in a bioreactor using a more and more attractive methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Such process optimization must be demanding : it is often difficult to extrapolate shake flasks results and the methods used to quantify the protein concentration require a lot of time and are more qualitative than quantitative. That is why we are looking for monitoring tools in order to better understand, improve and optimize protein production. In the last few years, the Green Fluorescent Protein (GFP) has become popular in research, and even in industry, because it is fluorescent after simple light excitation. Its advantage is to be fluorescent without any cofactor, to be stable and the fluorescence detection is non-invasive. It appears to be a very useful tool in fermentation monitoring since fluorescence is easy to measure and quantify.

The project deals in particular with intracellular GFP production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* in a 20 litre bioreactor. The main project objective was to show that GFP can be used as a model protein and a monitoring tool. This project was possible because cloning of GFP into *Pichia pastoris* and test production in bioreactor succeeded. The first objective of the experiments was to learn laboratory techniques bases in microbiology and microbial fermentations in order to be operational and to determine cell culture conditions. Afterwards, several fermentations in a 20 L bioreactor were lead to collect reproducible results to model intracellular GFP production.

To conduct our work, we used *Pichia pastoris*, a methylotrophic yeast (able to grow on methanol as the only carbon source) because it has the advantages of other well-known micro-organisms such as the bacterium *Escherichia coli* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Because we worked with a Mut<sup>S</sup> (slow methanol utilization) strain, our culture system is defined as follows : a batch growth phase on glycerol and a production phase with a discontinuous methanol feed.



*Pichia pastoris* is a productive host system. We obtained, without optimization, 27,5 mg/g GFP by cell mass. We are able to show that GFP fluorescence  $F$  (arbitrary unit) and concentration  $[GFP]$  (g/L) are proportional ( $[GFP] = 2.10^{-5} F$ ). After about 100 hours of fermentation, GFP production reached a plateau which is not due to GFP degradation because GFP is very stable in this case. Several hypotheses are possible : 1) inhibition due to an accumulation of GFP in the cell, 2) a limiting substrate  $S$  or 3) accumulation of a toxic component. We worked on the second hypothesis by modelling GFP synthesis with Michaelis-Menten kinetics based on an unidentified limiting substrate. This model, only valid in induction phase, is characterized by a time constant ( $\tau = 52$  h), an affinity substrate parameter ( $\alpha = 0,6$ ) and a limit GFP concentration ( $[GFP]_l = 0,33$  g/L). Thanks to our analysis, we know that the substrate,  $S$ , is any main nutrient (C, O, H, N, P, S) or none of the following ions ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ). The substrate  $S$  could possibly be a iron ion, a trace element ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ ), vitamins, amino acids or ATP, however we did not measure these.

The results enable us to use GFP as a monitoring tool in heterologous protein production in *Pichia pastoris*. As GFP is very stable and its fluorescence is linearly correlated with its concentration, we can quantify rapidly and easily all the synthesized GFP. Thanks to the model, we now have a mean to determine cell harvest time in function of our goal. Because fluorescence can be measured off-line (our experiments) or on-line (with a fluorescence probe), we could determine the influence of nutritional parameters, find the limiting substrate  $S$ , try other production strategies...The main reason to use GFP in fermentation is that it can be fused with a protein of interest or to have consecutively the genes under the same promoter control. Further experiments must be done in order to establish a relationship between the fluorescence and the concentration of a protein of interest. GFP is stable but will fusion product with GFP be ? Will models developed with GFP still be valid ? GFP will be a powerful tool in protein production.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>XX</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Contexte.....	1
1.1.1 Choix de <i>Pichia pastoris</i> .....	1
1.1.2 Choix de la GFP .....	1
1.1.3 Expériences préliminaires .....	2
1.2 Problématique .....	3
1.2.1 Problème de la production de protéines hétérologues.....	3
1.2.2 La GFP serait-elle une solution ? .....	3
1.3 Objectifs.....	4
1.3.1 Objectif principal.....	4
1.3.2 Objectifs spécifiques .....	4
1.4 Organisation du mémoire .....	5
<b>CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>6</b>
2.1 Le système biologique .....	6

2.1.1	<i>Pichia pastoris</i> .....	6
2.1.2	"Green Fluorescent Protein" (GFP).....	14
2.2	Le système de culture .....	18
2.2.1	Milieux de culture .....	18
2.2.2	Deux systèmes de culture .....	21
2.2.3	Les paramètres à contrôler .....	23
<b>CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>		<b>26</b>
3.1	Protocole de fermentation en Erlenmeyers agités ou en bioréacteur.....	26
3.1.1	Conditions de culture .....	26
3.1.2	Planification .....	27
3.1.3	Matériel .....	32
3.1.4	Méthodes .....	42
3.2	Protocole pour les gels d'électrophorèse .....	47
3.2.1	Solutions utilisées.....	48
3.2.2	Préparation des échantillons.....	49
3.2.3	Préparation du gel.....	52
3.2.4	Migration du gel.....	52
3.2.5	Coloration, décoloration et conservation .....	53
<b>CHAPITRE IV : RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES .....</b>		<b>55</b>
4.1	Expériences en Erlenmeyers.....	55
4.1.1	Objectifs .....	55
4.1.2	Résultats .....	56
4.2	Mesure de la fluorescence .....	68
4.2.1	Mesure rapide de la fluorescence .....	68
4.2.2	Relation linéaire entre la fluorescence et la concentration en GFP.....	70

4.2.3 Conclusion.....	71
<b>CHAPITRE V : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>73</b>
5.1 Cinétiques de croissance et de production de GFP.....	73
5.2 Modélisation de la production de GFP .....	78
5.2.1 Bilan de GFP .....	78
5.2.2 Évaluation du terme de production .....	82
5.2.3 Détermination des paramètres du modèle (substrat limitant).....	86
5.3 Discussion.....	90
5.3.1 Validité et limites du modèle .....	90
5.3.2 Substrat limitant .....	92
<b>CHAPITRE VI : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>96</b>
6.1 Conclusion.....	96
6.2 Recommandations.....	97
6.3 Perspectives d'avenir .....	99
<b>RÉRÉRENCES .....</b>	<b>100</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>106</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 2.1 :	Protéines hétérologues exprimées dans <i>Pichia pastoris</i> .....	14
Tableau 2.2 :	Sources de macronutriments les plus souvent utilisées à l'échelle laboratoire ou industrielle. ....	19
Tableau 2.3 :	Comparaison des systèmes de culture .....	22
Tableau 3.1 :	Conditions de culture pour les deux systèmes.....	27
Tableau 3.2 :	Horaire pour une fermentation en Erlenmeyers.....	30
Tableau 3.3 :	Horaire pour une fermentation en bioréacteur.....	31
Tableau 3.4 :	Méthode d'analyse des paramètres de suivi. ....	32
Tableau 3.5 :	Solution de biotine.....	35
Tableau 3.6 :	Solution de struktol.....	35
Tableau 3.7 :	Solution de 1 M $K_2HPO_4$ .....	36
Tableau 3.8 :	Solution de 1 M $KH_2PO_4$ .....	36
Tableau 3.9 :	Mélange .....	36
Tableau 3.10 :	Solution de YNB.....	37
Tableau 3.11 :	Solution basique.....	37
Tableau 3.12 :	Solution d'acide.....	38
Tableau 3.13 :	Solution de méthanol. ....	38
Tableau 3.14 :	Solution saline. ....	38
Tableau 3.15 :	Recette Invitrogen.....	39
Tableau 3.16 :	Solution BMGY.....	39
Tableau 3.17 :	Volume de BMGY à ajouter.....	39

Tableau 3.18 :	Composition des Erlenmeyers.....	40
Tableau 3.19 :	Solution BMGY.....	40
Tableau 3.20 :	Volume à ajouter dans le bioréacteur .....	41
Tableau 3.21 :	Composition des bouteilles pour la centrifugation .....	43
Tableau 3.22 :	Solution sans inhibiteur de protéase. ....	50
Tableau 3.23 :	Solution pour briser les cellules.....	50
Tableau 4.1 :	Comparaison des pourcentages d'erreur de la Figure 4.7.....	63
Tableau 4.2 :	Pourcentage d'erreur pour le calcul de la fluorescence.. ..	68
Tableau 5.1 :	Valeur des paramètres d'une expérience à l'autre. ....	74
Tableau 5.2 :	Valeur des paramètres du modèle (1). ....	88
Tableau 5.3 :	Valeur des paramètres du modèle (2). ....	91
Tableau 5.4 :	Niveau des concentrations ioniques lors des fermentations.. ..	95

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 :	Voie métabolique de la dégradation du méthanol dans <i>Pichia pastoris</i> ...	8
Figure 2.2 :	Stratégie de clonage.....	11
Figure 2.3 :	Plasmide pQBI63 de Quantum Biotechnologies Inc.....	12
Figure 2.4 :	Vecteur navette pPICZ B.....	13
Figure 2.5 :	Structure de la GFP. ....	15
Figure 2.6 :	Procédure d'entretien et d'utilisation d'un bioréacteur.....	22
Figure 3.1 :	Schéma de la procédure en Erlenmeyers.....	28
Figure 3.2 :	Schéma de la procédure en bioréacteur .....	29
Figure 4.1 :	Évolution de la biomasse (DO) .....	57
Figure 4.2 :	Évolution de la concentration en méthanol dans plusieurs cultures.....	58
Figure 4.3 :	Comparaison de l'évolution de la fluorescence de la culture.....	59
Figure 4.4 :	Cellules de <i>Pichia pastoris</i> contenant de la GFP .....	60
Figure 4.5 :	Comparaison de l'augmentation de la fluorescence.....	61
Figure 4.6 :	Fluorescence des surnageants de plusieurs cultures.....	62
Figure 4.7 :	Pourcentages d'erreur pour les deux méthodes .....	63
Figure 4.8 :	Exemple de calcul de la densité optique.....	64
Figure 4.9 :	Exemple de mesure de la fluorescence.....	66
Figure 4.10 :	Comparaison des méthodes de calcul de la fluorescence.....	67
Figure 4.11 :	Comparaison de fluorescence.....	69
Figure 4.12 :	Courbe standard entre la GFP et la mesure de fluorescence. ....	71
Figure 5.1 :	Évolution de la biomasse.....	75

Figure 5.2 :	Évolution des sources de carbone pendant la fermentation 3.....	76
Figure 5.3 :	Évolution de la production de GFP en bioréacteur .....	77
Figure 5.4 :	Gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Tris-HCl 10-20 %).....	78
Figure 5.5 :	Fluorescence du surnageant pour les différentes fermentations.....	80
Figure 5.6 :	Stabilité de la GFP dans <i>Pichia pastoris</i> .....	81
Figure 5.7 :	Comparaison des cinétiques de production de GFP par unité de DO .....	83
Figure 5.8 :	Modèle de production de la GFP en bioréacteur .....	89
Figure 5.9 :	Évolution de l'oxygène dissous pour la fermentation 3 .....	94



## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
$\alpha$ :	affinité au substrat S
ARN :	Acide Ribonucléique
ASP2 :	"odorant-binding protein" d'abeille
ATP :	Adénosine triphosphate
AOX :	Oxydase d'alcool
AOX1 :	gène de l'enzyme AOX lié au promoteur 1
AOX2 :	gène de l'enzyme AOX lié au promoteur 2
BMGY :	"Buffered Glycerol-complex Medium" (milieu complexe glycérolé)
BMMY :	"Buffered Methanol-complex Medium" (milieu complexe méthanolé)
D14 :	souche de <i>Pichia pastoris</i> ayant le gène intracellulaire de la GFP
DHAS :	"Dihydroxyacetone Synthase" (Synthétase Dihydroxyacétone)
DO :	Densité Optique
GC :	Gas Chromatography (Chromatographie en phase gazeuse)
GFP :	Green Fluorescent Protein (Protéine à fluorescence verte)
EDTA :	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
F1 :	Fermentation 1
F2 :	Fermentation 2
F3 :	Fermentation 3
HIV :	Human Immunodeficiency Virus (SIDA : syndrome de l'immuno-déficience acquise)

HPLC :	High Pressure Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute pression)
IGF-1 :	"Insulin-like growth factor-1"
IRB :	Institut de recherche en biotechnologie
kDa :	kilodalton
KM71 :	souche de <i>Pichia pastoris</i> de phénotype Mut <sup>S</sup> d'Invitrogen
K <sub>S</sub> :	constante de Michaelis lié au substrat S
K <sub>T</sub> :	constante de Michaelis lié à la substance T
λ :	coefficient de proportionnalité entre le produit T et la GFP
LMW :	"Low molecular Weight" (Marqueur de faible poids moléculaire)
M :	Molaire, 1 mole par litre
MeOH :	méthanol
μ :	facteur de croissance (h <sup>-1</sup> )
Mut <sup>+</sup> :	"Methanol UTILization Positive" (Utilisation du méthanol positive)
Mut <sup>S</sup> :	"Methanol UTILization Slow" (Utilisation lente du méthanol)
Mut <sup>-</sup> :	"Methanol UTILization Negative" (utilisation négative du méthanol)
O <sub>2</sub> :	dioxygène
pAOX :	promoteur de l'oxydase d'alcool
pAOX1 :	promoteur "1" de l'enzyme AOX
pAOX2 :	promoteur "2" de l'enzyme AOX
PCR :	"polymerase chain reaction" (Réaction polymérase en chaîne)
PMSF :	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
pQBI63 :	plasmide contenant la GFP

pPCIZ B :	vecteur navette pour <i>Pichia pastoris</i> et <i>Escherichia coli</i>
q <sub>GFP</sub> :	taux de production de GFP par cellule (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
q <sub>GFP</sub> <sup>0</sup> :	taux de production initial de GFP par cellule (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
q <sub>GFP</sub> <sup>max</sup> :	taux de production maximal de GFP par cellule (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
ρ :	masse volumique
RB :	"running buffer" (tampon de migration)
rsGFP :	"red-shifted GFP" (mutant de la GFP)
S :	substrat limitant
SB :	"sample buffer" (tampon pour les échantillons)
S <sub>0</sub> :	concentration initial en substrat S
SDS-PAGE :	"Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis"
T :	substance toxique
τ :	constante de temps caractéristique
tpm :	tour par minute
VVM :	volume par volume de culture par minute
V/V :	volume par volume
500X :	le volume de solution qui doit être ajouté représente de 1/500 <sup>ème</sup> du volume final
X :	biomasse (g/L)
Y <sub>GFP/S</sub> :	taux de rendement de GFP par rapport au substrat S
YNB :	"Yeast Nitrogen Base" (base azotée pour les levures)

## LISTE DES ANNEXES

<b>ANNEXE I : PROTOCOLES</b> .....	<b>106</b>
A1.1 Listes des protocoles de l'IRB .....	106
A1.2 Appareils .....	107
A1.3 Fermentation en Erlenmeyers .....	112
A1.4 Feuille de suivi pour le SDS-PAGE .....	118
<b>ANNEXE II : TAUX SPÉCIFIQUE DE CROISSANCE</b> .....	<b>119</b>
<b>ANNEXE III : VALIDITÉ DES ANALYSES DES ÉCHANTILLONS</b> .....	<b>121</b>
<b>ANNEXE IV : CINÉTIQUES</b> .....	<b>123</b>
A4.1 Évolution des sources de carbone pour F1 et F2 .....	123
A4.2 Évolution de la concentration en oxygène dissous pour F1 et F2 .....	125
A4.3 Évolution des concentrations ioniques pour F1, F2 et F3 .....	127
<b>ANNEXE V : ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION DE FLUORESCENCE</b> .....	<b>133</b>
A5.1 Par microscopie .....	133
A5.2 Par cytofluorométrie .....	134
<b>ANNEXE VI : MODÉLISATION</b> .....	<b>138</b>
A6.1 Liste des points expérimentaux .....	138
A6.2 Résultats statistiques .....	141
<b>ANNEXE VII : PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DU MÉTHANOL</b> .....	<b>144</b>

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 Contexte

#### 1.1.1 Choix de *Pichia pastoris*

Depuis six ans, le groupe de Recherche et Développement en technologie microbienne et enzymatique de l'Institut de recherche en biotechnologie (IRB) travaille sur la levure méthylotrrophe *Pichia pastoris*. Une des principales activités du groupe est la production de protéines pour des fins de recherche et pour des besoins industriels (production de protéines et mise à l'échelle de procédés pour des entreprises privées). Les premiers projets liés à *Pichia pastoris* ne s'inscrivaient pas dans un cadre de recherche choisi par le groupe mais étaient plutôt liés à des demandes extérieures. Jusqu'à ce jour, la plupart des travaux de ce groupe employait la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*, deux micro-organismes bien connus dans la production de protéines hétérologues. Les premiers projets avec *Pichia pastoris* ont suscité la curiosité dans le groupe, qui a commencé par la suite à s'intéresser de plus près à cette levure et, vu l'augmentation des travaux de recherche à l'échelle mondiale (souvent précurseur de futurs besoins industriels), le groupe a décidé d'accroître son expertise dans l'utilisation de cette levure en développant une activité de recherche autour de *Pichia pastoris*. Le choix de *P. pastoris* est lié au fait que, contrairement à *E. coli* et *S. cerevisiae*, elle est peu caractérisée : s'engager dans cette voie de recherche était donc essentiel pour répondre à une future demande industrielle.

#### 1.1.2 Choix de la GFP

Depuis trois ans, le groupe a désormais les moyens de préparer ses propres clones de *Pichia pastoris*. Ce savoir-faire est très important car un meilleur contrôle sur l'ingénierie

du clone devrait favoriser l'optimisation du procédé ("process integration"). Le développement de cette activité a permis au groupe d'une part de cloner des gènes pour faire de la production de protéines et, d'autre part, de maîtriser la totalité du procédé en partant de l'ADN jusqu'à la production de protéines à grande échelle (jusqu'à des bioréacteurs de 1500 L). Au moment où l'activité de recherche a débuté sur *Pichia pastoris*, le groupe a décidé de cloner la GFP, Green Fluorescent Protein<sup>1</sup>, dans *Pichia pastoris* en tant que protéine modèle. La GFP est, à l'origine, une protéine extraite de la méduse *Aequorea victoria*, par Shimomura en 1962, dont la particularité est de fluorescer dans le vert lorsqu'elle est excitée à une certaine longueur d'onde, ceci permet donc un suivi simple et direct par mesure de la fluorescence. La fluorescence ne nécessite aucun cofacteur. La GFP est depuis quelques années très utilisée dans divers domaines (marquage de protéines dans la cellule, criblage biologique, niveau d'expression des gènes...) et elle a déjà été utilisée comme protéine modèle dans la bactérie hôte *Escherichia coli* (Albano et al., 1996 et 1998). En tant que telle, la GFP peut permettre de comprendre et d'optimiser la production de protéines hétérologues dans le système hôte *Pichia pastoris*.

### 1.1.3 Expériences préliminaires

Dans cette perspective de développement d'une protéine modèle dans le système hôte *Pichia pastoris*, la première étape fut donc de cloner le gène de la GFP dans une souche de *Pichia pastoris*. Deux séries de clones ont été générées : une série avec le gène de GFP pour une production intracellulaire et une autre pour une production extracellulaire. De ces deux séries, les clones les plus fluorescents ont été sélectionnés. Après avoir choisi un clone pour chaque production intracellulaire et extracellulaire, la deuxième étape fut de produire la GFP en Erlenmeyers. Les résultats étant satisfaisants (Favre et Borel-Giraud, 1999), le passage à la troisième étape (production en bioréacteur de 20 L) pouvait être mise en œuvre. Cependant, selon la littérature (Higgins et Cregg, 1998), la production en

---

<sup>1</sup> Protéine à fluorescence verte

Erlenmeyers pour *Pichia pastoris* ne s'extrapole pas facilement en bioréacteur pour des raisons encore inconnues. L'étape trois fut néanmoins concluante pour les deux souches clonées, celle avec la production intracellulaire de la GFP et celle avec la production extracellulaire (Favre et Borel-Giraud, 1999). A ce stade, les deux souches construites étaient capables de produire un niveau élevé de GFP. Utiliser la GFP comme une protéine modèle était désormais possible et ce projet de maîtrise est basé sur ces souches.

## **1.2 Problématique**

### **1.2.1 Problème de la production de protéines hétérologues**

La production de protéines hétérologues dans les systèmes hôtes, qu'elle soit à petite ou à grande échelle, est actuellement difficile à optimiser car les méthodes de mesure de la concentration en protéine peuvent être difficiles à mettre en œuvre et peuvent être plus qualitatives que quantitatives. La production de protéines se fait généralement de façon approximative : pendant la phase de production, des échantillons sont pris mais la concentration en protéine produite n'est souvent pas immédiatement analysée. C'est seulement à la fin de l'expérience, lorsque le produit a été récolté, que la concentration en protéine est approximativement quantifiée. Il est donc très long et fastidieux d'optimiser les paramètres car pour observer l'influence de tel ou tel paramètre, il faut souvent réaliser une expérience dans sa totalité (la durée d'une expérience est d'environ cinq jours sans compter les temps de préparation et de nettoyage). Ce manque de moyen de mesure fait que le temps de récolte de la culture est déterminé approximativement. Cette façon de procéder n'est donc pas optimale et induit des pertes de temps et d'argent.

### **1.2.2 La GFP serait-elle une solution ?**

L'idée d'utiliser la GFP provient du fait que cette protéine semble quantifiable instantanément grâce à sa capacité d'être fluorescente et permettrait donc de faire un suivi de l'évolution de celle-ci au cours du temps. Dans un premier temps, le signal de fluorescence, corrélé à la concentration de la GFP, pourrait servir d'indicateur de

l'évolution de la production, il pourrait aussi servir de moyen pour déterminer le temps optimal de récolte. Dans un deuxième temps, si l'outil est à la mesure de nos attentes, il pourrait être un moyen de modéliser la production de protéines dans *Pichia pastoris*, de l'améliorer et d'être à plus long terme un signal pour établir des stratégies de contrôle du procédé de fermentation (une sonde à fluorescence a déjà été utilisée par Randers-Eichhorn et al. (1997) et par Gilbert et al. (2000)).

Cependant, l'intérêt n'est pas de produire de la GFP en tant que telle mais de produire une multitude de protéines hétérologues utiles dans diverses domaines d'application : pharmaceutique, environnemental... Pour cela, il pourrait donc être intéressant de coupler le gène de la GFP avec celui d'une protéine d'intérêt sur un brin d'ADN unique avec un promoteur unique. Nous pourrions ainsi produire les deux protéines en même temps et utiliser le signal de fluorescence pour suivre et optimiser la production de la protéine d'intérêt.

## 1.3 Objectifs

### 1.3.1 Objectif principal

A ce jour, la GFP a été produite dans *Pichia pastoris* en bioréacteur pour les deux productions : intracellulaire et sécrétée. A long terme, nous aimerions l'utiliser comme une protéine modèle. L'objectif de ce projet de recherche était ainsi d'étudier le comportement de la GFP en tant que protéine modèle et en tant qu'outil dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris*. Seule la souche produisant la GFP dans son cytoplasme a fait l'objet de cette étude.

### 1.3.2 Objectifs spécifiques

En vue de cet objectif principal et ayant une faible formation à la fois en biologie et dans le domaine des fermentations microbiennes, le premier objectif était d'apprendre les techniques de manipulation en vue d'être opérationnelle pour réaliser les expériences



futures. Simultanément, il a fallu établir des conditions de culture pour la production de la GFP en bioréacteur.

Ceci étant fait, le troisième objectif fut de générer des résultats reproductibles pour modéliser la production intracellulaire de GFP dans *Pichia pastoris* dans un bioréacteur de 20 litres.

## **1.4 Organisation du mémoire**

Le mémoire comporte six chapitres. Le chapitre d'introduction pose le contexte et les objectifs de ce projet de recherche. La revue de littérature décrit le système biologique et le système de culture employés. Le chapitre III rassemble le matériel et les méthodes utilisés au cours des expériences. Les deux chapitres suivants présentent les résultats : le chapitre IV s'attache aux résultats préliminaires, nécessaires à la compréhension et aux résultats du chapitre V. Le chapitre V illustre une façon de modéliser la production intracellulaire de la GFP par *Pichia pastoris*. Ce mémoire s'achève sur un chapitre de conclusion et de recommandations qui dresse un bilan sur l'atteinte des objectifs et propose quelques pistes de recherche.

## CHAPITRE II

### REVUE DE LITTÉRATURE

La revue suivante présente tout d'abord le système biologique, composé de la levure méthylotrophe *Pichia pastoris*, système hôte, et de la protéine recombinante, la Green Fluorescent Protein<sup>2</sup> (GFP) puis le système de culture. La première partie rassemble les caractéristiques principales de *Pichia pastoris* et de la GFP nécessaires à la compréhension du projet ainsi que l'avantage de ce système biologique. Le système de culture, le milieu de culture, les paramètres contrôlés ainsi que les systèmes de production sont développés dans la deuxième partie.

## 2.1 Le système biologique

### 2.1.1 *Pichia pastoris*

Dans la production de protéines hétérologues, les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*...) offrent les avantages, à la fois des cellules mammifères et des bactéries (*Escherichia coli*). Elles sont simples à manipuler, ont une croissance rapide et peuvent croître à de hautes densités cellulaires comme les bactéries. En tant que cellules eucaryotes, elles sont capables de faire les modifications post-transductionnelles comme la conformation et la maturation des protéines et sont capables de glycosyler les protéines sécrétées (Hagenson, 1991).

Dans les années 1970, l'entreprise Phillips Petroleum a développé les protocoles et les milieux de culture pour faire croître la levure *Pichia pastoris* avec le méthanol comme unique source de carbone et d'énergie car les levures méthylotrophes apparaissaient comme de bons systèmes pour la production industrielle de protéines d'origine unicellulaire (SCP : Single-Cell protein). Cependant avec les crises du pétrole des années

---

<sup>2</sup> Protéine à fluorescence verte

70, le coût du méthanol a augmenté et l'utilisation de *Pichia pastoris* dans cette voie ne fut pas réellement poursuivie. Des années plus tard, *Pichia pastoris* a commencé à être utilisée en tant que système hôte pour la production de protéines hétérologues. Plusieurs facteurs ont accéléré ce développement : la découverte d'un promoteur dérivé du gène oxydase d'alcool I (pAOX1) ; la ressemblance des techniques utilisées pour les manipulations génétiques avec *Saccharomyces cerevisiae* ; la préférence faite à *Pichia pastoris* pour sa croissance aérobie et surtout la décision de Phillips Petroleum de laisser utiliser *Pichia pastoris* à des fins académiques (Higgins et Cregg, 1998). Les avantages suivants ont aussi joué un grand rôle : haute capacité de production intracellulaire de protéines, haute capacité de sécrétion, haute densité cellulaire en bioréacteur, stabilité génétique et mise à l'échelle sans perte majeure au niveau de la productivité (Romanos, 1995).

Deux aspects de *Pichia pastoris* seront développés : *Pichia pastoris* en tant que levure méthylotrophe et en tant que système hôte pour la production de protéines.

### 2.1.1.1 Levure méthylotrophe

#### *Chemin métabolique du méthanol*

*Pichia pastoris* est une levure méthylotrophe, c'est-à-dire qu'elle est capable de croître avec le méthanol comme unique source de carbone. Pour dégrader le méthanol, la levure a besoin d'une enzyme spécifique : l'oxydase d'alcool (AOX). Cette enzyme entre dans la première étape de la voie métabolique de la dégradation du méthanol (Figure 2.1) qui se trouve dans les péroxisomes et permet la formation de formaldéhyde. Une partie du formaldéhyde ainsi formé quitte le péroxisome pour aller dans le cytoplasme et continuer à être dégradée en vue de stocker de l'énergie, l'autre partie est utilisée pour fabriquer des constituants cellulaires essentiels grâce à une enzyme différente (DHAS<sup>3</sup>). Notons que ces deux enzymes, AOX et DHAS, sont présentes à de très hauts niveaux lorsque la

---

<sup>3</sup> DHAS : Synthétase Dihydroxyacétone

source de carbone est le méthanol et sont indétectables lorsque les sources de carbone sont autres telles que, par exemple, le glycérol, le glucose et l'éthanol (Egli et al., 1980). Dans les cultures en bioréacteur, l'enzyme AOX peut constituer jusqu'à 30% de la quantité totale de protéines solubles (Couderc et Barrati, 1980).

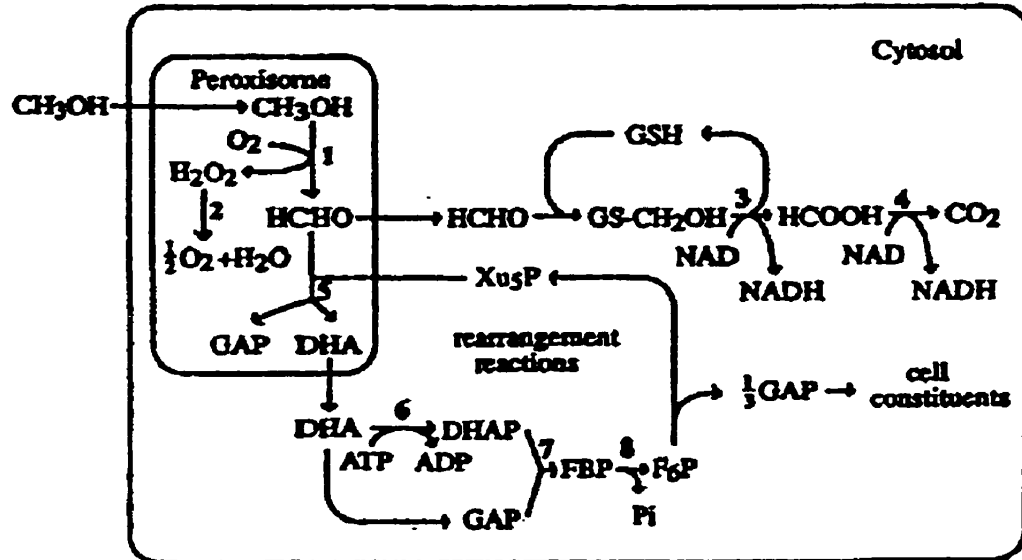


Figure 2.1 : Voie métabolique de la dégradation du méthanol dans *Pichia pastoris*. 1) enzyme AOX, 2) catalase, 3) formaldéhyde deshydrogénase (Couderc et Barrati, 1980).

### Deux promoteurs

L'enzyme AOX est donc essentielle pour dégrader le méthanol. La particularité de *Pichia pastoris* est qu'elle a dans son génome deux gènes qui codent pour cette enzyme : les gènes AOX1 et AOX2. Les deux promoteurs qui contrôlent ces gènes n'ont pas le même degré d'activité : le promoteur "1" (pAOX1) est beaucoup plus actif que le promoteur "2" (pAOX2) (Cregg et al., 1989). Ils sont tous les deux induits par le méthanol et réprimés par toute autre source de carbone (Tshopp et al., 1987). Avec ces deux promoteurs, trois phénotypes existent pour *Pichia pastoris* (Higgins et Cregg, 1998, chapitre 9) :

➤ **Phénotype Mut<sup>+</sup>** (utilisation positive du méthanol)

Ce type de souches contient les deux gènes de l'enzyme AOX, AOX1 et AOX2. Le gène de la protéine d'intérêt est ajouté consécutivement au gène AOX1, la protéine d'intérêt est donc produite simultanément avec l'enzyme AOX. Ces souches sont capables de croître à forte densité cellulaire sur le méthanol car elles fabriquent une grande quantité d'enzyme AOX. Cependant, la concentration de méthanol doit être bien contrôlée car le formaldéhyde qui est formé à la fin de la première étape du métabolisme du carbone peut être toxique pour la cellule. Cette souche consomme beaucoup de méthanol et ceci peut poser les problèmes à grande échelle car le méthanol, en grande quantité, est un produit dangereux (Annexe VII).

➤ ***Phénotype Mut<sup>S</sup> (utilisation lente du méthanol)***

Ce type de souche contient seulement le gène AOX2. Ces souches, synthétisant peu d'enzymes AOX avec le gène AOX2, ne sont pas capables de croître à haute densité cellulaire sur le méthanol mais survivent, la cellule est plus ou moins en maintenance. Quant au gène AOX1, il a été remplacé par le gène de la protéine d'intérêt (dans notre cas, la GFP). Le promoteur pAOX1 étant très actif, la protéine d'intérêt est largement produite en présence de méthanol et est très faiblement produite en présence de tout autre source de carbone. Ce système consomme peu de méthanol par rapport aux souches de phénotype Mut<sup>+</sup>. Pour faire croître préalablement les cellules à un niveau raisonnable, une autre source de carbone est utilisée (le glycérol en général).

➤ ***Phénotype Mut<sup>-</sup> (utilisation négative du méthanol)***

Ce type de souche ne contient aucun des gènes codants pour l'enzyme AOX. Ces souches ne peuvent pas croître sur le méthanol, une autre source de carbone comme le glycérol doit être utilisée. Le méthanol est toujours utile au niveau de l'expression des protéines car il induit l'action du promoteur. Cependant, comme le glycérol est aussi un répresseur pour l'activité des promoteurs, ce système est assez difficile à utiliser.

La souche que nous avons utilisée est de phénotype Mut<sup>S</sup>, elle a donc la particularité d'utiliser peu de méthanol, ce qui est moins dangereux lors du passage à grande échelle par rapport à la souche de phénotype Mut<sup>+</sup>. Elle croît sur le glycérol et elle est capable de

produire les protéines sur le méthanol et se maintenir sans autre source de carbone, ce que la souche Mut<sup>-</sup> n'est pas capable de faire puisqu'elle n'a plus de gène pour AOX.

### 2.1.1.2 Système hôte

*Pichia pastoris* est devenue au cours des dernières années un système hôte pour la production de protéines hétérologues très demandé pour les avantages cités en introduction. De plus, la société Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) a développé des systèmes clefs en main en vue de produire les protéines souhaitées (recettes de milieu de culture, stratégies de culture, souches, vecteurs...). *Pichia pastoris* présente néanmoins quelques inconvénients : des protéases existent pour certaines protéines hétérologues (Cregg et al., 1993), certaines protéines complexes ont des difficultés à être sécrétées (Scorer et al., 1993). Malgré ces inconvénients, *Pichia pastoris* est un système hôte préféré à *Saccharomyces cerevisiae* car les protéines produites par *Pichia pastoris* sont encore plus glycosylées à la manière des cellules mammifères. La partie suivante explique comment les gènes des protéines d'intérêt sont intégrés dans le génome de cette levure.

#### ***Construction de la souche contenant le gène de la protéine d'intérêt (Jetté et al., 1999)***

Quel que soit le gène étranger que l'on souhaite exprimer dans *Pichia pastoris*, cette expression se fait en plusieurs étapes (Figure 2.2).

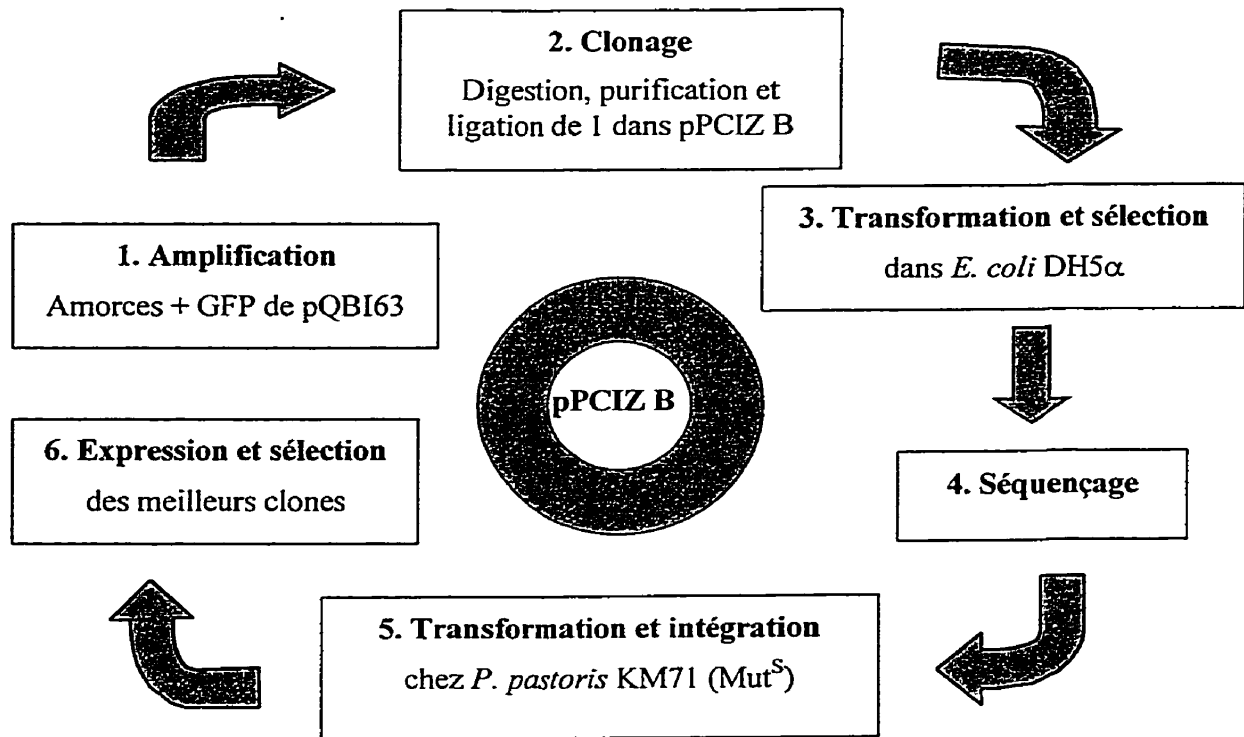


Figure 2.2 : Stratégie de clonage.

Voici la démarche employée dans le cas de l'insertion du gène de la GFP. Les chiffres entre parenthèses correspondent à ceux de la Figure 2.2.

➤ *1<sup>ère</sup> étape* : Insertion du gène dans un vecteur navette de *Pichia pastoris* et *Escherichia coli* (1-2).

Le gène de la GFP vient du plasmide pQBI63 (Figure 2.3) de Quantum Biotechnologies Inc. (Montréal, Québec, Canada). Le gène de la GFP est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) puis cloné dans le vecteur pPICZ B de Invitrogen. A la fin de cette première étape, nous obtenons certains vecteurs navettes (Figure 2.4) contenant le gène de la GFP, capable d'être exprimé dans *E. coli* et dans *Pichia pastoris*. Ce type de vecteur ne contient pas de facteur de sécrétion : la GFP sera donc produite de façon intracellulaire.

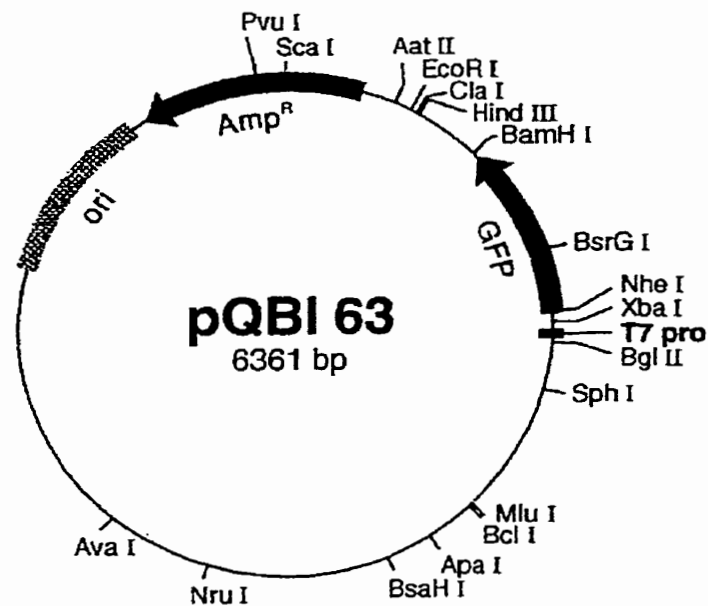


Figure 2.3 : Plasmide pQBI63 de Quantum Biotechnologies Inc.

➤ **2<sup>ème</sup> étape** : Sélection des transformants chez *E. coli* (3-4).

Le vecteur est inséré dans *E. coli* par méthode chimique et choc thermique. Ce vecteur ne s'insère pas dans le génome de la bactérie, il reste sous forme de plasmide circulaire. Les bactéries fluorescentes sont sélectionnées. L'ADN plasmidique est récolté et digéré puis le gène de la GFP est séquencé afin de vérifier l'intégrité du gène de la GFP inséré. Nous obtenons à cette étape un plasmide contenant le gène de la GFP (Figure 2.4). Nous avons utilisé *E. coli* car le vecteur plasmidique pPICZ B reste sous forme plasmidique, ce qui est plus facile à récolter pour la vérification de l'intégrité du gène et la croissance est plus rapide que dans *Pichia pastoris*.



## Stratégie 2 D

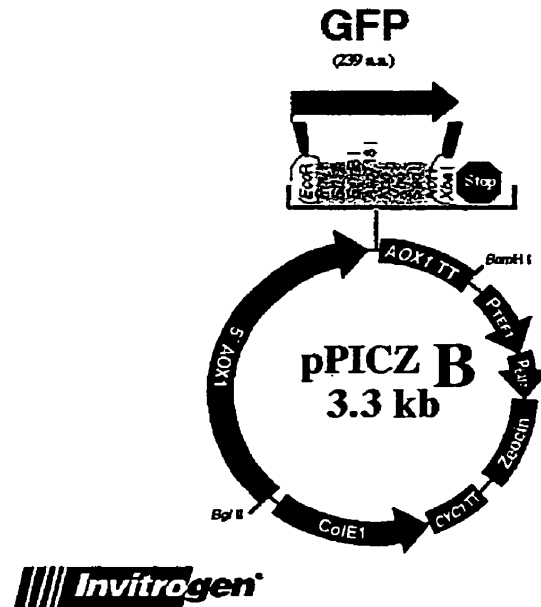


Figure 2.4 : Vecteur navette pPICZ B.

- **3<sup>ème</sup> étape** : Introduction du plasmide chez *Pichia pastoris* (5).

Le plasmide est linéarisé par ouverture grâce à une enzyme de restriction puis intégré au génome de la souche de *Pichia pastoris* KM71 d'Invitrogen (phénotype Mut<sup>S</sup>).

- **4<sup>ème</sup> étape** : Observation et sélection des souches les plus performantes avec le gène inséré (6).

L'expression de la GFP fut ensuite observée par fluorescence, SDS-PAGE et Western-Blot. La souche la plus fluorescente fut sélectionnée (souche D14). A ce stade, il n'a pas été vérifié si la souche D14 contenait une ou plusieurs copies du gène de la GFP.

### ***Multiples exemples d'application***

Pour montrer que *Pichia pastoris* est utilisée, quelques exemples de production intracellulaires ou extracellulaires de protéines sont énumérées dans le Tableau 2.1

(Cereghino et Cregg, 2000). Cerighino et Cregg ne précisent pas dans leur revue à quelle échelle ont lieu les productions suivantes.

Tableau 2.1 : Protéines hétérologues exprimées dans *Pichia pastoris*.

Origine de la protéine	Nombre actuel de protéines	Exemple de protéine et caractéristiques de production
<i>Bactéries</i>	17	$\beta$ -galactosidase de <i>E. coli</i> (intracellulaire, $2.10^3$ U/mg)
<i>Mycètes</i>	21	Invertase de <i>S. cerevisiae</i> (extracellulaire, 2,5 g/L, native)
<i>Protozoaires</i>	6	$\alpha$ -mannosidase acide de <i>Trypanosoma cruzi</i> (extracellulaire, 11,5 $\mu$ g/L, native)
<i>Plantes</i>	28	Glycolate oxydase d'épinards (Intracellulaire, 250 U/g)
<i>Invertébrés</i>	14	"Odorant-binding protein" d'abeille (ASP2) (extracellulaire, 150 mg/L, native)
<i>Mammifères</i>	46	Gelatinase B de souris (extracellulaire, 10 mg/L)
<i>Humains</i>	80	"Insulin-like growth factor-1" (IGF-1) (extracellulaire, 600 mg/L)
<i>Virus</i>	11	Antigène de surface du virus de l'hépatite B (intracellulaire, 400 mg/L)

### 2.1.2 "Green Fluorescent Protein" (GFP)

La GFP, "Green Fluorescent Protein"<sup>4</sup> (Figure 2.5), de la méduse *Aequorea victoria* a été découverte par Shimomura en 1962. La GFP aurait une fonction de communication ou de défense (Kain, 1999). Depuis quelques années, elle est devenue très populaire en biochimie et en biologie cellulaire car elle est facilement détectable grâce à la

<sup>4</sup> Protéine à fluorescence verte

fluorescence qu'elle émet lorsqu'elle est excitée. Les faits marquant l'histoire de la GFP sont le clonage par Prasher et al. (1992) et la démonstration par Chalfie et al. (1994) qu'elle est capable de fluorescer dans d'autres organismes.

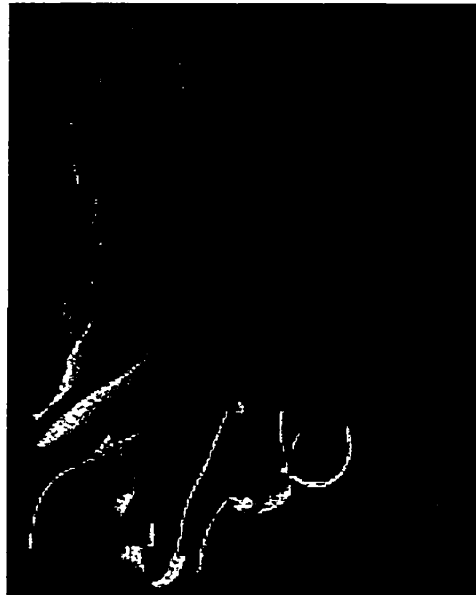


Figure 2.5 : Structure de la GFP (Nature biotechnology, Vol. 14 No. 10, oct. 1996).

### 2.1.2.1 Caractéristiques de la protéine et de ses mutants

#### *La fluorescence*

La GFP est une protéine de 238 acides aminés et d'un poids moléculaire sur SDS-PAGE compris entre 27 kDa et 30 kDa ; son activité est d'être fluorescente. Elle est fluorescente grâce à sa conformation spatiale : le chromophore de la GFP est créé après maturation par oxydation et cyclisation autocatalytique du tripeptide Ser65-Tyr66-Gly67 avec la molécule de dioxygène comme noyau central (Yang et al., 1996). Sa structure cristalline révèle une forme cylindrique composée de 11 feuillets  $\beta$  (Figure 2.5) qui lui confèrent une grande stabilité car le chromophore est à l'intérieur. Contrairement aux autres molécules bioluminescentes, la GFP n'a besoin d'aucun cofacteur pour être fluorescente (Prasher, 1995).

La GFP naturelle a deux longueurs d'onde d'excitation : une majeure à 395 nm et une mineure à 475 nm. Le pic d'émission pour ces deux longueurs d'ondes est à 508 nm (lumière verte). Cubitt et al. fournissent de plus amples explications sur les caractéristiques photochimiques et photophysiques dans sa revue de 1995. Ces longueurs d'ondes sont variables en fonction de la température, du pH et de la concentration en GFP (Tsien, 1998, Ward et al., 1982).

La GFP est très stable et se dénature dans des conditions très difficiles. Une incubation longue dans de l'urée (8 M), dans une solution d'acide chlorhydrique et de guanidine (6 M) ou dans du dodécylsulfate de sodium (1 %) n'affecte pas les caractéristiques d'émission et d'absorption de la protéine. Un traitement de deux jours avec des protéases comme la trypsine, la pancréatine, la thermolysine ou la papaine (au moins 1 mg/mL) ne diminue pas l'intensité de la fluorescence de la GFP (Ward et al., 1982, Bokman et Ward, 1981).

### *Mutants*

La GFP est très en demande car elle est stable, non toxique pour son système hôte et elle n'a pas besoin de composants supplémentaires pour fluorescer. Néanmoins, des mutants ont été développés en vue d'améliorer certaines faiblesses aux niveaux spectral et d'expression. En effet, lors de l'expression de la GFP naturelle chez des cellules mammifères, des levures et des bactéries, entre 30°C et 37°C, la GFP n'a pas toujours été bien conformée et n'a ainsi pas réussi à fluorescer. Les différents mutants de la GFP ont subi des modifications génétiques qui changent leur longueurs d'onde d'émission, améliorent l'intensité de la fluorescence...etc.

La plupart de ces mutants sont disponibles commercialement. Le mutant de la GFP utilisé, rsGFP, (red-shifted GFP) vient de la société Quantum Biotechnologies Inc. Il a été modifié en vue d'accroître l'intensité de la fluorescence, sa longévité, la solubilité de la protéine et de rendre ses propriétés spectrales optimales. Sa longueur d'onde d'excitation optimale est de 473 nm et sa longueur d'onde d'émission est de 509 nm. Ce mutant est le plus fluorescent sur le marché actuellement. Son gène peut être exprimé dans de

nombreux organismes. La rsGFP est très stable et reste fluorescente après plusieurs semaines de conservation dans des conditions appropriées (Quantum Biotechnologies Inc., 1997).

### **2.1.2.2 Diverses applications (Misteli et Spector, 1997)**

#### ➤ *Marquage protéique dans la cellule*

La GFP a tout d'abord été utilisée pour regarder à l'intérieur des cellules grâce au microscope à fluorescence. En fusionnant la GFP à une protéine que l'on veut étudier, grâce à la fluorescence, on peut localiser et comprendre des mécanismes cellulaires ou intracellulaires (Chalfie et al., 1994). Nidenthal et al. (1996) utilisèrent chez *Saccharomyces cerevisiae* la GFP en vue de faire la localisation cellulaire dans les cellules bourgeonnantes. Rossanese et al. (1999) se sont servis de la GFP pour comparer l'empilement des appareils de Golgi chez *Pichia pastoris* et chez *Saccharomyces cerevisiae*.

#### ➤ *Criblage biologique*

La GFP peut permettre grâce à la mesure rapide et facile de la fluorescence de sélectionner des composés d'intérêt. Par exemple, la GFP fut utilisée pour sélectionner des cellules contenant le gène du HIV en vue de fabriquer des médicaments (Gervais et al., 1997).

#### ➤ *Indicateur de changement du milieu*

Comme les longueurs d'onde d'excitation et l'intensité de la fluorescence de la GFP peuvent varier en fonction de la température et du pH (Ward et al., 1982), la GFP peut être utilisée comme un indicateur de changement de milieu.

#### ➤ *Suivi et contrôle de la quantité de protéine*

Grâce à la fluorescence et au fait qu'elle soit quantifiable, il est possible de quantifier la GFP exprimée et ainsi la protéine d'intérêt. Plusieurs expériences ont été faites dans cette voie d'utilisation de la GFP en vue d'améliorer la production de protéines

recombinantes : Dabrowski et al. (1999), Albano et al. (1998), Poppenborg et al. (1997) chez *E. coli*. C'est dans ce domaine d'applications que nous avons utilisé la GFP.

## 2.2 Le système de culture

Le système biologique est ainsi défini par la souche D14 de *Pichia pastoris* de phénotype Mut<sup>S</sup> contenant le gène intracellulaire de la GFP. Cette deuxième partie de la revue de littérature a pour objectif de justifier le système de culture utilisé. Elle va s'articuler de la façon suivante : un rappel sur les différents milieux de culture, le matériel et les paramètres à contrôler.

### 2.2.1 Milieux de culture

#### 2.2.1.1 Généralités (Prescott et al., 1995)

Pour obtenir de l'énergie et construire de nouveaux constituants, la cellule doit avoir une source de matériaux de base ou nutriments. Les nutriments sont des substances utilisées dans la biosynthèse et la production d'énergie et par conséquent ils sont requis pour la croissance microbienne. Deux grandes catégories de nutriments existent : les macro-éléments (macronutriments) et les oligo-éléments (ou micronutriments).

#### *Les macro-éléments*

L'analyse de la cellule microbienne montre que 95% du poids sec de la cellule est constitué de quelques éléments majeurs : carbone, oxygène, hydrogène, azote, soufre, phosphore, potassium, calcium, magnésium et fer. Les six premiers éléments (C, O, H, N, S et P) sont des constituants des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Les quatre derniers éléments existent dans la cellule à l'état de cations et jouent plusieurs rôles. Le potassium ( $K^+$ ) est nécessaire à l'activité de plusieurs enzymes y compris les enzymes qui interviennent dans la synthèse protéique. Le calcium ( $Ca^{2+}$ ) a de nombreuses fonctions dans la cellule. Le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) est un cofacteur de nombreuses enzymes, il forme un complexe avec l'ATP, stabilise les ribosomes et les

membranes cellulaires. Le fer ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ) est un cofacteur des enzymes et des protéines transporteuses d'électrons.

### ***Les oligo-éléments***

Les oligo-éléments (manganèse, zinc, cobalt, molybdate, nickel et cuivre) sont indispensables à la plupart des cellules en quantité tellement faible que les impuretés de l'eau, la verrerie et les composants habituels des milieux de culture sont généralement suffisants. Les oligo-éléments font normalement partie des enzymes et des cofacteurs, ils aident à la catalyse des réactions et au maintien de la structure des protéines. Par exemple, le zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) se trouve dans le site actif de quelques enzymes. Le manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) peut aider beaucoup d'enzymes qui catalysent le transfert de groupes phosphates.

Les éléments sont parfois classés selon les besoins nutritifs : les éléments majeurs (C, O, H, N, S, P) en g/L, les éléments mineurs (K, Ca, Mg, Fe) en mg/L et les oligo-éléments en  $\mu\text{g/L}$  ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ). Pour certains micro-organismes, il peut exister de besoins spéciaux supplémentaires.

Tableau 2.2 : Sources de macronutriments les plus souvent utilisées à l'échelle laboratoire ou industrielle.

<b>Macronutriments</b>	<b>Source la plus souvent utilisée</b>
<i>Carbone</i>	Mélasse, amidon, petit-lait, grains de céréales, déchets agricoles (épis de maïs), glycérol, glucose, méthanol, éthanol...
<i>Azote</i>	Eaux de lavage du maïs, farine de soja, ammoniacque, sels d'ammonium, nitrates, extraits de levure, peptones...
<i>Oxygène</i>	Air, agitation pour l'oxygénation, oxygène pur
<i>Hydrogène</i>	Eau
<i>Phosphore</i>	Sels de phosphate, acide phosphorique
<i>Soufre</i>	Sels de soufre, extrait de levure
<i>Potassium</i>	Sels de potassium, extrait de levure
<i>Magnésium</i>	Extrait de levure

### **2.2.1.2 Différents milieux de culture (Prescott et al., 1995)**

Deux grandes catégories de milieux de culture existent : les milieux complexes et les milieux définis. Les milieux complexes sont des milieux très riches comprenant une multitude de composants. Ces milieux sont utilisés pour produire de fortes densités cellulaires car les cellules ont tous les éléments dont elles ont besoin pour se développer. Cependant, comme ces milieux sont très riches et dans notre cas, fabriqués à partir d'extraits de levures, les concentrations exactes de chaque composant ne sont pas connues. Quant à la deuxième catégorie de milieux, les milieux définis, elle permet un grand contrôle puisque tous les concentrations sont connues. Lorsque l'on cherche par exemple quelle est l'influence de tel ou tel substrat, le milieu défini est plus facile à utiliser. Il est cependant plus onéreux et est donc moins utilisé dans un contexte industriel. Il ne permet pas toujours d'atteindre rapidement de hautes densités cellulaires.

Dans le cas de nos cultures, nous avons utilisé un milieu riche car notre objectif était d'observer la production de GFP par *Pichia pastoris* dans des conditions où les cellules ont tout ce dont elles ont besoin a priori.

### **2.2.1.3 Deux milieux de culture pour la souche D14 de *Pichia pastoris* (Higgins et Cregg, 1998)**

Comme expliqué précédemment, la souche D14 de *Pichia pastoris* est de phénotype Mut<sup>S</sup>, c'est à dire qu'elle croît faiblement avec le méthanol comme unique source de carbone. Pour cela, deux milieux sont utilisés au cours d'une culture. La première phase, appelée phase de croissance, se fait sur un milieu contenant du glycérol mais ne contenant pas de méthanol. La biomasse augmente alors rapidement. Lorsque ce substrat est épuisé, un milieu, contenant du méthanol et aucune autre source de carbone, est utilisé. Cette deuxième phase s'appelle phase de production de la protéine d'intérêt. Pendant cette seconde phase, la biomasse est constante, la cellule est plus ou moins en maintenance.



## **2.2.2 Deux systèmes de culture**

### **2.2.2.1 Introduction**

Dans le cadre de la production de protéines à l'échelle industrielle, le cheminement se fait par étape, nous commençons par des essais à petite échelle (tubes de 10 mL, Erlenmeyers de 100 mL), puis nous passons à un bioréacteur de 20 L, pour continuer ensuite dans un bioréacteur de 150 L et ainsi de suite si cela est intéressant ou nécessaire. *Pichia pastoris* est réputée pour être un bon système de production en bioréacteur. Il faut cependant essayer de produire la protéine en Erlenmeyers avant de passer en bioréacteur. Il est aussi connu que les résultats en Erlenmeyers et en bioréacteur peuvent être différents, il est donc conseillé aux utilisateurs de *Pichia pastoris* de ne pas chercher à optimiser un procédé en Erlenmeyers si l'on souhaite produire en bioréacteur par la suite (Higgins et Cregg, 1998). La méthodologie diffère pour ces deux systèmes.

### **2.2.2.2 Comparaison des deux systèmes (Tableau 2.3)**

Au niveau de la méthodologie, en Erlenmeyers, la phase de croissance dure environ 3 jours ; les cellules à la fin de cette phase sont centrifugées et resuspendues dans un milieu frais contenant le méthanol. Le méthanol est ensuite ajouté deux fois par jour au milieu de culture. D'un autre côté, en bioréacteur, la phase de croissance est plus courte (une vingtaine d'heures) car les conditions de culture sont plus optimales (meilleure agitation et meilleure aération qui facilitent le transfert d'oxygène), et lorsque le glycérol est épuisé, du méthanol est ajouté de façon discontinue. Le mode de culture en bioréacteur a deux phases : une croissance en cuvée sur glycérol sans ajout de substrat et une production avec une alimentation discontinue (fed-batch) d'un substrat (le méthanol).

Cette première différence concerne le milieu de culture. D'autres paramètres différencient ces deux modes de culture essentiellement au niveau des paramètres de contrôle (le pH, l'agitation, l'oxygénation...). Le bioréacteur permet, grâce à des sondes et un système de commande, de suivre certains paramètres. Les résultats sont ainsi plus reproductibles et permettent de développer des stratégies de contrôle.

Tableau 2.3 : Comparaison des systèmes de culture (Erlenmeyers et bioréacteur).

Paramètre	Erlenmeyers	Bioréacteur
<i>Phase de croissance</i>	3 jours	24 heures
<i>Phase de production de GFP</i>	Milieu frais	Ajout de méthanol à la culture
<i>Température</i>	Thermomètre (incubateur)	Sonde, contrôle
<i>pH</i>	Milieu tamponné	Milieu tamponné, sonde, contrôle
<i>Agitation</i>	Orbitale ou réciproque	Pales
<i>Oxygène</i>	Non contrôlé	Air insufflé, débit contrôlé, sonde

Ces deux systèmes ne se manipulent pas de la même façon. Les procédures pour l'utilisation d'un bioréacteur sont plus strictes et demandent un plus grand savoir-faire. La Figure 2.6 résume le cycle de fonctionnement du bioréacteur.

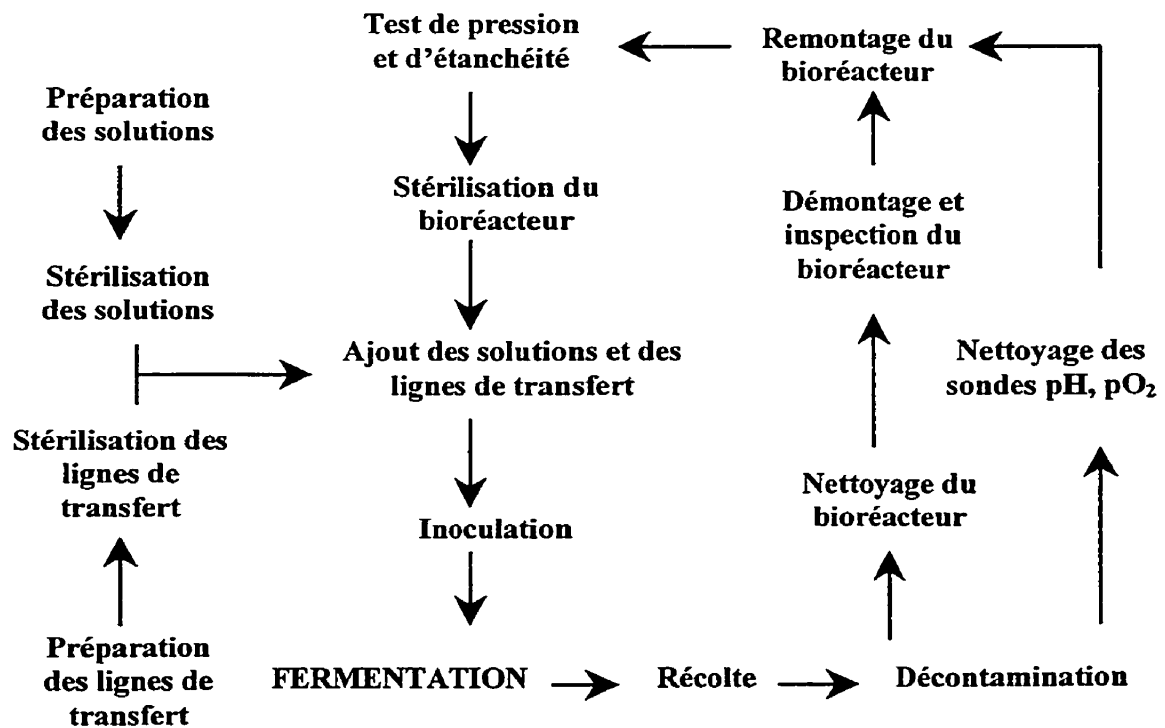


Figure 2.6 : Procédure d'entretien et d'utilisation d'un bioréacteur.

### **2.2.3 Les paramètres à contrôler**

Pour mieux comprendre et optimiser la production de protéines, de nombreux paramètres entrent en compte. Ces paramètres, en fonction du système utilisé, sont plus ou moins contrôlés.

#### **2.2.3.1 La température**

La température est un paramètre important affectant les cellules. Lorsque la température augmente vers sa valeur optimale, la vitesse de croissance double approximativement à chaque dix degrés Celsius. Au dessus de la température optimale, la vitesse de croissance chute et la quantité de cellules vivantes peut diminuer. La température optimale pour la croissance ainsi que celles pour la formation et la stabilité du produit peuvent être différentes (Prescott et al., 1995). La température est un facteur influençant la GFP (Tsien, 1998).

Pour *Pichia pastoris*, la température de croissance conseillée par Invitrogen est de 30°C, sachant qu'au delà de 32°C, l'expression des protéines est rendue difficile. La température influence la GFP car la génération du fluorophore est sensible à la température : dès que la température dépasse 30°C, l'intensité de la fluorescence diminue (Quantum biotechnologies Inc., 1997). Ce pourquoi, nous avons choisi de contrôler la température de notre système à 30°C.

Pour les cultures en Erlenmeyers agités, la température est contrôlée par un thermostat dans l'incubateur. Pour le bioréacteur utilisé, le contrôle de température se fait grâce à un échangeur de chaleur (eau chaude).

#### **2.2.3.2 Le pH**

Le pH affecte l'activité enzymatique et donc la vitesse de croissance des micro-organismes, ainsi que la production des protéines. Tout comme la température, le pH optimum peut être différent dans les deux phases de notre procédé. Pour les levures, le pH optimum se situe entre 3 et 6 (Prescott et al., 1995) et Invitrogen conseille d'utiliser

pour *Pichia pastoris* un pH compris entre 3 et 6. La GFP est stable pour un pH compris entre 5,5 et 12,2 (Quantum Biotechnologies Inc., 1997). Pour notre système de culture, le pH est d'environ 6.

Pour les cultures en Erlenmeyers, le milieu est tamponné pour avoir un pH à peu près constant. Cependant, il diminue au cours de la phase de croissance. Il est difficile dans le cas de la culture en Erlenmeyers de conserver un pH fixe. Pour la culture en bioréacteur, d'une part nous utilisons un milieu tamponné et d'autre part le pH est ajusté par un système d'ajout automatique d'acide ou de base en fonction du pH désiré. Une sonde à pH dans le bioréacteur permet de le mesurer.

### 2.2.3.3 L'oxygène

L'oxygène, pour les micro-organismes aérobies, est un élément nutritif essentiel. En effet, pour des concentrations cellulaires importantes, la vitesse de consommation de l'oxygène peut être supérieure à sa vitesse d'approvisionnement, ce qui peut entraîner une limitation pour la cellule. En dessous d'une concentration critique, la croissance est dépendante de la concentration en oxygène dissous. Au delà, la croissance et la concentration sont indépendantes (Prescott et al., 1995). Comme la souche D14 est de phénotype Mut<sup>S</sup>, elle consomme beaucoup d'oxygène en phase de croissance et très peu en phase d'induction.

L'échange gazeux et l'alimentation en oxygène se fait en Erlenmeyers par diffusion simple à travers le bouchon de mousse qui filtre l'air entrant, évitant ainsi toute contamination. L'agitation des Erlenmeyers dans l'incubateur est aussi un moyen d'oxygéner le milieu. En Erlenmeyers, notons que l'oxygénation est néanmoins très limitée et n'est pas contrôlable.

En bioréacteur, deux facteurs permettent aussi une alimentation en oxygène : l'agitation par un système de pales rotatives et l'entrée d'air, par le bas du bioréacteur, auparavant filtré pour éviter toute contamination. Notons que des travaux sont toujours en cours pour optimiser l'agitation en bioréacteur (Humphrey, 1998). Une sonde à oxygène dissous permet de suivre la concentration relative d'oxygène dans le milieu de culture. Si la

culture a besoin de beaucoup d'oxygène, le bioréacteur peut être alimenté avec de l'oxygène pur. L'oxygène dissous est un paramètre important qui permet de voir l'état des cellules (la concentration en oxygène dissous correspond à la croissance des cellules). L'agitation et l'entrée d'air permettent aussi d'homogénéiser le mélange. Cependant, si le mélange est trop agité, de la mousse peut se créer. Le niveau de mousse peut être contrôlé grâce à une sonde à mousse qui ajoute un anti-mousse chimique à la culture quand ce niveau est trop élevé. Notons qu'une grande quantité d'anti-mousse peut dénaturer les produits formés. Un brise-mousse mécanique peut aussi être utilisé à la place ou en plus de l'anti-mousse chimique pour diminuer la mousse. Le brise-mousse mécanique est cependant difficile à nettoyer et peut provoquer des contaminations.

## **CHAPITRE III**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Cette partie présente deux protocoles : un protocole concernant la fermentation en Erlenmeyers agités ou en bioréacteur et un protocole pour les gels d'électrophorèse. Ces deux protocoles ont été établis grâce aux protocoles disponibles à l'IRB (identifiés en annexe A1.1). Des informations supplémentaires peuvent être nécessaires pour utiliser tous les appareils cités : les protocoles détaillés d'utilisation des appareils sont disponibles à l'IRB (identifiés en annexe A1.1) et des protocoles complémentaires sont dans l'annexe A1.2. Ce chapitre a pour but de livrer des protocoles directement utilisables par quiconque souhaitant refaire les expériences ou les adapter.

### **3.1 Protocole de fermentation en Erlenmeyers agités ou en bioréacteur**

#### **3.1.1 Conditions de culture**

Deux catégories d'expériences ont été réalisées : des fermentations en Erlenmeyers et des fermentations en bioréacteur. Dans les deux cas, on produit de la GFP dans *Pichia pastoris*. Les protocoles ont des points communs et des différences. Une première comparaison a été établie dans les paragraphes 2.2.2 et 2.2.3 du chapitre II. Le tableau suivant illustre les valeurs des paramètres de ces deux systèmes de culture.

Tableau 3.1 : Conditions de culture pour les deux systèmes (Erlenmeyers et bioréacteur).

Paramètre	Valeur du paramètre	
	Erlenmeyers agités de 500 mL	Bioréacteur de 20 L
<i>Milieu de croissance</i>	BMGY <sup>5</sup>	BMGY <sup>5</sup>
<i>Milieu de production</i>	BMMY <sup>5</sup>	Ajout de méthanol
<i>Volume de culture</i>	100 mL dans 500 mL	14 L dans 20 L
<i>Milieu de l'inoculum</i>	BMGY	
<i>Température</i>	30°C	
<i>pH</i>	Milieu tamponné (pH variable)	pH contrôlé à 6
<i>Agitation</i>	200 tpm	Autour de 400 tpm
<i>Oxygène dissous</i>	Pas de contrôle	> 20 %
<i>Aération</i>	Pas de contrôle	7,5 L/min
<i>Anti-mousse</i>	Pas d'anti-mousse	Si nécessaire
<i>Concentration en méthanol</i>	Entre 0,2 % V/V et 0,9 % V/V	
<i>Durée de la fermentation</i>	Autour de 200 heures	Autour de 170 heures

### 3.1.2 Planification

Ce paragraphe présente visuellement les procédures en Erlenmeyers et en bioréacteur avec la Figure 3.1 et la Figure 3.2. Une des plus grandes différences entre les deux systèmes de production est au niveau du passage de la phase de croissance à la phase de production de protéines (phase d'induction) : en Erlenmeyers, on change de milieu en resuspendant les cellules dans un milieu frais alors qu'en bioréacteur, on ajoute du méthanol au milieu de croissance lorsque le glycérol est épuisé.

<sup>5</sup> Invitrogen

### 3.1.2.1 Procédure en Erlenmeyers

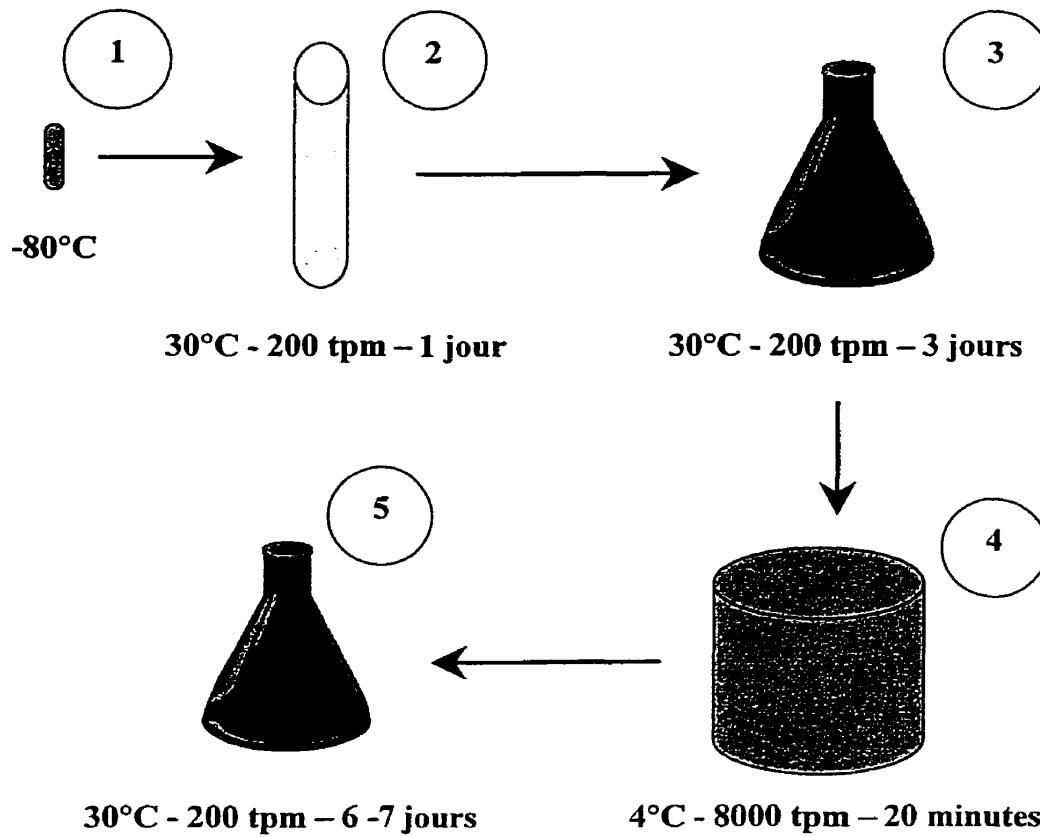


Figure 3.1 : Schéma de la procédure en Erlenmeyers : 1) tube de la banque de souche, 2) inoculation dans des tubes de 50 mL, 3) inoculation dans des Erlenmeyers de 500 mL pour la phase de croissance, 4) centrifugation, 5) resuspension des cellules dans des Erlenmeyers de 500 mL pour la production de GFP.



### 3.1.2.2 Procédure en bioréacteur

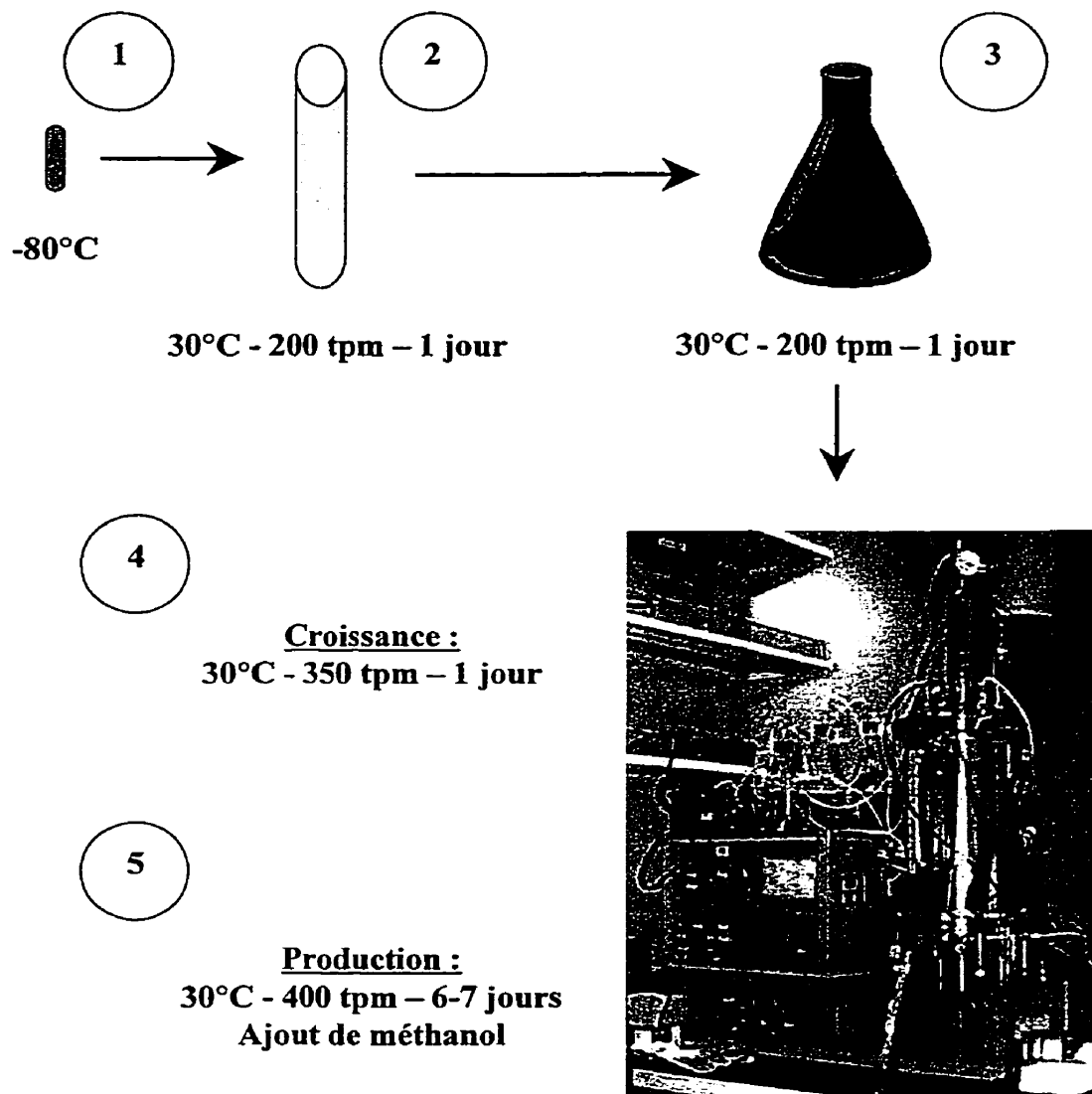


Figure 3.2 : Schéma de la procédure en bioréacteur : 1) tube de la banque de souche, 2) inoculation dans des tubes de 50 mL, 3) inoculation dans des Erlenmeyers de 500 mL pour la préparation de l'inoculum du bioréacteur, 4) inoculation du bioréacteur (phase de croissance sur glycérol), 5) ajout de méthanol toutes les 12 heures (production de GFP sur méthanol).

### 3.1.2.3 Horaire typique

#### *En Erlenmeyers*

Tableau 3.2 : Horaire pour une fermentation en Erlenmeyers.

<b>Date</b>	<b>Manipulation</b>	<b>Durée - Fréquence</b>
<i>Jour 1 et 2 (semaine 1)</i>	Préparation du milieu BMGY et du matériel	2 jours
<i>Jour 2 soir (semaine 1)</i>	Lancement des cultures en tube	
<i>Jour 3 (semaine 1)</i>	Inoculation sur le glycérol Échantillonnage une fois par jour	3 jours
<i>Jour 5 (semaine 1)</i>	Préparation du milieu BMMY	
<i>Jour 5 soir (semaine 2)</i>	Resuspension dans du milieu BMMY	Entre 5 et 10 jours
<i>Jour 6 (semaine 2)</i>	Échantillonnage toutes les 3 heures	Pendant 24 heures
<i>Jour 8 (semaine 2)</i>	Échantillonnage toutes les 12 heures	
<i>Jour 16 (semaine 3)</i>	Poids sec des cellules et FIN Nettoyage	2 jours

*En bioréacteur*

Tableau 3.3 : Horaire pour une fermentation en bioréacteur.

<b>Date</b>	<b>Manipulation</b>	<b>Durée - Fréquence</b>
<i>Jour 1 et 2 (semaine 1)</i>	Préparation des solutions Lignes de transfert Préparation du bioréacteur	
<i>Jour 3 (semaine 1)</i>	Test de pression Préparation des tubes Préparation des Erlenmeyers	1 jour
<i>Jour 4 (semaine 1)</i>	Inoculation des tubes Stérilisation du bioréacteur Ajout des lignes de transfert, des solutions	1 jour
<i>Jour 6 (semaine 1)</i>	Inoculation du bioréacteur et culture	
<i>Jour 7 (semaine 1)</i>	Induction (ajout méthanol) et culture 2 échantillons par jour	6 jours 12 heures
<i>Jour 9 et 10 (semaine 2)</i>	3 échantillons par jour	8 heures
<i>Jour 11 (semaine 2)</i>	Demi-vie	1 heure (durée)
<i>Jour 13 (semaine 2)</i>	Poids sec et FIN	
<i>Jour 14 et 15 (semaine 3)</i>	Nettoyage	2 jours

**3.1.2.4 Paramètres de suivi**

Pour chaque échantillon, une partie sera centrifugée et congelée, l'autre sera utilisée pour les analyses suivantes (Tableau 3.4). Les appareils de mesures employées sont décrits dans la paragraphe 3.1.3.1 de ce chapitre.

Tableau 3.4 : Méthode d'analyse des paramètres de suivi.

<b>Analyse</b>	<b>Méthode d'analyse</b>	<b>Fréquence d'analyse</b>
<i>Biomasse</i>	Spectrophotométrie à 600 nm	12 heures
<i>État des cellules</i>	Microscopie	12 heures
<i>Méthanol</i>	Chromatographie en phase gazeuse avec une colonne (hayesepQ) de 6 pieds à 150°C	12 heures
<i>Glycérol</i>	Chromatographie en phase liquide à haute pression	12 heures
<i>pH</i>	pH-métrie	12 heures (Erlenmeyers) et en continu (bioréacteur)
<i>Oxygène dissous</i>	Sonde en bioréacteur	En continu
<i>Température</i>	Thermomètre dans l'incubateur Sonde en bioréacteur	En continu
<i>GFP</i>	Microscopie, fluorométrie (longueur d'onde d'excitation à 485 nm et d'émission à 530 nm) et gel d'électrophorèse	12 heures
<i>Ions</i>	Chromatographie en phase liquide à haute pression	12 heures

### 3.1.3 Matériel

#### 3.1.3.1 Matériel utilisé

##### *Souche*

- Un tube cryogénique contenant la souche D14 provenant de la banque de souche, conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Un tube cryogénique contenant la souche KM71 (souche de *Pichia pastoris* de phénotype Mut<sup>S</sup> ne contenant pas le gène de la GFP). Cette souche ne fut utilisée qu'une seule fois en Erlenmeyers agités.

### ***Appareils***

- *Incubateur* : table agitante New Brunswick Scientific (Fairlawn, New Jersey, USA) 4300 (30°C et 200 tpm)
- *Centrifugeuse* : Beckman (Palo Alto, Californie, USA) ("induction drive centrifuge") model J2-21M
- *Bioréacteur* : CHEMAP S-20 (Volkestwill, Suisse)
- *Microscope* : Zeiss Germany Axioskop (400 X et 1000 X)
- *Microscope à fluorescence* : Leitz Wetzlar Germany (500 X et 1250 X)
- *Spectrophotomètre* : DU 640 Beckman (Palo Alto, Californie, USA)
- *Balance de poids secs* : SARTORIUS (VWR Scientific, Mont-Royal, Québec, Canada) MA 30
- *Fluoromètre* : Cytofluor 2300 de Millipore (Marlborough, Massachusetts, USA)
- *Gel d'électrophorèse* : kit BIO-RAD (Hercules, Californie, USA)
- *pH-mètre* : FISHER (Fairlawn, New Jersey, USA) Accumet pH-mètre 815MP
- *Chromatographie en phase gazeuse* : Cappillary Chromatograph Perkin Elmer (Norwalk, Cincinnati, USA) sigma 2000
- *HPLC pour le glycérol* : Waters Millennium<sup>32</sup> (Mississauga, Ontario, Canada) (mesures réalisées par Michael Trani, IRB)
- *HPLC pour les concentrations ioniques* (mesures réalisées par Luc Lavoie, École Polytechnique de Montréal)

### ***Contenants***

#### *Expériences en Erlenmeyers agités*

- 3x50 mL tubes Sarstedt (Nümbrock, Allemagne) pour l'inoculum

- 9x500 mL Erlenmeyers contenant 150mL de milieu BMGY
- 6x250 mL bouteilles Beckman (Palo Alto, Californie, USA) stériles pour centrifuger les cellules
- 3x500 mL Erlenmeyers contenant 100 mL de milieu BMMY

#### *Expériences en bioréacteur*

- 3x50 mL tubes Sarstedt (Nümbrock, Allemagne) pour l'inoculum du bioréacteur
- 3x500 mL fioles pour l'inoculum du bioréacteur
- Éprouvettes à stériliser pour préparer les lignes de transferts :
  - 2x1 L (YNB et tampon)
  - 3x500 mL (acide, base et méthanol)
  - 1x250 mL (anti-mousse : struktol)
  - 1x100 mL (biotine)
- Filtre à air
- 1x2 L Erlenmeyer pour l'addition du tampon 1M PO<sub>4</sub> et la solution 500X<sup>6</sup> Biotine
- 1x2 L Erlenmeyer pour l'addition de la solution 10X YNB
- 1x500 mL Erlenmeyer pour l'addition de la solution 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- 1x500 mL Erlenmeyer pour l'addition de la solution 2M NH<sub>4</sub>OH
- 1x1 L Erlenmeyer pour l'addition du méthanol
- 1x500 mL Erlenmeyer pour l'addition de l'inoculum
- 1x500 mL Erlenmeyer pour l'addition de Struktol

---

<sup>6</sup> 500X signifie que le volume de solution qui doit être ajouté au milieu est de 1/500<sup>ème</sup> du volume final.

### 3.1.3.2 Solutions

Notez que les solutions utilisées pour les expériences en Erlenmeyers agités et en bioréacteur sont les mêmes, seuls les volumes diffèrent. Pour éviter toute redondance, les recettes des solutions ne sont présentées dans cette partie que pour les expériences en bioréacteur. Pour les expériences en Erlenmeyers, veuillez vous référer à l'annexe A 1.2.

#### *Solution de 500X Biotine (Concentration finale voulue : $4 \cdot 10^{-4}$ g/L)*

- Dissoudre les ingrédients suivants :

Tableau 3.5 : Solution de biotine.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
Biotine	SIGMA (Saint-Louis, Missouri, USA)		20 mg	
H <sub>2</sub> O zénopure	IRB		100 mL	

- Stériliser la solution par filtration dans une unité de 250 mL et un filtre de 0,2 µm.
- Étiqueter le récipient avec la date d'expiration (un an) et conserver stérilement la solution à 4°C.

#### *Solution de struktol (concentration 5 % V/V)*

- Dissoudre les ingrédients suivants :

Tableau 3.6 : Solution de struktol.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
Struktol	Struktol Compagny of America (Stow, Ohio, USA)		10 mL	
H <sub>2</sub> O zénopure	IRB		190 mL	

- Stériliser la solution à l'autoclave.

- Étiqueter le récipient et conserver stérilement à température ambiante.

***Tampon 5X PO<sub>4</sub> de concentration 1 M (concentration finale voulue : 1 mM)***

Tableau 3.7 : Solution de 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	BDH (Toronto, Ontario, Canada)		87,09 g	
H <sub>2</sub> O	IRB		500 mL	

Tableau 3.8 : Solution de 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	BDH (Toronto, Ontario, Canada)		272,18 g	
H <sub>2</sub> O	IRB		2000 mL	

Tableau 3.9 : Mélange.

Ingrédient	Quantité	Date et Initiales
1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	264 mL	
1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1736 mL	

- Vérifier le pH, il doit être près de 6. Sinon il faut l'ajuster en ajoutant de l'acide sulfurique. Noter le nouveau pH ainsi que la quantité d'acide ajouté.
- Stériliser la solution tampon à l'autoclave et conserver cette solution stérilement à la température de la pièce (un an).

***Solution de 10X YNB (concentration finale voulue : 13,4 g/L)***

- Dissoudre les ingrédients suivants. Il peut être nécessaire de chauffer pour dissoudre les ingrédients et d'ajouter quelques millilitres d'acide chlorhydrique.



Tableau 3.10 : Solution de YNB.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
YNB sans acide aminé	Difco (Détroit, Michigan, USA)		272 g	
H <sub>2</sub> O zénopure	IRB		2000 mL	

- Stériliser la solution par filtration dans deux unités de 1000 mL avec un filtre de 0,2 µm.
- Étiqueter le récipient avec la date d'expiration (un an) et conserver à 4°C.

***Solution basique de NH<sub>4</sub>OH 2M***

- Mélanger les ingrédients suivants :

Tableau 3.11 : Solution basique.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
NH <sub>4</sub> OH (14,8 M)	Anachemia (Montréal, Québec, Canada)		68 mL	
H <sub>2</sub> O zénopure	IRB		432 mL	

- Stériliser par filtration avec **un filtre compatible** à la solution.
- Étiqueter le récipient et conserver à la température ambiante (un an).

***Solution acide de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2M***

- Mélanger les ingrédients suivants :

Tableau 3.12 : Solution d'acide.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Dates Initiales
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (16 M)	Fisher (Fairlawn, New Jersey, USA)		62 mL	
H <sub>2</sub> O zénopure	IRB		438 mL	

- Stériliser par filtration avec **un filtre compatible** à la solution.
- Étiqueter le récipient et conserver à la température ambiante.

***Solution de méthanol (concentration de 100% V/V)***

Tableau 3.13 : Solution de méthanol.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Dates Initiales
Méthanol	EMScience (Gibbstown, New jersey, USA)		900 mL	

- Stériliser la solution par filtration dans une unité de 1000 mL avec un **filtre compatible** à la solution.
- Étiqueter avec la date d'expiration (deux mois) et conserver stérilement dans l'unité de stockage des produits dangereux.

***Solution saline (Concentration 8,5 g/L)***

- Mélanger les ingrédients suivants :

Tableau 3.14 : Solution saline.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
NaCl	ACP (Montréal, Québec, Canada)		8,5 g	
H <sub>2</sub> O	IRB		1000 mL	

- Stériliser à l'autoclave.

- Étiqueter avec la date d'expiration (un an) et conserver stérilement à la température de la pièce.

### ***Solution du BMGY***

Tableau 3.15 : Recette Invitrogen.

<b>Ingrédient</b>	<b>Concentration</b>
Extrait de levure	10 g/L
Bacto-peptone	20 g/L
Glycérol ( $\rho = 1.26 \text{ g/mL}$ )	1 % V/V
H <sub>2</sub> O	1000 mL

- Dissoudre les ingrédients dans 80 % du volume total (500 mL) pour tenir compte des solutions qui seront ajoutées après la stérilisation.

Tableau 3.16 : Solution BMGY.

<b>Ingrédient</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Numéro de lot</b>	<b>Quantité</b>	<b>Date Initiales</b>
Extrait de levure	GIBCOBRL (Paisey, Écosse)		5 g	
Bacto-Peptone	DIFCO (Détroit, Michigan, USA)		10 g	
Glycérol	BDH (Toronto, Ontario, Canada)		6,3 g	
H <sub>2</sub> O	IRB		400 mL	

- Remplir les fioles comme suit avec le BMGY préparé :

Tableau 3.17 : Volume de BMGY à ajouter.

<b>Quantité</b>	<b>Erlenmeyer</b>	<b>Volume ajouté</b>	<b>Total</b>
3	500 mL	80 mL	240 mL
	<b>Tube</b>	<b>Volume ajouté</b>	<b>Total</b>
3	50 mL	8 mL	24 mL

- Stériliser les Erlenmeyers à l'autoclave.
- Quand les Erlenmeyers et les tubes ont refroidi, ajouter les ingrédients suivants à chacun.

Tableau 3.18 : Composition des Erlenmeyers.

Erlenmeyer	Solution	Quantité	Date et initiales
100 mL / 500 mL	Milieu BMGY	80 mL	
	Tampon 1M PO4	10 mL	
	10X YNB	10 mL	
	500X Biotine	0,2 mL	
Tube	Solution	Quantité	Date et initiales
10 mL / 50 mL	Milieu BMGY	8 mL	
	Tampon 1M PO4	1 mL	
	10X YNB	1 mL	
	500X Biotine	0,02 mL	

***Préparation des solutions à ajouter au bioréacteur***

- Préparer le bioréacteur suivant les procédures en vigueur à l'IRB.
- Préparer le milieu BMGY pour 14 L dans 3 L :

Tableau 3.19 : Solution BMGY.

Ingrédients	Fournisseur <sup>7</sup>	Numéro de lot	Quantité	Dates Initiales
Extrait de levure	GIBCOBRL		140 g	
Bacto-peptone	DIFCO		280 g	
Glycérol	BDH		210 g	
H <sub>2</sub> O	IRB		3000 mL	

- Ajouter le milieu BMGY et de l'eau zénopure au bioréacteur

<sup>7</sup> Voir le Tableau 3.16 pour les références sur les fournisseurs.

Tableau 3.20 : Volume à ajouter dans le bioréacteur.

<b>Ingrédients</b>	<b>Quantité</b>	<b>Date et initiales</b>
BMGY	3000 mL	
H <sub>2</sub> O zénopure	7800 mL	

- ❑ Stériliser le bioréacteur pendant 30 minutes à 1,2 bar (pression relative) et à 121°C, noter la date, la température, la durée, la vitesse d'agitation et le pH après stérilisation.
- ❑ Une fois la pression relative du bioréacteur à 0,4 bar, ouvrir la valve et faire attention à la pression.
- ❑ Une fois le bioréacteur refroidi à 30°C, ajouter le filtre à air, ajuster la vitesse d'agitation et le débit d'air, puis ajouter au bioréacteur, par leur circuit d'alimentation respectif, grâce à une pompe, les solutions suivantes :
  - 1400 mL de 1M PO<sub>4</sub>
  - 1400 mL de 10X YNB + 28 mL de 500X Biotine
- ❑ Noter le pH après addition.
- ❑ Installer les courants d'alimentation suivants :
  - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2M + pompe à 20 tpm
  - NH<sub>4</sub>OH 2M + pompe à 20 tpm
  - MeOH 100%V/V + pompe à 60 tpm (débit : 50 mL/min)
  - Struktol 5%V/V + pompe à 20 tpm (débit : 17 mL/min)
- ❑ Ajuster le pH à 6.
- ❑ Ajuster la vitesse d'agitation et régler le débit d'air.
- ❑ Calibrer le degré d'oxygénation et vérifier la valeur finale (100%).
- ❑ Le bioréacteur est prêt pour être inoculé.

### 3.1.4 Méthodes

#### 3.1.4.1 Déroulement d'une culture en Erlenmeyers

##### *Inoculation*

- Inoculer deux tubes de 50 mL contenant 10 mL de milieu BMGY avec un tube de la souche D14.
- Inoculer un tube de 50 mL contenant 10 mL de milieu BMGY avec la souche KM71.
- Incuber pendant environ une nuit à 30°C et à 200 tpm.
- Au bout d'une nuit, examiner les tubes au microscope pour l'état des cellules.

##### *Croissance*

- Ajouter 2 mL des tubes contenant D14 dans 6 fioles de 500 mL contenant 150 mL de milieu BMGY sous la hotte biologique.
- Ajouter 1 mL des tubes contenant KM71 dans 3 fioles de 500 mL contenant 150 mL de milieu BMGY sous la hotte biologique.
- Les identifier avec le numéro de la souche, l'heure, la date.
- Prendre un échantillon de 2 mL à  $t = 0$  h et toutes les 24 h (mesure du pH, de la biomasse et observation au microscope).
- Faire pousser dans l'incubateur à 30°C et à 200 tpm pendant 2 à 3 jours.

##### *Production (induction)*

- Après 3 jours, centrifuger les cultures dans les 6 bouteilles Beckman (Nümbrecht, Allemagne) stériles selon le protocole suivant :

Tableau 3.21 : Composition de bouteilles pour la centrifugation.

Bouteille	Contenu	Volume
1	La moitié des Erlenmeyers 1, 5 et 2	138 mL
2	La moitié des Erlenmeyers 3, 6 et 2	138 mL
3	La moitié des Erlenmeyers 7, 8 et 9	138 mL
1'	La moitié des Erlenmeyers 1, 5 et 2	138 mL
2'	La moitié des Erlenmeyers 3, 6 et 2	138 mL
3'	La moitié des Erlenmeyers 7, 8 et 9	138 mL

- Les centrifuger (20 minutes, 4°C, 5000 tpm ).
- Se débarrasser du surnageant et resuspendre les cellules aseptiquement avec un peu de milieu BMMY préparé dans les Erlenmeyers de 500 mL puis ajouter les cellules resuspendues dans les Erlenmeyers correspondants.
- Incuber à 30°C et à 200 tpm.
- Échantillonner à t = 0 h et toutes les 12 heures au moins (mesure du pH, de la biomasse, du méthanol, de la fluorescence, observation au microscope) puis congeler les échantillons identifiés à - 20°C (on congèle le culot et le surnageant).
- Ajuster la concentration de méthanol avec la solution de méthanol pure toutes les 12 h ou 24 h si nécessaire. Faire attention aux diminutions de volume.
- Reprendre un échantillon pour vérifier la concentration en méthanol.
- A la fin, prendre un échantillon de 10 mL dans des tubes, faire les mesures habituelles, mesurer le poids sec des cellules et congeler 3 tubes (les cellules, le surnageant et le milieu global).
- Décontaminer les fioles dans l'autoclave prévue à cet effet (durée : 90 minutes).

### 3.1.4.2 Déroulement d'une culture en bioréacteur

#### *Inoculation des fioles*

- Inoculer les 3 tubes de 50 mL contenant 10 mL de milieu BMGY avec le contenu d'un vial de la banque de souche pendant une nuit à 30°C et à 200 tpm.
- Au bout d'une nuit, examiner le contenu des tubes au microscope pour observer l'état des cellules.
- Ajouter 8 mL de chaque tube dans chaque fiole de 500 mL et incuber les 3 fioles pendant environ une nuit à 30°C et à 200 tpm.
- Au bout d'une nuit, examiner le contenu des fioles au microscope pour vérifier la pureté des cellules.

#### ***Inoculation du bioréacteur et croissance***

- Mettre en route et calibrer le système de contrôle du pH.
- Démarrer le système d'acquisition de données.
- Inoculer le bioréacteur avec l'inoculum de 300 mL.
- Prendre un échantillon à  $t = 0$  h et deux fois par jour, mesurer le pH, la densité optique (DO), la concentration en glycérol et observer au microscope.
- Maintenir le degré d'oxygénation au-dessus de 20 %. Si nécessaire, augmenter l'agitation et / ou enrichir l'air en O<sub>2</sub>.

#### ***Production (induction)***

- Lorsque le glycérol est totalement consommé, démarrer l'induction en ajoutant du méthanol au bioréacteur.
- Échantillonner à  $t = 0$  h et toutes les 12 heures au moins (mesure de la biomasse, du méthanol, de la fluorescence, observation au microscope) puis congeler les échantillons identifiés à -20°C (on congèle le culot en vue de faire des gels).
- Ajouter 50 mL de méthanol toutes les 12 h qui vise à maintenir une concentration en méthanol entre 0,2 % V/V et 0,9 % V/V.



- Entre 60 h et 100 h, faire un échantillonnage toutes les 8 h.
- En fin de fermentation, quantifier la quantité d'acide, de base, d'anti-mousse et de méthanol qui ont été ajoutées au bioréacteur.
- Suivre le cycle de nettoyage du bioréacteur selon les procédures en vigueur à l'IRB (Figure 2.6).

### 3.1.4.3 Échantillonnage

#### *Phase de croissance avant l'inoculation du bioréacteur*

- Prélever 1 mL dans chaque fiole avec une pipette stérile de 1 mL.
- Déposer une goutte sur une lame de microscope.
- Mesurer la densité optique (méthode de dilution<sup>8</sup>).
- Mesurer le pH du surnageant.

#### *Phase de croissance en bioréacteur ou en Erlenmeyers*

- Prendre un échantillon de 15 mL (bioréacteur) ou 1,5 mL (Erlenmeyers).
- Déposer une goutte sur une lame de microscope.
- Mesurer la densité optique.
- Mesurer la quantité de glycérol (300 µL de surnageant filtré).
- Mesurer le pH.

#### *Phase de production en bioréacteur ou en Erlenmeyers*

- Prendre un échantillon de 15 mL (bioréacteur) ou 1,5 mL (Erlenmeyers).

---

<sup>8</sup> Des informations plus précises sur la mesure de densité optique sont données dans le paragraphe 4.1.2.2 du chapitre IV.

- Ajuster la concentration en méthanol en fonction de l'objectif.
- Déposer une goutte sur une lame de microscope.
- Mesurer la densité optique.
- Mesurer la fluorescence (fluorescence du surnageant, fluorescence des cellules resuspendues dans l'eau saline et fluorescence du milieu total<sup>9</sup>).
- Mesurer la concentration en méthanol (mesure de la concentration du méthanol dans le surnageant)
- Mesurer le poids sec de l'échantillon final (5 fois).

#### ***Conservation des échantillons***

- Conserver le culot, la culture entière, le surnageant dans des tubes de 1,5 mL et le surnageant dilué 20 fois (eau zénopure) dans des bouteilles de HPLC (pour mesurer les concentrations ioniques).

#### **3.1.4.4 Demi-vie de la GFP**

À faire deux fois : une fois vers 50 h et une fois vers 150 h de fermentation. Cette expérience a été réalisée en bioréacteur uniquement en vue de vérifier la stabilité de la GFP dans la levure *Pichia pastoris*.

- Prendre trois échantillons de 10 mL de culture.
- Centrifuger les cellules.
- Resuspendre les cellules dans une solution saline (0,85 % P/V NaCl) jusqu'à 20 mL dans un tube de 50 mL.
- Mesurer la fluorescence et la densité optique au départ.

---

<sup>9</sup> Des informations plus précises sur la mesure de fluorescence sont données dans les paragraphes 4.1.2.2 et 4.2.1 du chapitre IV.

- Incuber dans l'incubateur à 30°C et 200 tpm.
- Mesurer la fluorescence une fois par jour (à adapter en fonction des résultats obtenus).
- Tracer la courbe et estimer la demi-vie de la GFP si c'est possible.

#### **3.1.4.5 Observation au microscope**

À faire une fois par jour (environ 5 fois au cours de l'induction). Cette observation a pour but de vérifier si les cellules produisent la GFP uniformément ou pas.

Pour une dilution fixée, compter dans 5 champs différents (environ 100 cellules par champ) :

- Le nombre de cellules totales,
- Le nombre de cellules fortement fluorescentes,
- Le nombre de cellules moyennement ou faiblement fluorescentes.

#### **3.1.4.6 Vérification de la méthode d'échantillonnage**

Pour un échantillon de 15 mL, prélever 5 fois 1 mL et répéter la procédure d'échantillonnage habituelle.

### **3.2 Protocole pour les gels d'électrophorèse**

Un gel d'électrophorèse permet de séparer différentes protéines suivant leur poids moléculaire. C'est donc un moyen de vérifier quelles sont les protéines produites ainsi que leur quantité approximative par le système en comparant avec des standards de poids moléculaires connus.

### 3.2.1 Solutions utilisées

#### 3.2.1.1 5X "Running Buffer" (5X RB)

- 15 g de Tris Base.
- 72 g de glycine.
- 5 g de SDS.
- 1000 mL d'eau zénopure.

#### 3.2.1.2 "Running Buffer" (RB)

- 400 ml d'eau zénopure.
- 100 ml de tampon 5XRB.

#### 3.2.1.3 Standard de poids moléculaire faible "Low Molecular Weight" (LMW)

Mettre 100  $\mu$ L de tampon 20mM Tris-HCl pH 8,8 dans l'ampoule de Pharmacia.

Laisser dissoudre **sans agitation** pendant 20 minutes au minimum.

#### 3.2.1.4 "Sample Buffer" (SB)

- 2,5 mL de 0,5 M Tris-HCl pH 6,8.
- 2 mL de glycérol.
- 2 g de SDS.
- 2,5 mL de bromophénol.
- Compléter à 20 mL avec de l'eau zénopure.

#### 3.2.1.5 Colorant : Bleu de Coomassie R-250

- 400 mL de méthanol.
- 1 g de Bleu de Coomassie R-250.

- 100 mL d'acide acétique glacial.
- 500 ml d'eau déminéralisée.
- 1. Ajouter le méthanol.
- 2. Agiter pour solubiliser.
- 3. Ajouter acide acétique et agiter.
- 4. Ajouter l'eau et agiter.
- 5. Filtrer (accessoire).

#### **3.2.1.6 Décolorant**

- 600 mL d'eau zénopure.
- ▣ 100 mL d'acide acétique glacial.
- 300 ml de méthanol.

#### **3.2.1.7 Fixateur**

- 800 mL d'eau zénopure.
- 100 mL d'acide acétique.
- 100 mL de glycérol.

### **3.2.2 Préparation des échantillons**

#### **3.2.2.1 Briser les cellules**

Pour briser les cellules, nous avons utilisé une méthode à la fois mécanique et chimique.

#### ***Préparation du tampon pour briser les cellules (recette Invitrogen)***

*1<sup>ère</sup> étape : solution sans l'inhibiteur de protéase IX*

- Dissoudre les ingrédients suivants dans une fiole jaugée de 1L :

Tableau 3.22 : Solution sans inhibiteur de protéase.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
Phosphate de sodium (monobasique)	ACP (Montréal, Québec, Canada)		6 g	
EDTA	SIGMA (Saint-Louis, Missouri, USA)		672 mg	
Glycérol	BDH (Toronto, ontario, Canada)		62,5 g (50 mL)	
H <sub>2</sub> O zénopure	IRB		900 mL	

- Mesurer le pH et ajouter de la soude (NaOH) pour obtenir un pH de 7,4.
- Noter la quantité de NaOH ajouté ainsi que le pH final.
- Compléter avec de l'eau pour avoir 1 L.
- Étiqueter et conserver cette solution à 4°C.

*2<sup>ème</sup> étape : tampon*

- Juste avant de briser les cellules de *Pichia pastoris*, préparer le tampon.
- Dans un tube de 15 mL, ajouter les ingrédients suivants :

Tableau 3.23 : Solution pour briser les cellules.

Ingrédient	Fournisseur	Numéro de lot	Quantité	Date Initiales
Solution de l'étape 1			10 mL	
PMSF (toxique)	SIGMA (Saint-Louis, Missouri, USA)		1,74 mg	

- Sous la hotte chimique, ajouter avec des gants et un masque la quantité de PMSF (zone 3) nécessaire en utilisant une balance de précision.
- Cette solution ne se conserve pas, avant de la jeter, ajouter de la soude pour la rendre inactive.

### ***Préparation de l'échantillon***

- Décongeler le culot de 1 mL de culture, le mettre ensuite dans de la glace.
- Ajouter 500 µL de la solution de tampon et diluer.
- Dans un micro-tube stérile de 2 mL de Sarstedt (Nümbrecht, Germany) de référence 72.694.006, ajouter 500 µL de billes de verre (425-600 µm) et l'échantillon à traiter.
- Mettre dans l'appareil prévu à cet effet (agitateur très rapide) de Biospecproducts (Bartlesville, Oklahoma, USA) les 8 échantillons et laisser tourner pendant 5 minutes.
- Prélever le maximum de solution dans un tube et centrifuger de nouveau.
- Isoler le surnageant.
- Le congeler ou l'utiliser tout de suite pour faire le gel.

### **3.2.2.2 Solution**

- Préparer 500mL de tampon RB puis mettre à 4°C.
- Faire chauffer le tube de 250 µL de SB 10 minutes à 40°C, puis rajouter 40 µL de 2-beta-mercaptoéthanol sous la hotte chimique, mélanger.

### **3.2.2.3 Composition des échantillons**

- Remplir la feuille de suivi en annexe A 1.4.
- 5 µL de LMW de Pharmacia biotech (Baie d'urfée, Québec, Canada)+ 15 µL de RB + 10 µL de SB<sup>10</sup>.
- 20 µL d'échantillon + 10 µL de SB<sup>10</sup>.
- Faire bouillir les échantillons pendant 5 minutes puis les centrifuger.

---

<sup>10</sup>Il doit être ajouté en dernier sous la hotte chimique.

### 3.2.3 Préparation du gel

- Utiliser l'unité EB2 (source de courant) et EB1 (kit d'électrophorèse).
- Pour un seul gel, utiliser une plaque en verre dans le support opposé.
- Le gel va sur le côté opposé aux vis (entre la plaque de plastique et le support).
- Découper avec une lame de rasoir le bas du gel puis enlever la lisière de plastique protectrice (ne pas enlever la couche de plastique en entier).
- Enlever doucement le peigne puis laver les puits avec le tampon RB en évitant de faire des bulles.
- Placer le gel coté plastique vers le tampon sur le support en ayant les vis derrière, puis visser en diagonale.
- Mettre les deux supports avec les gels sur le support à électrophorèse.
- Remplir la chambre supérieure avec le tampon RB et faire attention aux fuites ; sinon, il faut recommencer l'opération.
- Placer le support dans le bassin en ayant le mot bio-rad en face de nous et la borne rouge à gauche.
- Remplir la bassin avec du tampon RB et éliminer les bulles en dessous du gel avec une pince.
- Remplir les puits avec 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon en prenant une seringue Hamilton (Fisher Scientific, Fairlawn, New Jersey, USA) (rincer trois fois la seringue avec de l'eau zénopure). Il faut remplir assez vite les puits pour éviter tout phénomène de diffusion entre les puits.

### 3.2.4 Migration du gel

- Faire migrer les échantillons avec un courant de 70 V pendant 15 minutes (La migration a lieu dans le gel de concentration) puis utiliser un courant de 140 V



pendant environ une heure (migration dans le gel de migration). Vérifier que les bulles montent dans le tampon (circulation – vers +).

### **3.2.5 Coloration, décoloration et conservation**

#### **3.2.5.1 Coloration**

- Enlever avec une lame de rasoir le plastique protecteur sur un des côtés du gel. Ouvrir délicatement la plaque de verre recouvrant le gel. Enlever la dent du côté droit (puits # 1) et faire glisser le gel dans le bassin de décoloration.
- Ajouter la solution de coloration et agiter pendant 20 min.
- Recouvrir le bassin avec du Parafilm.

#### **3.2.5.2 Décoloration**

Pour cette étape, faire selon la coloration désirée.

- Vider la cuve et ajouter un bain de décoloration pendant 30 minutes en utilisant une spatule en bois.
- Recouvrir le bassin avec du Parafilm.
- Recommencer l'opération une fois pendant 30 minutes, une fois pendant 2 à 3 h. On peut aussi laisser les gels dans le même bain de décoloration plus de 20 h.
- Nettoyer le gel avec un coton pour enlever le surplus de colorant.

#### **3.2.5.3 Fixation**

- Vider et ajouter la solution de fixation pendant 30 minutes.

#### **3.2.5.4 Séchage et conservation**

- ▣ Couper les puits du gel et faire une encoche dans le coin gauche.

- Mouiller une feuille de Cellophane 15 secondes dans le bassin et déposer celle-ci sur le support.
- Poser et centrer le gel sans faire de bulle.
- Recouvrir le gel d'une autre feuille de Cellophane préalablement trempée 15 secondes dans le bassin sans faire de bulle.
- Scanner le gel.
- Laisser sécher verticalement le gel grâce au support pendant une nuit.

## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Ce chapitre rassemble les résultats des premières expériences en Erlenmeyers qui ont permis de confirmer les résultats établis par Favre et Borel-Giraud (1999) au niveau de la production intracellulaire de GFP par *Pichia pastoris*. Il rassemble aussi des résultats nécessaires à la compréhension du chapitre V en particulier sur la mesure de la fluorescence.

#### 4.1 Expériences en Erlenmeyers

##### 4.1.1 Objectifs

Deux expériences en Erlenmeyers ont été réalisées dans le cadre de ce projet. L'objectif principal de ces expériences était de se familiariser avec l'environnement et d'apprendre les méthodes de manipulation en adaptant certaines expériences réalisées par Favre et Borel-Giraud (1999). Dans la première expérience, la souche ne contenant pas le gène de la GFP a servi de témoin et deux stratégies d'alimentation pour le méthanol ont été testées en vue d'observer l'influence de celles-ci sur la production de GFP dans *Pichia pastoris*.

Une deuxième expérience fut menée en vue d'améliorer les procédures apprises lors de la première expérience pour être capable de préparer une expérience en bioréacteur. Lors de cette deuxième expérience, nous avons essayé de quantifier la fluorescence (la mesure de la fluorescence lors de la première expérience était problématique). La phase de production a été prolongée en vue d'observer le comportement de la culture au niveau de la biomasse et de la production de GFP durant une induction prolongée.

## 4.1.2 Résultats

Les principaux résultats nécessaires à la compréhension du projet sont les suivants : les deux phases (croissance et production de GFP) étaient présentes, le rôle de l'alimentation en méthanol peut influencer la production de GFP, *Pichia pastoris* est un bon système de production de la GFP, sans fuite majeure, la fluorescence est bien due à la GFP et des problèmes liés aux analyses de fluorescence et de biomasse ont été soulevés.

### 4.1.2.1 Résultats liés à la cellule

Le système comporte bien deux phases : une phase de croissance sur glycérol et une phase de production de GFP sur méthanol. Pendant la phase de croissance sur glycérol, la levure croît avec un taux spécifique de croissance<sup>11</sup>  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ . Pendant la phase de production, la croissance est très faible et la biomasse est presque constante (Figure 4.1). L'augmentation brutale de la DO au moment de l'induction est liée à la stratégie employée : trois cultures ont été resuspendues dans un milieu frais pour la phase d'induction ce qui augmente la biomasse (voir le paragraphe 3.1.4.1 du chapitre III pour plus de détails). Les deux souches de *Pichia pastoris*, avec et sans le gène de la GFP, ont des évolutions similaires en biomasse. Aucune production de GFP ne fut observée au microscope pendant la phase de croissance. Le méthanol active donc bien les promoteurs pAOX1 pour la synthèse de la GFP et pAOX2 pour la synthèse de l'oxydase d'alcool puisqu'on a une consommation de méthanol et une augmentation de la fluorescence.

---

<sup>11</sup> Méthode de détermination de  $\mu$  en annexe II.

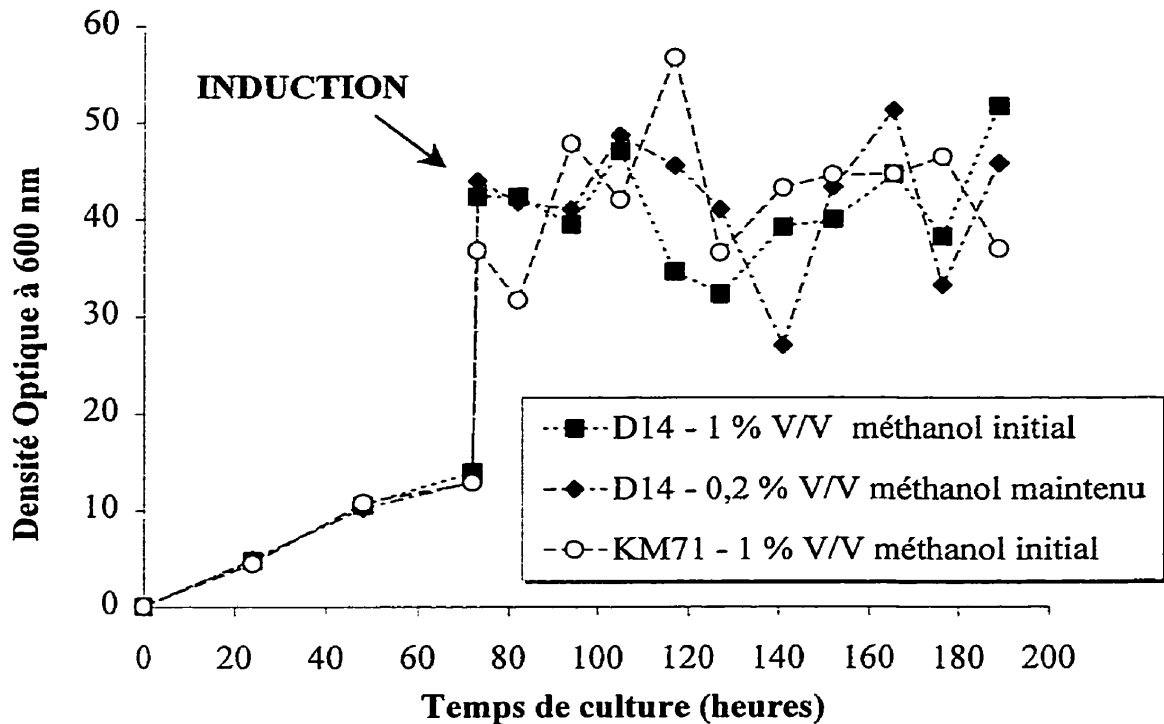


Figure 4.1 : Évolution de la biomasse (DO) au cours du temps pour les souches de *Pichia pastoris* avec ou sans le gène de la GFP. Les stratégies d'alimentation en méthanol sont expliquées ci-dessous.

Deux stratégies d'alimentation de méthanol ont été appliquées (Figure 4.2). Une culture contenait 1 % V/V de méthanol au départ alors qu'une autre contenait au maximum 0,2 % V/V de méthanol. La concentration de la deuxième culture fut ajustée périodiquement pour éviter une déficience en méthanol. Selon les résultats obtenus (Figure 4.3), le système avec une plus forte concentration de méthanol au départ semble produire plus de fluorescence. A la fin de l'expérience, les niveaux de fluorescence n'ont pas pu être quantifiés pour les deux cultures (explications dans le paragraphe 4.1.2.2).

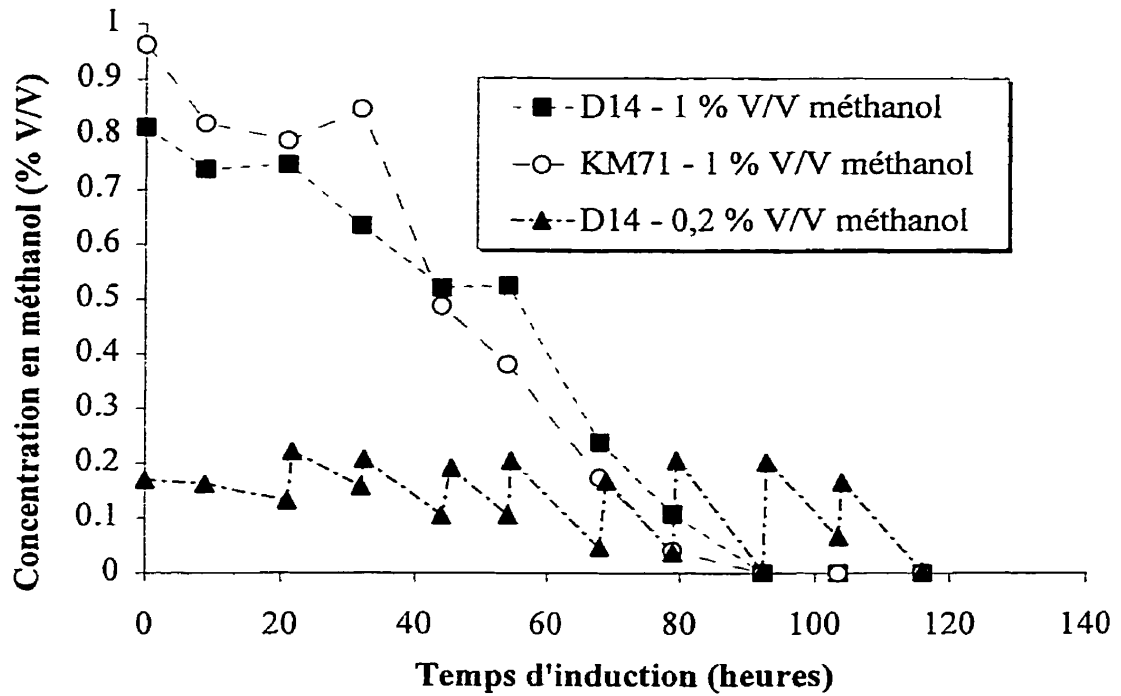


Figure 4.2 : Évolution de la concentration en méthanol dans plusieurs cultures : culture de la souche D14 à 1 % V/V de méthanol initialement, culture de la souche KM71 à 1 % V/V de méthanol initialement et culture de la souche D14 à 0,2 % V/V de méthanol au plus au cours de la fermentation (la concentration est maintenue autour de  $0,1 \pm 0,1$  % V/V).

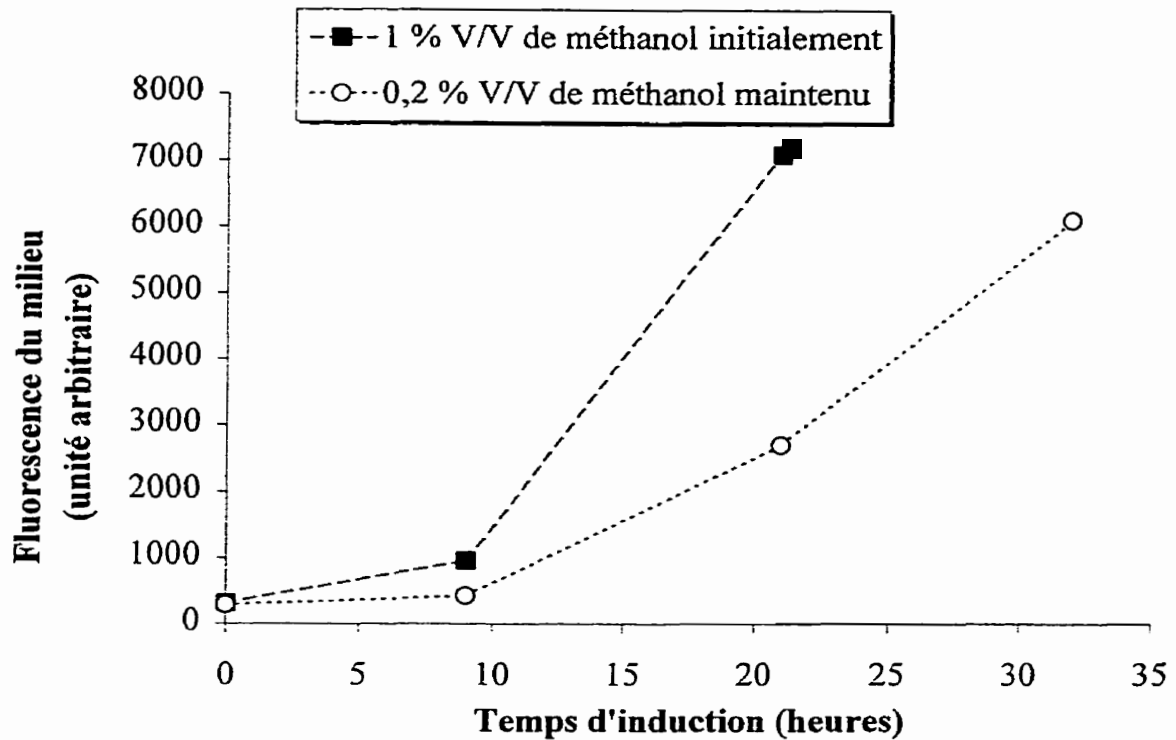


Figure 4.3 : Comparaison de l'évolution de la fluorescence de la culture pour les deux stratégies d'alimentation en méthanol pour la souche D14. Se référer à la Figure 4.2 pour suivre l'évolution de la concentration en méthanol.

Le système produit de la fluorescence qui est liée à la GFP puisque la souche sans le gène de la GFP a une fluorescence constante et faible pendant toute la phase d'induction (300 unités de fluorescence) alors que la souche D14 a une fluorescence qui augmente au cours du temps. 300 représente donc, avec le fluoromètre utilisé, la fluorescence d'un volume de 100  $\mu$ L de culture contenant des cellules n'ayant pas de GFP intracellulaire. Nous avons aussi observé facilement, au microscope, la fluorescence des cellules de la souche D14 (Figure 4.4) et aucune fluorescence des cellules de la souche KM71 ne fut observée. La Figure 4.5 illustre les deux mesures de fluorescence au cours du temps pour les deux cultures (une souche de *Pichia pastoris* avec le gène de la GFP et une sans) dans les mêmes conditions de croissance. Pour la phase de production de GFP, la concentration initiale en méthanol était de 1 % V/V pour les deux cultures. Le méthanol

est consommé de façon similaire dans les deux cultures (Figure 4.2). La GFP est produite en très grande quantité par la souche D14 ; *Pichia pastoris* est donc un bon système de production de GFP. Ces résultats confirmaient donc les travaux de Favre et Borel-Giraud (1999). Cependant, le système produit tellement de GFP que le fluoromètre n'est pas capable de quantifier la fluorescence de l'échantillon brut au-delà d'une certaine fluorescence (9999 unités de fluorescence). Cette saturation est une limite numérique de l'appareil de mesure et sera développée dans le paragraphe 4.1.2.2 de ce chapitre.



Figure 4.4 : Cellules de *Pichia pastoris* contenant de la GFP (grossissement 500 X).



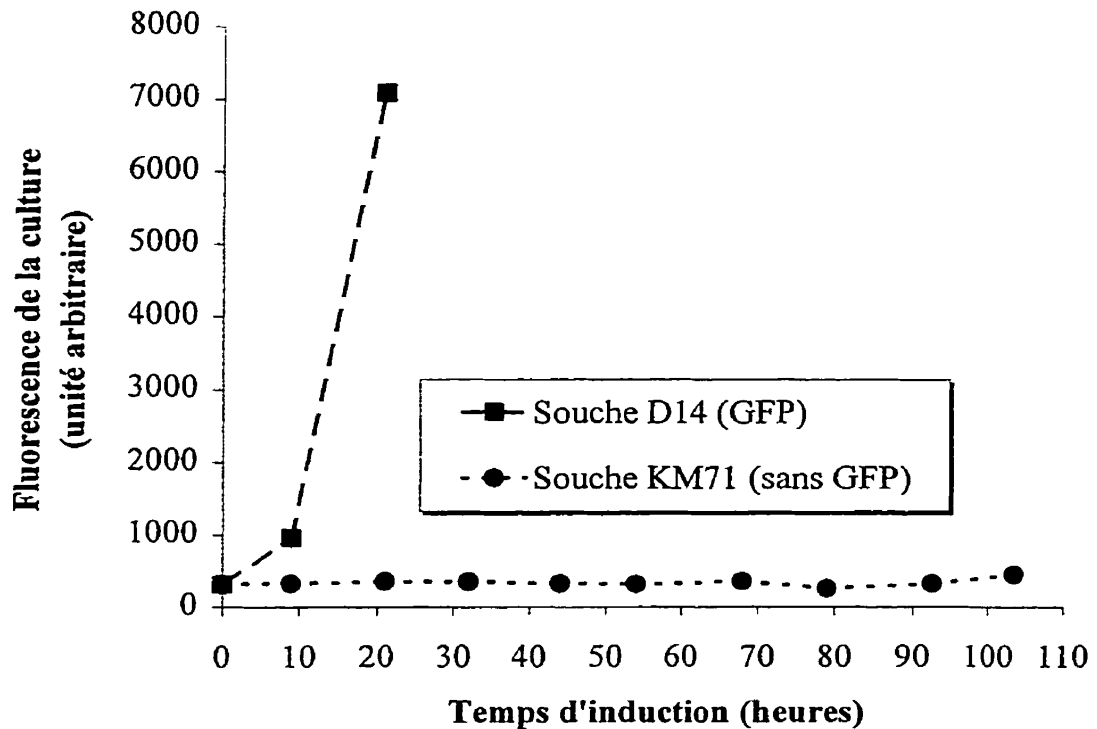


Figure 4.5 : Comparaison de l'augmentation de la fluorescence dans la souche D14 (comportant le gène de la GFP) et dans la souche KM71 (sans le gène de la GFP). Au-delà de 68 h de production de GFP, le fluoromètre utilisé n'était plus capable de quantifier la fluorescence, ce pourquoi les résultats furent interrompus.

*Pichia pastoris* est une cellule stable et solide puisque peu de fuites de GFP ont été observées. En plus de mesurer la fluorescence de la culture, nous avons mesuré la fluorescence du surnageant. La fluorescence du surnageant augmente légèrement mais cette augmentation est négligeable devant celle de la fluorescence intracellulaire due à la GFP. En effet, une augmentation de 150 unités de fluorescence pour le surnageant est négligeable devant une augmentation de plus de 10 000 unités pour les cellules. La fluorescence du surnageant était presque constante, ce qui précise que la membrane de *Pichia pastoris* était imperméable et que la lyse cellulaire était négligeable.

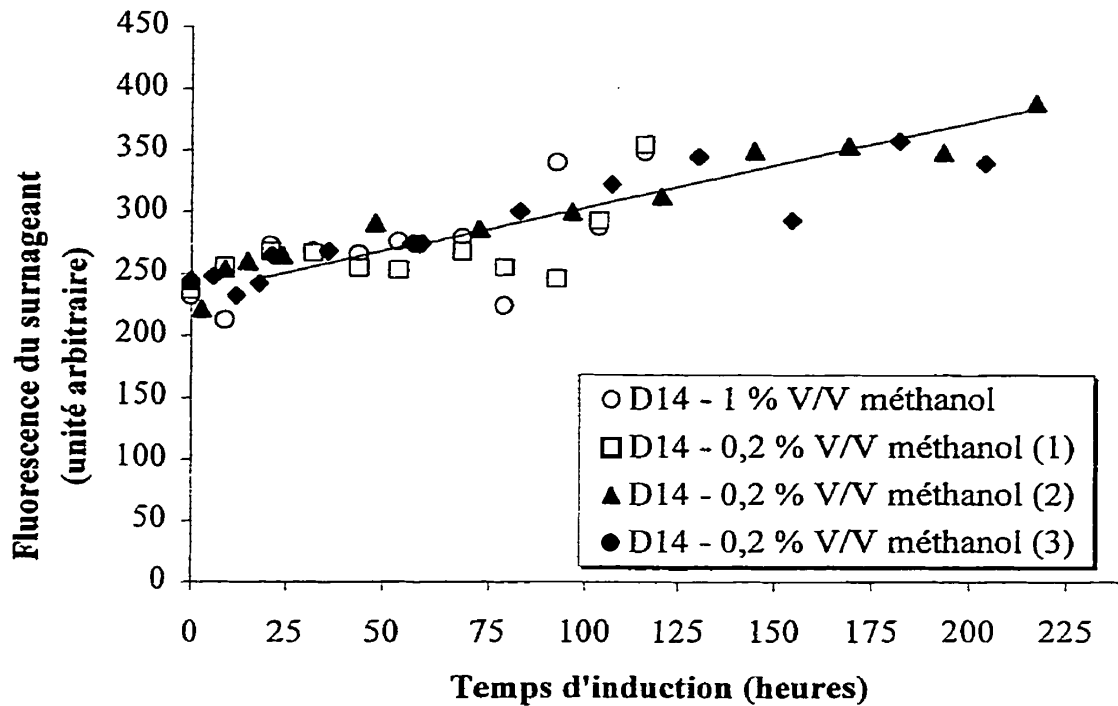


Figure 4.6 : Fluorescence des surnageants de plusieurs cultures (culture avec  $1 \pm 0,1$  % V/V de méthanol au départ et cultures avec 0,2 % V/V de méthanol (au plus) au cours des expériences (1), (2) et (3). La Figure 4.2 illustre les différentes stratégies.

#### 4.1.2.2 Résultats liés aux méthodes d'analyse

##### *Densité optique*

Le profil de la densité optique, qui permet de quantifier la biomasse, était très instable en phase de production (Figure 4. 1). En effet, pour mesurer la densité optique (DO) d'un échantillon, celui-ci était largement dilué (1/100, 1/200) pour obtenir une mesure de DO comprise entre 0,07 et 0,5. Pour quantifier la DO, nous mesurons une seule dilution et nous obtenons la DO de l'échantillon en multipliant le facteur de la dilution par la DO mesurée, le pourcentage d'erreur était assez important. Pour limiter ce pourcentage (la Figure 4.7 illustre les différents pourcentages d'erreur en fonction des méthodes employées et le Tableau 4.1 les compare), nous avons mesuré trois dilutions du même

échantillon, ayant une valeur dans la gamme de valeurs acceptables (0,07 à 0,5). Nous avons ensuite fait une interpolation linéaire pour obtenir la DO de l'échantillon (Figure 4.8).

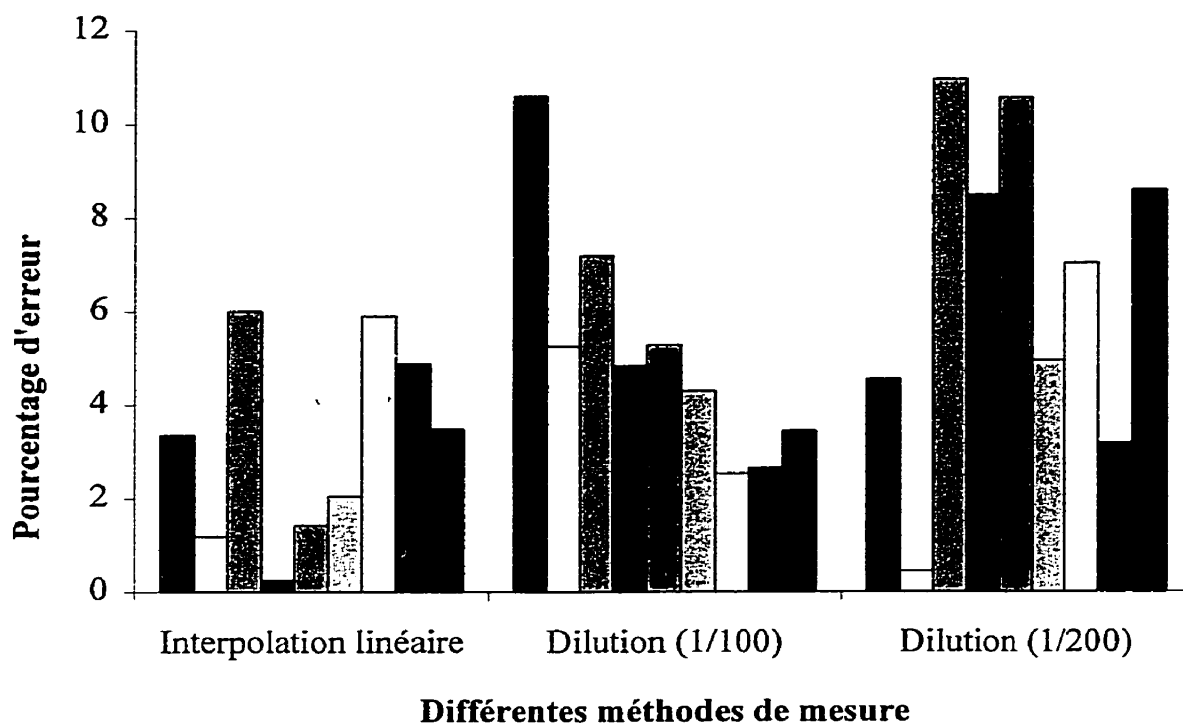


Figure 4.7 : Pourcentages d'erreur pour les deux méthodes (interpolation linéaire de plusieurs mesures de dilutions comparée à une seule mesure de dilution (1/100 et 1/200)) pour 9 échantillons en phase d'induction d'une fermentation en bioréacteur.

Tableau 4.1 : Comparaison des pourcentages d'erreur de la Figure 4.7.

	<b>Interpolation linéaire</b>	<b>Dilution (1/100)</b>	<b>Dilution (1/200)</b>
<i>Moyenne</i>	3,2 %	5,1 %	6,6 %
<i>Erreur minimale</i>	0,25 %	2,5 %	0,4 %
<i>Erreur maximale</i>	6,0 %	10,6 %	11,0 %

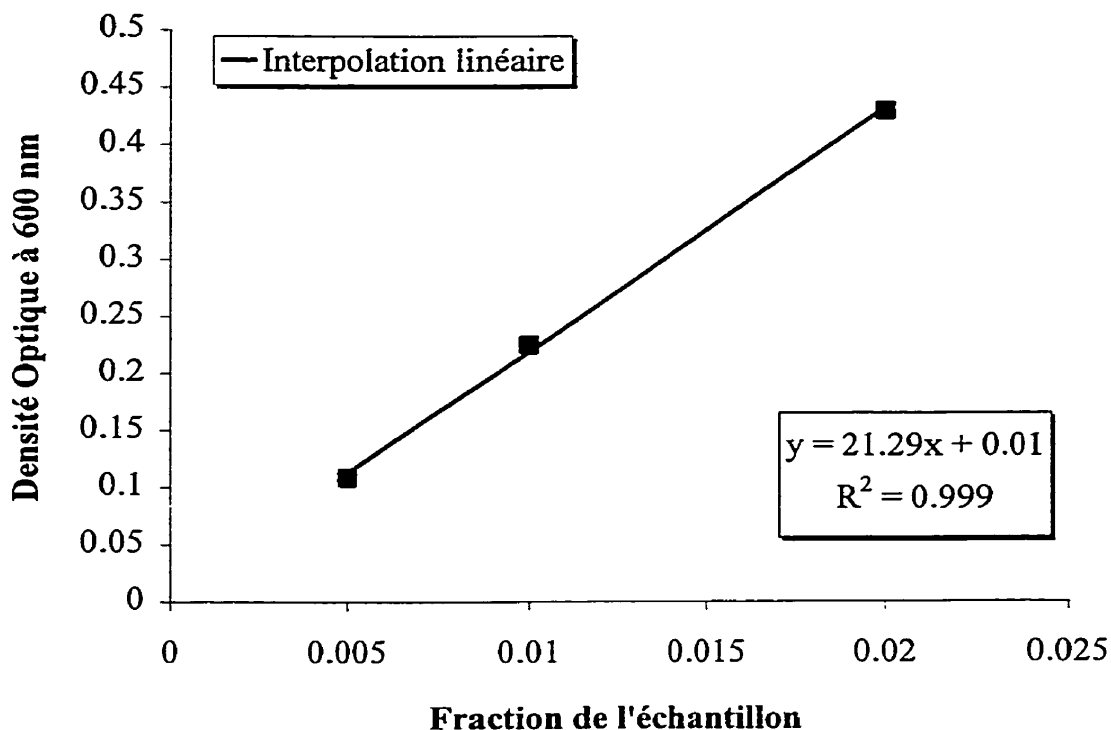


Figure 4.8 : Exemple de calcul de la densité optique. Pour déterminer la DO, x est choisi égal à 1 et y est la DO calculée.

### *Fluorescence*

Le fluoromètre utilisé pour mesurer la fluorescence saturait numériquement assez rapidement, passé ce stade la culture produisait une quantité telle que la fluorescence ne pouvait plus être quantifiée directement par l'appareil. Une méthode a ainsi été développée pour quantifier la fluorescence lors de la deuxième expérience en Erlenmeyers. Pour quantifier la fluorescence, nous avons mesuré la fluorescence d'une série de dilutions de l'échantillon initial. Deux méthodes d'interpolation des points ont été proposées : une interpolation linéaire (relation linéaire entre la fraction de l'échantillon et la fluorescence mesurée) et une interpolation logarithmique (relation logarithmique entre le facteur de dilution et la fluorescence mesurée).

Pour tester ces deux méthodes, nous avons procédé comme suit :

- Mesurer la fluorescence d'un échantillon ;
- Mesurer la fluorescence d'une série de dilutions du même échantillon (la fluorescence devait être supérieure à 50 unités pour être valable) ;
- Calculer la fluorescence de l'échantillon par les deux méthodes d'interpolations (Figure 4.9) ;
- Comparer les fluorescences calculées avec la fluorescence mesurée initialement (Figure 4.10).

Deux cultures en Erlenmeyers ont permis d'avoir une série représentative d'échantillons. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.10 ; la fluorescence calculée par la méthode linéaire était presque égale à la fluorescence mesurée. Les pourcentages d'erreur présentés dans le Tableau 4.2 montrent bien que la méthode 2 est valable (3,9 % d'erreur contre 39,2 % d'erreur pour la méthode 1). La relation entre la fluorescence et la fraction de l'échantillon est donc linéaire.

Les échantillons mesurés devaient avoir une fluorescence inférieure à la fluorescence maximale tolérée par l'appareil de mesure pour permettre la comparaison entre la valeur réelle et la valeur calculée par dilution. Cette méthode ne permet donc pas de vérifier qu'elle est toujours applicable même lorsque l'échantillon a une fluorescence au-delà du seuil de tolérance de l'appareil. Nous l'avons cependant considérée valide dans une première approche : c'est à dire qu'à ce stade, lorsque la mesure de fluorescence d'un échantillon était supérieure à 9999, nous avons utilisé la méthode de dilution pour quantifier cette fluorescence.

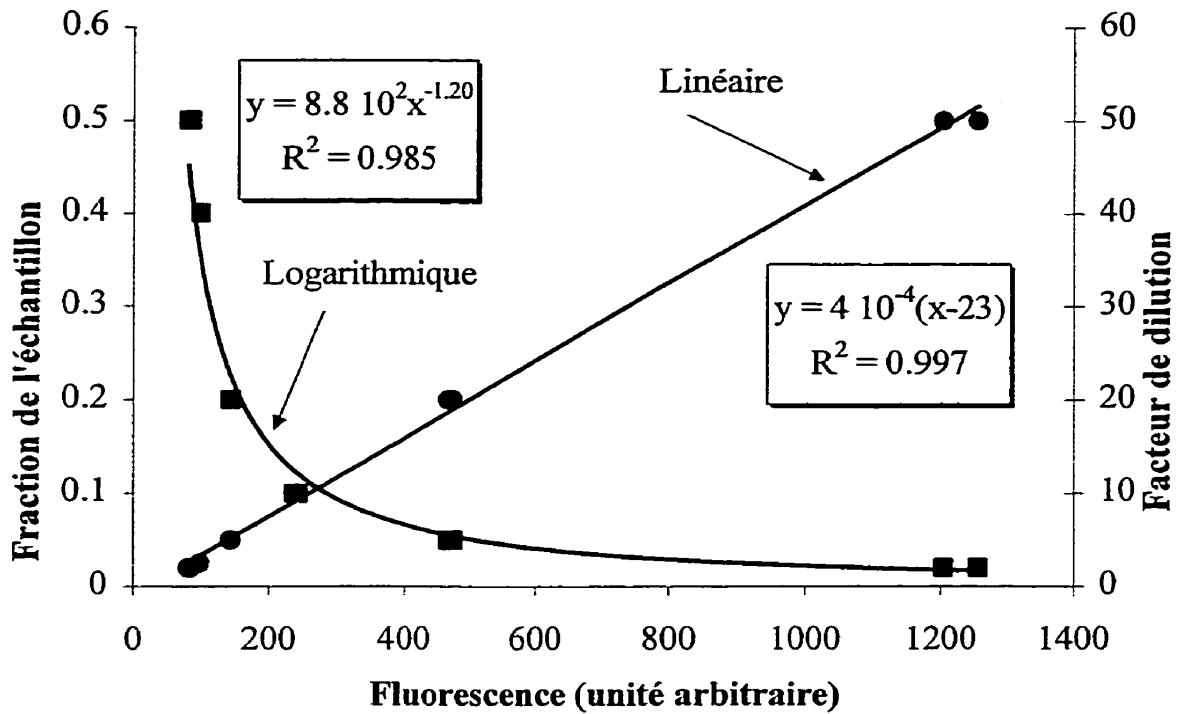


Figure 4.9 : Exemple de mesure de la fluorescence. Pour déterminer la valeur de la fluorescence,  $y$  est choisi égal à 1 et  $x$  est la fluorescence calculée. La relation linéaire ne passe pas exactement par zéro à cause du degré de précision de la mesure de fluorescence (23 est négligeable devant  $x$ ).

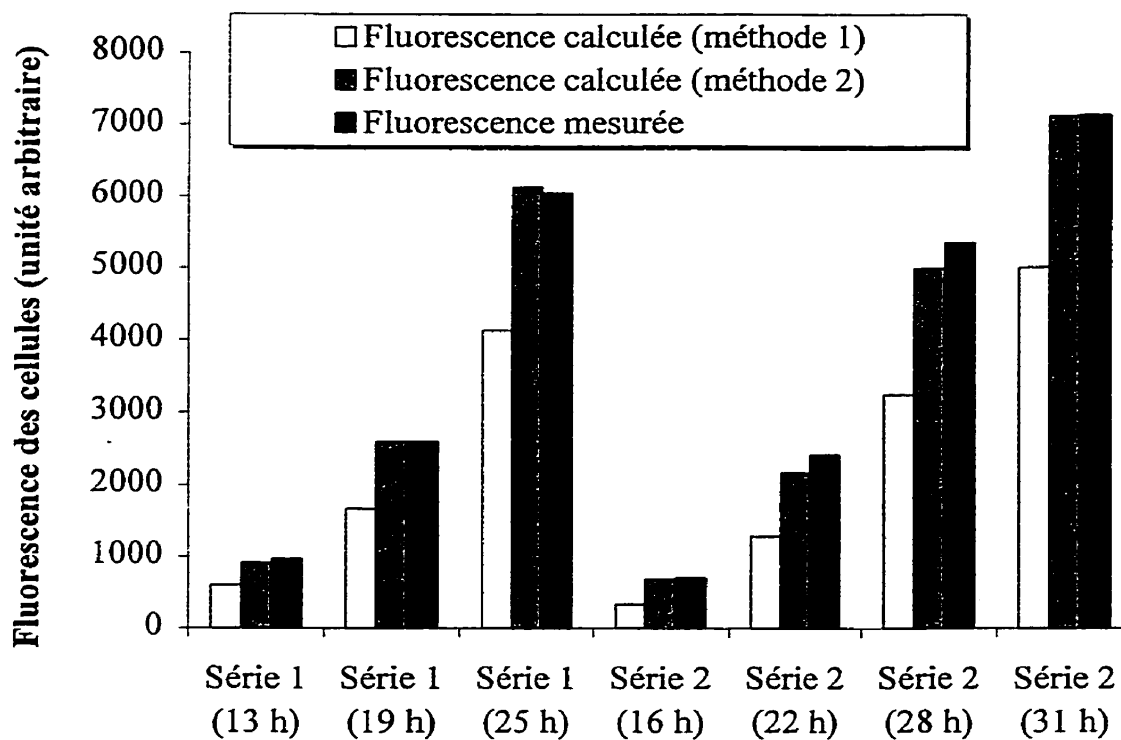


Figure 4.10 : Comparaison des méthodes de calcul de la fluorescence. La méthode 1 est la méthode de calcul par interpolation logarithmique et la méthode 2 est celle par interpolation linéaire.

Tableau 4.2 : Pourcentage d'erreur pour le calcul de la fluorescence. La méthode 1 est la méthode de calcul par interpolation logarithmique et la méthode 2 est celle par interpolation linéaire.

<b>Échantillon</b>	<b>Pourcentage d'erreur (Méthode 1)</b>	<b>Pourcentage d'erreur (Méthode 2)</b>
<i>Série 1 (13 h)</i>	38,1 %	5,9 %
<i>Série 1 (19 h)</i>	35,7 %	0 %
<i>Série 1 (25 h)</i>	31,7 %	1,3 %
<i>Série 2 (16 h)</i>	52,3 %	3 %
<i>Série 2 (22 h)</i>	46,9 %	10,1 %
<i>Série 2 (28 h)</i>	39,5 %	6,7 %
<i>Série 2 (31 h)</i>	29,9 %	0,3 %
<i>Moyenne</i>	39,2 %	3,9 %
<i>Erreur minimale</i>	29,9 %	0 %
<i>Erreur maximale</i>	52,3 %	10,1 %

## 4.2 Mesure de la fluorescence

### 4.2.1 Mesure rapide de la fluorescence

Dans nos expériences, la cellule produisait de la GFP de façon intracellulaire, la fluorescence due à la GFP était associée aux cellules. Au début des expériences, pour quantifier la fluorescence des cellules, nous mesurons la fluorescence des cellules resuspendues dans de l'eau saline, la fluorescence du surnageant (pour observer une fuite de GFP s'il y a lieu dans le milieu) et la fluorescence de la culture. Comme les cellules devenaient très fluorescentes rapidement, nous devons utiliser une méthode de dilution (voir le paragraphe précédent 4.1.2.2). Ceci était donc long et fastidieux. En vue de gagner du temps, nous avons fait l'hypothèse suivante : la fluorescence des cellules pourrait être égale à la différence entre la fluorescence de la culture et celle du surnageant. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré puis comparé les trois



fluorescences (culture, surnageant et cellules resuspendues). La Figure 4.11 confirme notre hypothèse. Désormais, vu les résultats, la fluorescence des cellules sera déterminée par le calcul de la différence entre la fluorescence de la culture et celle du surnageant. Cette relation pourra être très utile pour mesurer la fluorescence avec une sonde à fluorescence (Randers-Eichhorn et al. (1997), Gilbert et al. (2000)). Notons qu'à chaque fois que la valeur de fluorescence est supérieure à 9999, la valeur a été calculée avec la méthode de dilution expliquée au paragraphe 4.1.2.2 de ce chapitre.

$$\text{Fluorescence des cellules} = \text{Fluorescence de la culture} - \text{Fluorescence du surnageant}$$

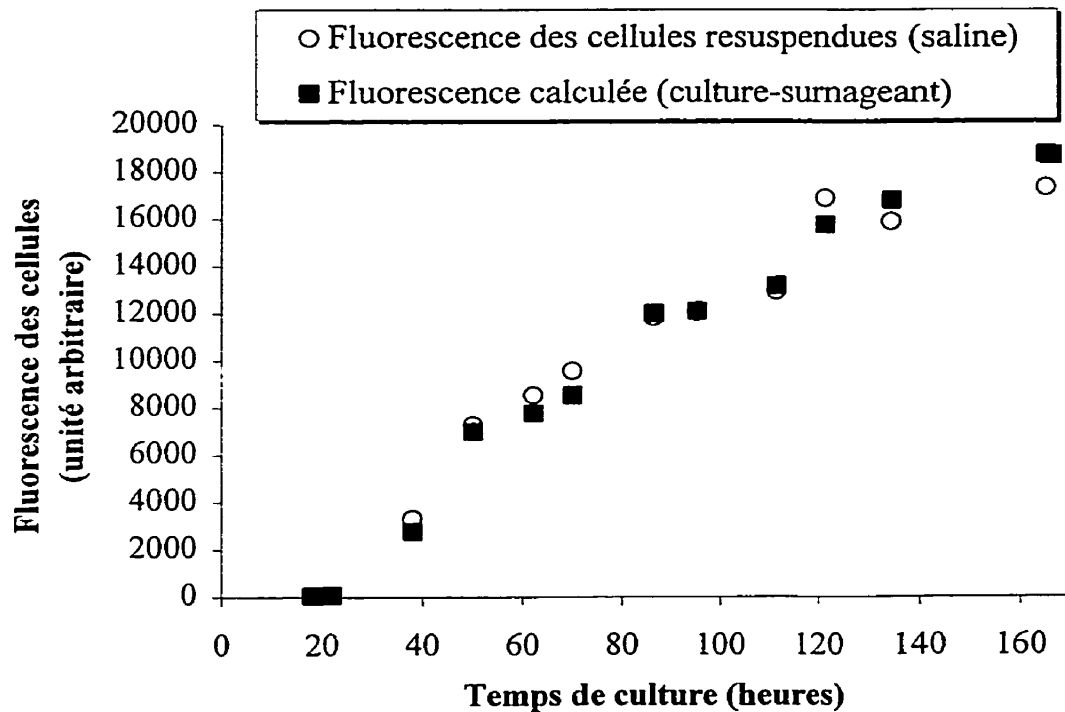


Figure 4.11 : Comparaison entre la fluorescence des cellules resuspendues et celle calculée par différence entre la fluorescence de la culture et celle du surnageant.

### 4.2.2 Relation linéaire entre la fluorescence et la concentration en GFP

La fluorescence est liée à la concentration en GFP : quelle est la relation entre les deux ? Pour cela, une courbe standard fut réalisée grâce à un échantillon de GFP pure de Quantum Biotechnologies Inc. Cette expérience fut réalisée deux fois en diluant l'échantillon standard de concentration en GFP connue (0,5 g/L). La relation entre la fluorescence de la GFP et sa concentration est linéaire.  $[GFP]$  est en g/L et  $F$  est la fluorescence de l'échantillon moins celle de la solution saline en unités arbitraires.

Avec la première expérience (voir Figure 4.12), nous avons obtenu :

$$[GFP] = 2.10^{-5} (F + 40) \quad (4.1)$$

Avec la deuxième (voir Figure 4.12), le résultats est le suivant :

$$[GFP] = 2.10^{-5} (F - 25) \quad (4.2)$$

Pour nos expériences, l'ordre de grandeur de  $F$  était supérieur à 300 unités (300 représente la fluorescence d'un volume de culture sans GFP (voir paragraphe 4.1.2.1 de ce chapitre et la Figure 4.4)), les valeurs (-25) et (+40) sont de ce fait négligeables devant  $F$ . La relation se réduit donc à la suivante :

$$[GFP] = 2.10^{-5} F \quad (4.3)$$

Avec cette courbe standard (Figure 4.12), nous pouvons déterminer la fourchette à l'intérieure de laquelle la mesure de fluorescence est valable : de 50 (fluorescence d'un volume d'eau zénopure) à au moins 8500 (valeur la plus haute mesurée pour la GFP standard).

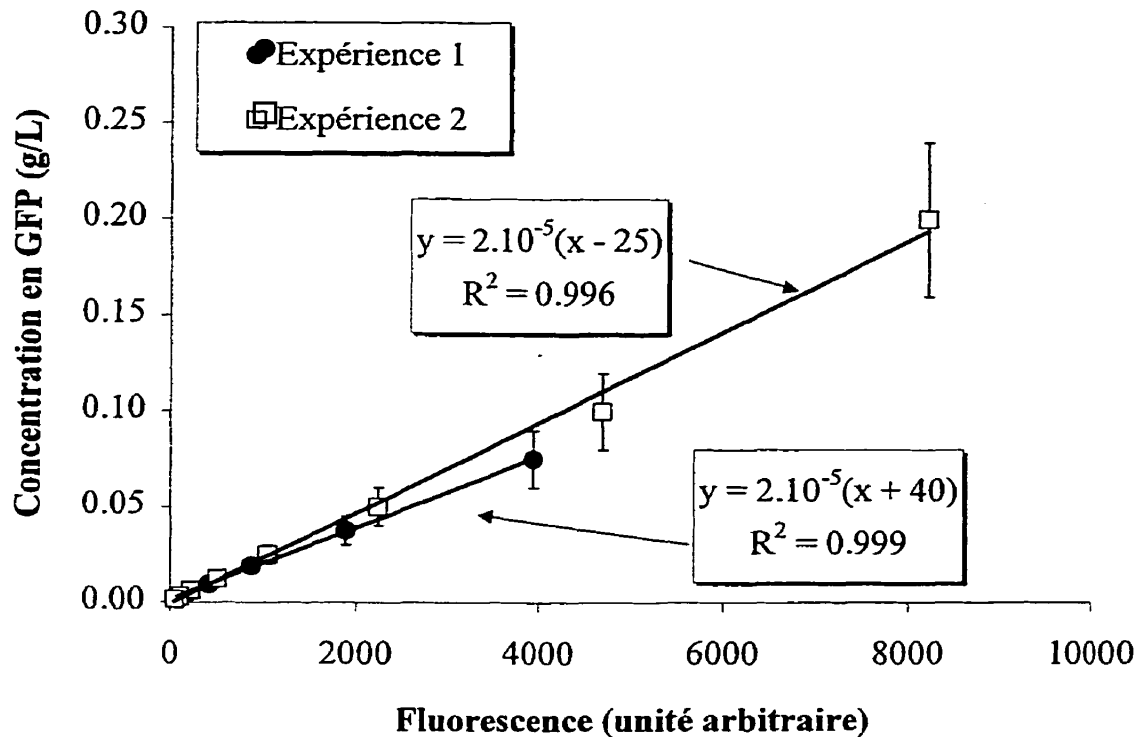


Figure 4.12 : Courbe standard entre la GFP et la mesure de fluorescence pour les deux expériences.

### 4.2.3 Conclusion

Pour la fluorescence, trois résultats sont importants à noter et seront désormais utilisés pour les expériences présentées au chapitre V :

- Fluorescence déterminée par interpolation linéaire d'une série de mesures de fluorescence de différentes dilutions de l'échantillon ;
- Fluorescence des cellules = fluorescence de la culture – fluorescence du surnageant ;
- Relation linéaire entre la fluorescence mesurée et la concentration en GFP :  
 $[GFP] = 2.10^{-5} F$  avec  $[GFP]$  en g/L et  $F$  fluorescence des cellules provenant de la GFP.

relation entre la concentration et la fluorescence est linéaire, cette méthode est valable au-delà du seuil. La restriction du paragraphe 4.1.2.2 est ainsi levée.

## CHAPITRE V

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de ce chapitre furent obtenus à partir de trois fermentations en bioréacteur. La première partie du chapitre met en évidence la cinétique de croissance et la production de GFP obtenues lors des trois expériences, cette dernière sera modélisée dans la deuxième partie par une loi de Michaelis-Menten mettant en évidence un substrat limitant. Finalement, ce modèle sera discuté dans la troisième partie.

#### 5.1 Cinétiques de croissance et de production de GFP

Les paramètres des trois fermentations sont ceux décrits dans le chapitre III. Cependant, quelques éléments diffèrent d'une fermentation à l'autre au niveau de la durée totale, de celle de la phase de croissance et de la régularité de l'ajout du méthanol (Tableau 5.1). Les modifications introduites sont dues aux résultats des expériences précédentes. Pour déterminer la durée de la phase de croissance, nous nous sommes basés sur l'augmentation brutale de l'oxygène dissous dans la culture (données en continu voir la Figure 5.9 du paragraphe 5.3.2) ainsi que sur l'épuisement du glycérol (données discontinues voir la Figure 5.2 du paragraphe 5.1). Les durées de croissance sont similaires pour la fermentation 1 (F1) et la fermentation 2 (F2). Pour la fermentation 2 (F2), nous avons décidé d'ajouter le méthanol avant l'épuisement complet du glycérol car nous pensions que l'ajout de méthanol pourrait limiter l'augmentation de la contamination dans la culture. Cette hypothèse ne fut pas réellement vérifiée même si la quantité de coques ne sembla pas avoir augmenté au cours de la phase d'induction (observation par microscopie), en effet, la contamination aurait pu rester stable sans l'ajout de méthanol. Nous avons donc eu dans ce cas les deux substrats en même temps, ce système, appelé mixed-feeding<sup>12</sup> (Chiruvolu et al., 1997, Thorpe et al., 1999) ne

---

<sup>12</sup> Deux sources carbonées en même temps.

sembla pas être un moyen de produire plus rapidement de la GFP. Il semble que la culture épuise d'abord le glycérol puis se met à consommer le méthanol. Les résultats de l'expérience F2, malgré la contamination, ont quand même été exploités car ils étaient similaires aux deux autres fermentations. La dernière fermentation a été plus courte que les précédentes vu qu'au-delà de 166 h, les résultats ne nous semblaient ni pertinents et ni rentables.

Tableau 5.1 : Valeur des paramètres d'une expérience à l'autre.

	<b>Fermentation 1 (F1)</b>	<b>Fermentation 2 (F2)</b>	<b>Fermentation 3 (F3)</b>
<i>Durée totale</i>	195 h	210 h	166 h
<i>Durée de la phase de croissance</i>	20 h	Entre 25 h et 31 h	20 h
<i>Durée de la phase d'induction</i>	175 h	Entre 179 h et 185 h	143 h
<i>Alimentation en méthanol</i>	1 <sup>ère</sup> induction à 22 h Ajout du méthanol pour avoir une concentration suffisante (> 0,5 % V/V)	1 <sup>ère</sup> induction à 18 h Ajout du méthanol pour avoir une concentration suffisante (> 0,5 % V/V)	1 <sup>ère</sup> induction à 23 h Ajout de 50 mL de méthanol toutes les 12 heures
<i>Volume de milieu</i>	15 L dans 20 L	15 L dans 20 L	14 L dans 20 L
<i>Agitation (croissance)</i>	350 tpm, 500 tpm	450 tpm	350 tpm
<i>Agitation (production)</i>	450 tpm, 400 tpm	350 tpm	400 tpm
<i>Particularité</i>	Pas de contamination a priori <sup>13</sup>	Contamination (coques)	

<sup>13</sup> L'absence de contamination n'est pas assurée pour cette expérience.

Lors des trois fermentations, les autres paramètres de production ont bien été respectés : température à  $30,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  et pH contrôlé à  $6 \pm 0,1$ . La Figure 5.1 identifie bien les deux phases, déjà identifiées en Erlenmeyers dans la partie précédente : croissance sur glycérol (taux spécifique de croissance  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ) et production de GFP avec une biomasse presque constante. La quantité de méthanol a toujours été suffisante pour les cellules (Figure 5.2).

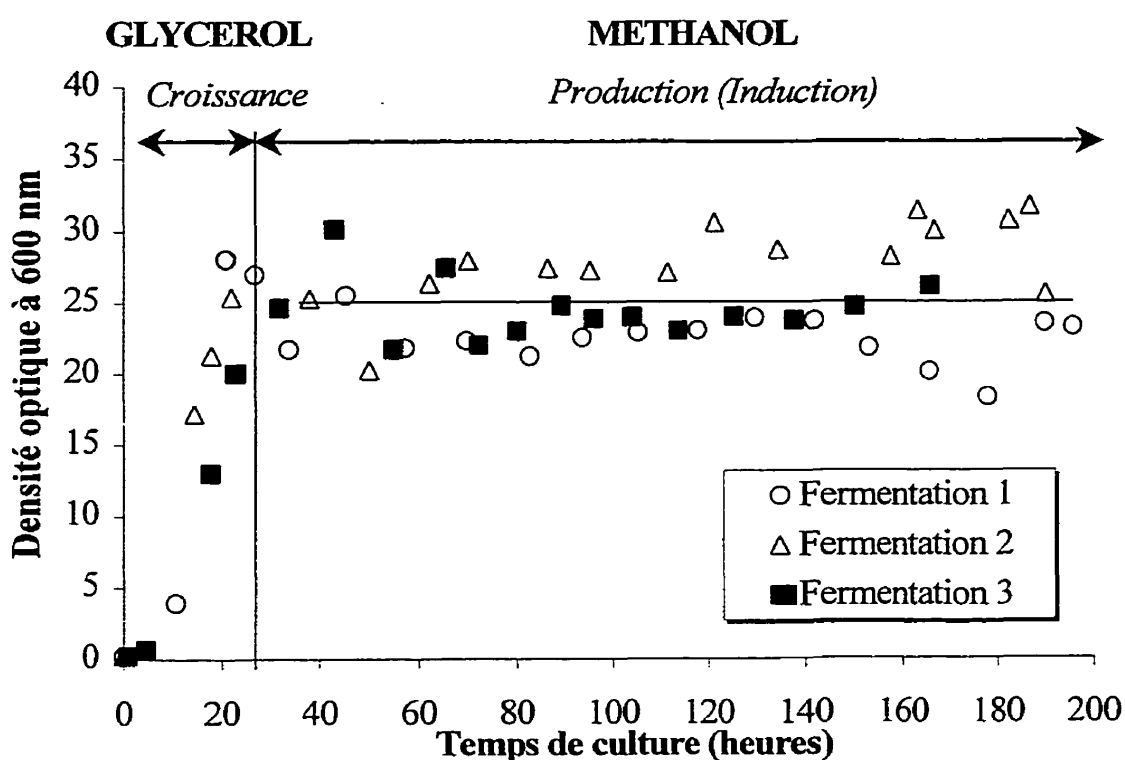


Figure 5.1 : Évolution de la biomasse. Le niveau de biomasse est du même ordre pour les trois expériences vu que les concentrations en substrats sont les mêmes initialement. Seul la concentration en méthanol a varié mais elle n'est pas un facteur prépondérant pour la croissance.

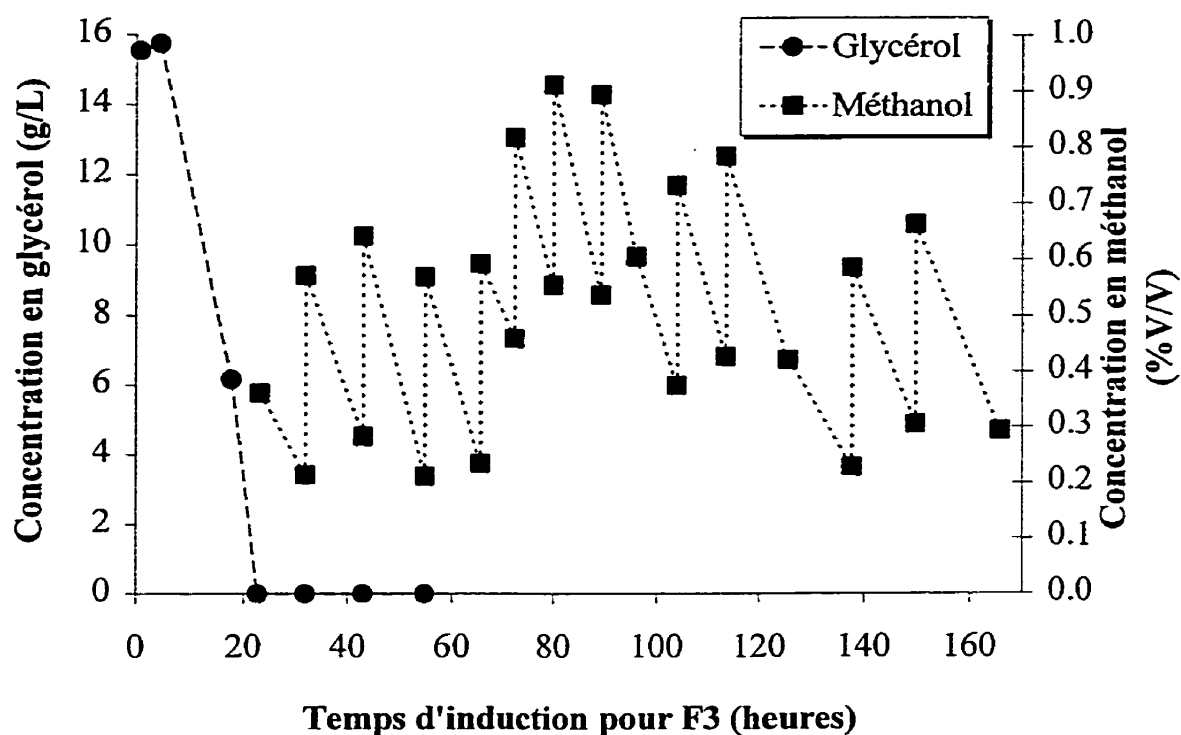


Figure 5.2 : Évolution des sources de carbone pendant la fermentation 3. Les résultats des autres fermentations sont similaires et présentés en annexe A4.1.

La production intracellulaire de GFP par *Pichia pastoris* était assez élevée (Figure 5.3), jusqu'à 27 mg/g de GFP par masse cellulaire, même si elle était inférieure à la production en Erlenmeyers (65 mg/g GFP par masse cellulaire). Notons que l'objectif n'était pas d'optimiser la production de GFP en bioréacteur, mais plutôt de générer des expériences reproductibles en vue de les modéliser.



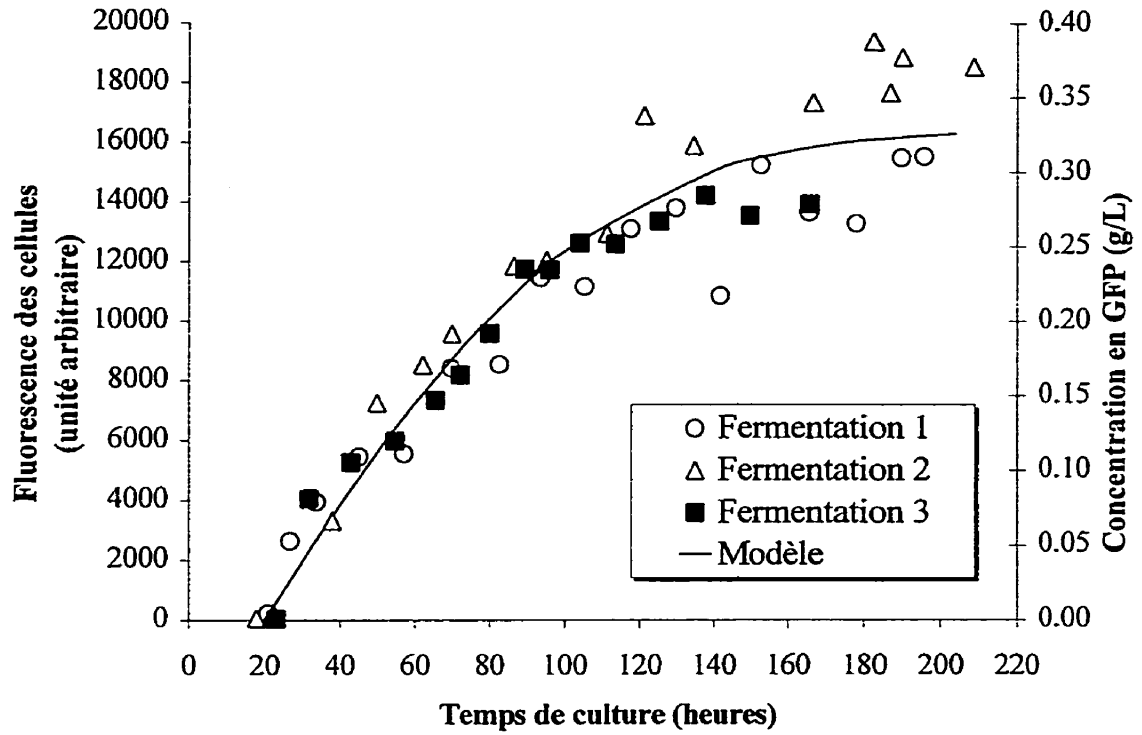


Figure 5.3 : Évolution de la production de GFP en bioréacteur pour les trois fermentations. Le modèle sera expliqué dans la partie 5.2.3 de ce chapitre. La production de GFP commence à 20 h lorsque du méthanol est ajouté.

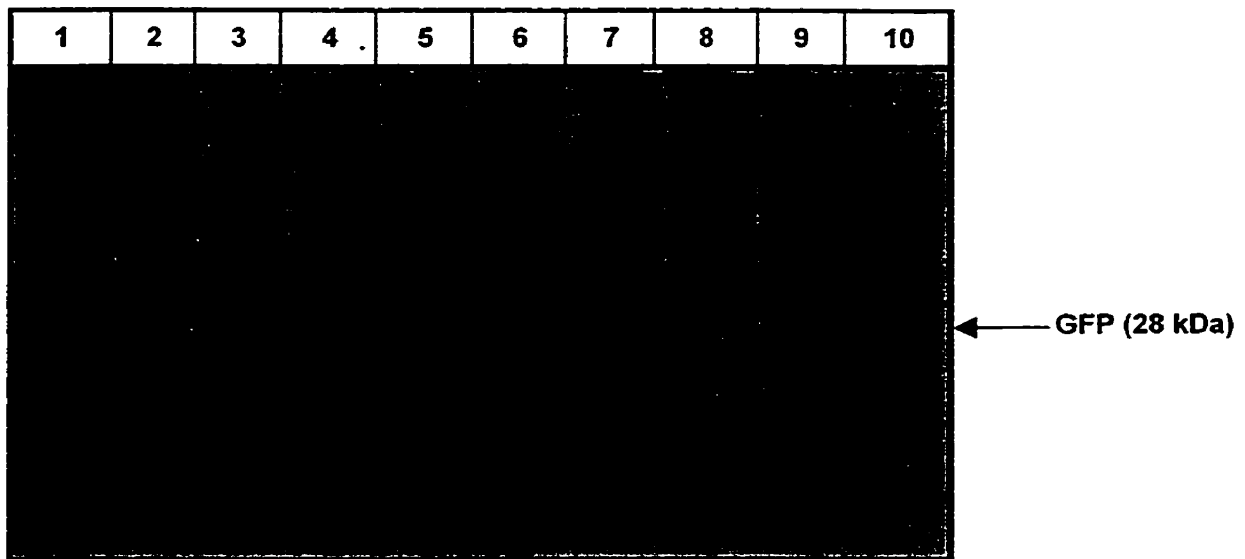


Figure 5.4 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Tris-HCl 10-20 %) pour la fermentation 3. Le poids moléculaire de la GFP est d'environ 28 kDa. La concentration en GFP augmente au cours de la culture. La masse cellulaire est d'environ 25  $\mu$ g dans chaque puits (dilution 1/10). Les échantillons 2 et 3 sont juste avant et après le début de l'induction. 1) LMW, 2) 22,7 h, 3) 31,8 h, 4) 54,8 h, 5) 72,2 h, 6) 89,3 h, 7) 104 h, 8) 125,3 h, 9) 168,8 h et 10) GFP pure (standard).

## 5.2 Modélisation de la production de GFP

### 5.2.1 Bilan de GFP

Selon la Figure 5.3, nous observons une diminution du taux de production de GFP au cours du temps qui est l'objet de la modélisation de la production de GFP en proposant des hypothèses sur les raisons du ralentissement de la synthèse de GFP. Pour cela, effectuons un bilan sur la GFP, contenue dans les cellules, pour le volume total de culture. Nous réalisons ce bilan sur la totalité des cellules pour deux raisons : la mesure de la fluorescence est globale et la répartition de GFP dans les cellules n'est pas la même. Nous avons observé une distribution de GFP (voir annexe V) dans les cellules. Ce bilan

est fait en phase d'induction, i.e. la source de carbone est le méthanol. Cette phase est caractérisée par une biomasse constante.

$$\begin{aligned} \text{Taux de variation} \\ \text{de GFP} \\ \text{dans les cellules} \end{aligned} = \text{production} - \text{désactivation} - \text{dilution} - \text{flux sortant} \quad (5.1)$$

Le terme de dilution peut être négligé car l'apport total de méthanol représente moins de 5 % du volume total de la culture et nous avons utilisé un condenseur pour limiter l'évaporation. Nous considérons que le volume de culture est constant. Le bilan peut donc être effectué en terme de concentration.

Le flux sortant de GFP représente la GFP qui sort à l'extérieur des cellules. En Erlenmeyers, nous avons noté que *Pichia pastoris* avait une paroi assez imperméable. Cette remarque est toujours valable en bioréacteur. En effet, selon la Figure 5.5, l'augmentation de la fluorescence du surnageant au cours de la phase d'induction est de l'ordre de 400 unités (arbitraires) au maximum comparée à la fluorescence cellulaire de l'ordre de 15 000 unités pour la même période de temps. Le flux de GFP sortant de la cellule est donc négligeable dans le bilan.

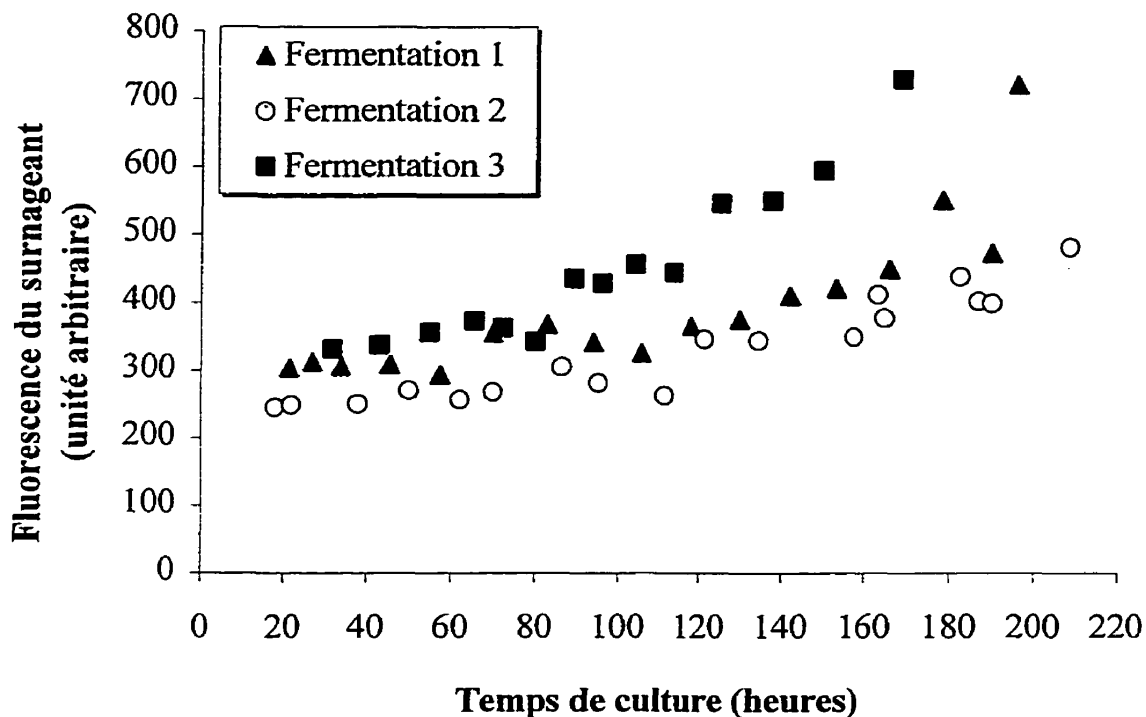


Figure 5.5 : Fluorescence du surnageant pour les différentes fermentations.

Le terme de désactivation de la GFP représente sa perte de fluorescence au cours du temps, laquelle peut être due à plusieurs facteurs : protéases et perte naturelle de fluorescente liée à sa demi-vie d'activité par exemple. La GFP est reconnue par de nombreux auteurs comme étant très stable (Nageswara et al., 1980, Shimomura, 1981, Roth et Ward, 1983, Tombolini et al., 1997) et elle se dénature seulement dans des conditions très difficiles (Ward et al., 1982, Bokman et Ward, 1981). Cependant, après plusieurs heures en culture dans le bioréacteur, il se pourrait qu'elle perde sa fluorescence. En vue de vérifier la stabilité de notre système, nous avons centrifugé et resuspendu des échantillons de cellules dans une solution saline. Ces échantillons ont été incubés à 30°C et 200 tpm (voir le paragraphe 3.1.4.4 du chapitre III pour plus d'informations sur la méthodologie). Deux triplicatas furent réalisés : un avec un échantillon pris au début de l'induction ( $t = 47$  h) et un en fin d'induction ( $t = 113$  h). Au

regard des résultats de la Figure 5.6, la GFP est stable et garde le même niveau de fluorescence pendant plus de 120 h (cette durée est représentative pour notre système).

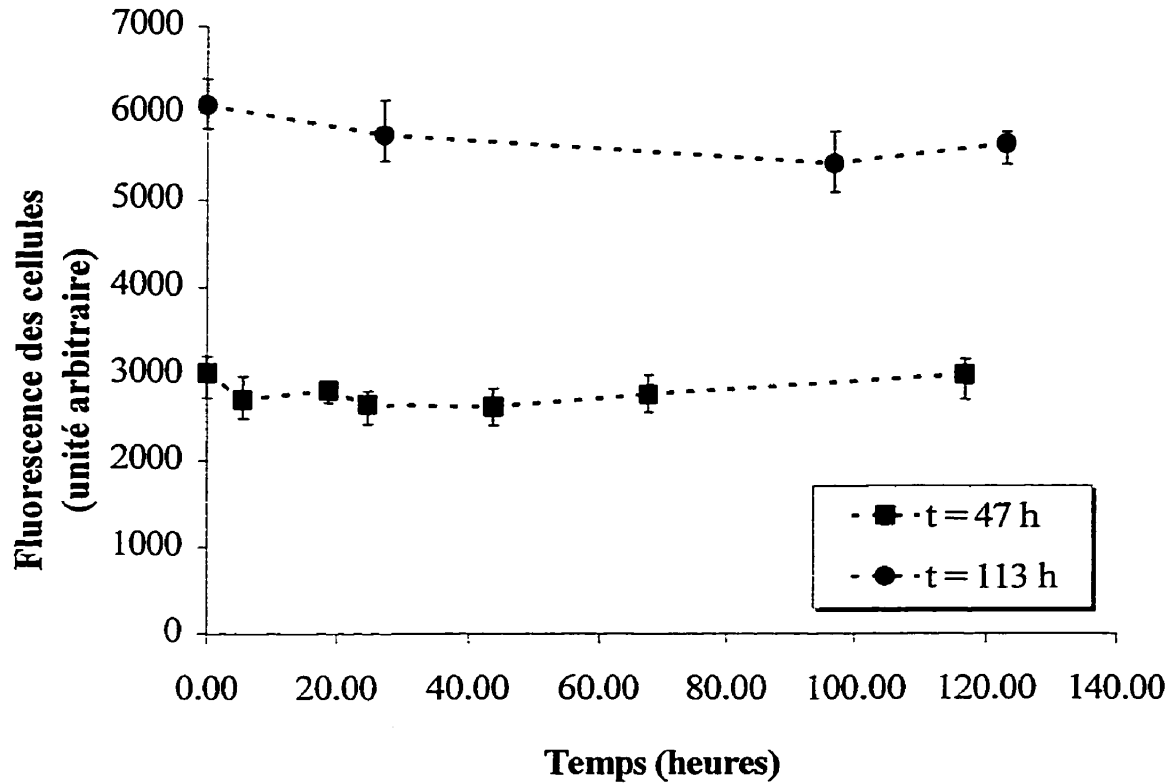


Figure 5.6 : Stabilité de la GFP dans *Pichia pastoris*.

Le bilan en GFP contenue dans les cellules pour tout le volume de la culture se réduit donc à la relation suivante :

$$\frac{d[GFP]}{dt} = \text{production} \quad (5.2)$$

[GFP] représente la concentration de GFP, contenue dans les cellules, pour le volume de culture.

$$[GFP] = \frac{\text{masse totale de GFP dans les cellules}}{\text{volume total de culture}} \quad (5.3)$$

## 5.2.2 Évaluation du terme de production

### 5.2.2.1 Hypothèses

Le terme de production peut être représenté par  $q_{GFP}X$ , où  $X$  est la biomasse (considérée comme constante en phase d'induction) et  $q_{GFP}$  le taux de production spécifique de GFP. Après plusieurs heures d'induction, la synthèse de GFP ralentit et plusieurs hypothèses sont possibles :

➤ *Inhibition liée à l'accumulation de GFP dans la cellule.*

L'inhibition liée à l'accumulation de GFP dans le cytoplasme ne semble pas la raison principale de cette saturation car dans le cas de production extracellulaire de GFP dans *Pichia pastoris* (résultats obtenus dans le laboratoire par Desautels (2000)), une cinétique similaire de saturation a été observée ceci avec des valeurs de fluorescence moins élevées (de l'ordre de 1000 unités). Dans ce cas, comme la GFP est sécrétée, elle est donc dans le surnageant et ne peut pas être, pour la cellule, un inhibiteur direct. Cependant, il se peut que la saturation de production de la GFP dans le cas de la production extracellulaire soit dû au phénomène de sécrétion.

Néanmoins, cette première hypothèse peut être éliminée car lors des expériences en Erlenmeyers, la fluorescence par unité de DO était supérieure à celle en bioréacteur sans qu'il y ait apparition d'un plateau (Figure 5.7).

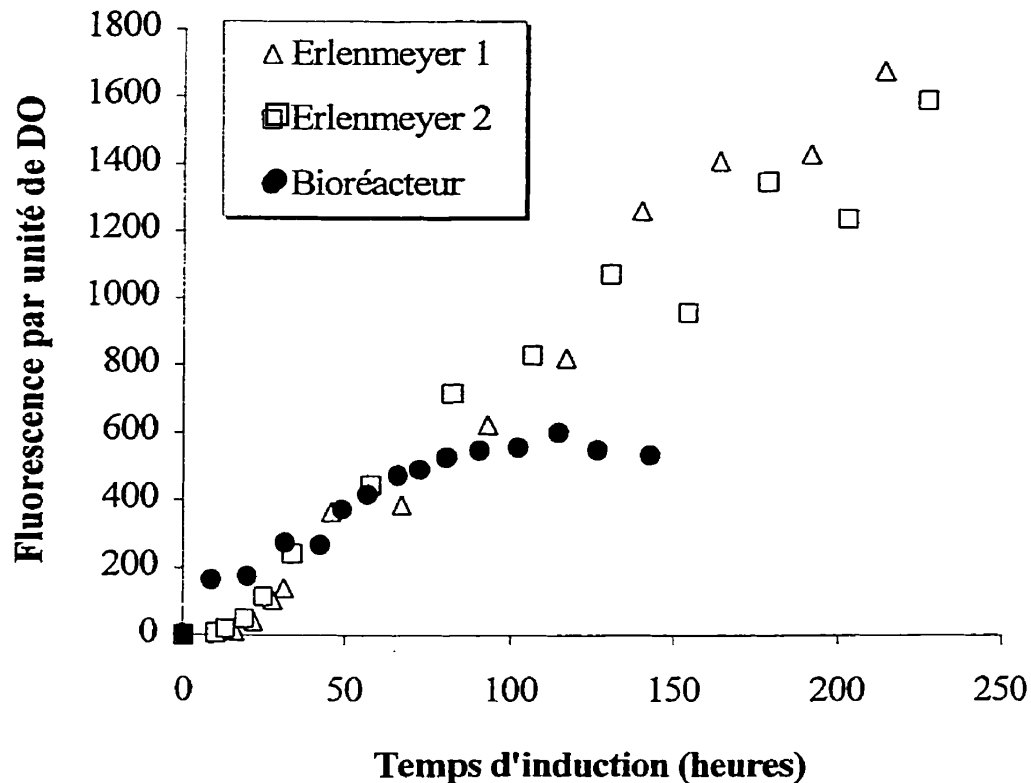


Figure 5.7 : Comparaison des cinétiques de production de GFP par unité de DO (biomasse) pour deux expériences en Erlenmeyers et une expérience en bioréacteur (F3).

➤ *Présence d'un substrat limitant.*

Comme la culture est en cuvée, vu que le seul substrat ajouté est le méthanol, il se peut qu'un ou plusieurs nutriments commencent à faire défaut au bout d'un certain temps. Il pourrait exister un substrat limitant.

➤ *Toxicité du milieu.*

Même si nous avons montré que la GFP, en elle-même, ne semblait pas avoir un rôle inhibiteur, d'autres substances sont fabriquées en même temps que la GFP et une ou plusieurs de ces substances pourraient avoir un effet toxique sur la productivité de la GFP. En effet, Lissemore et al. (2000) explique qu'une supposée libération de  $H_2O_2$  pendant la formation du chromophore pourrait être toxique.

Ces deux dernières hypothèses étant les plus plausibles, nous allons les traiter séparément et les comparer aux données expérimentales.

### 5.2.2.2 Hypothèse d'un substrat limitant

Supposons qu'il existe un substrat limitant S, inconnu, de concentration initiale  $S_0$ , d'après la loi de Michaelis-Menten, le taux de production vaut :

$$q_{GFP} = q_{GFP}^{\max} \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad (5.4)$$

$q_{GFP}^{\max}$  est le taux de production de GFP cellulaire maximale,  $K_S$  est la constante de Michaelis liée au substrat S (elle correspond à la concentration de S nécessaire pour obtenir la moitié de  $q_{GFP}^{\max}$ ) et  $[S]$  est la concentration en substrat.

Définissons le taux de rendement  $Y_{GFP/S}$  de GFP par rapport à ce substrat comme suit :

$$Y_{GFP/S} = \frac{\text{masse de GFP synthétisée}}{\text{masse de substrat consommé}} = \frac{[GFP]_t}{S_0} \quad (5.5)$$

Effectuons maintenant un bilan sur le substrat S consommé :

$$\Delta[S] = (\Delta[S])_{GFP} + (\Delta[S])_{\text{énergie}} + (\Delta[S])_{\text{biomasse}} \quad (5.6)$$

En supposant que la synthèse de GFP est l'élément principal de la consommation de S, nous pouvons simplifier le bilan. Cette hypothèse est possible vu qu'en phase d'induction, la cellule est principalement en maintenance et fabrique principalement de la GFP. Divisons la relation 5.6 par  $\Delta[GFP]$ , nous obtenons ainsi :

$$\frac{\Delta[S]}{\Delta[GFP]} = \left( \frac{\Delta[S]}{\Delta[GFP]} \right)_{GFP} = -\frac{1}{Y_{GFP/S}} \quad (5.7)$$

Comme le taux de rendement est constant,  $S_0$  est la concentration initiale en S et nous n'avons pas de GFP au début de la phase d'induction :

$$[S] = S_0 - \frac{1}{Y_{GFP/S}} [GFP] \quad (5.8)$$



Grâce aux relations 5.2, 5.4 et 5.8, le bilan sur la GFP devient :

$$\frac{d[GFP]}{dt} = q_{GFP}^{\max} X \frac{S_0 - \frac{1}{Y_{GFP/S}} [GFP]}{K_S + S_0 - \frac{1}{Y_{GFP/S}} [GFP]} \quad (5.9)$$

En utilisant la relation 5.5,

$$\frac{d[GFP]}{dt} = q_{GFP}^{\max} X \frac{1 - \frac{[GFP]}{[GFP]_l}}{\left(1 + \frac{K_S}{S_0}\right) - \frac{[GFP]}{[GFP]_l}} \quad (5.10)$$

La solution de l'équation 5.10 est :

$$\frac{t}{\tau} = \frac{[GFP]}{[GFP]_l} - \alpha \ln \left( 1 - \frac{[GFP]}{[GFP]_l} \right) \quad (5.11)$$

t est le temps à partir de la phase d'induction,  $[GFP]_l$  est la concentration limite en GFP,  $\tau$  est une constante de temps caractéristique,  $\tau = \frac{[GFP]_l}{q_{GFP}^{\max} X}$ , et  $\alpha$  est un paramètre d'affinité du substrat S inconnu,  $\alpha = \frac{K_S}{S_0}$ .

### 5.2.2.3 Hypothèse de toxicité

Dans le cas d'une hypothèse de toxicité, nous pouvons supposer, de la même façon, qu'une substance T est toxique. Au lieu de la relation 5.4, nous aurons la relation suivante :

$$q_{GFP} = q_{GFP}^{\max} \frac{K_T}{K_T + [T]} \quad (5.12)$$

$K_T$  est la constante de Michaelis liée au produit T, elle représente la concentration de T pour la moitié de  $q_{GFP}^{\max}$ . Supposons en plus que l'apparition de T est proportionnelle à celle de la GFP (cette hypothèse est semblable à celle sur le substrat S), nous obtenons de ce fait, à la place de la relation 5.9, l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d[GFP]}{dt} = q_{GFP}^{\max} X \frac{K_T}{K_T + \lambda[GFP]} \quad (5.13)$$

$\lambda$  est le coefficient de proportionnalité de [T] sur [GFP], il est sans unité. Le solution de l'équation 5.13 est alors :

$$t = \frac{1}{q_{GFP}^{\max}} \left( [GFP] + \frac{\lambda[GFP]^2}{2K_T} \right) \quad (5.14)$$

Ce modèle ne semble pas convenir puisqu'il n'illustre pas une courbe de saturation.

Vu les deux modèles développés, le deuxième ne permet pas pour l'instant d'aller plus loin (il faudrait, par exemple, l'améliorer au niveau de la relation entre la GFP et le composé toxique T, utiliser une autre loi de comportement pour le terme de production de GFP ou supposer un autre type de toxicité (liée aux sources de carbone par exemple)). D'autre part, l'hypothèse du substrat limitant peut être renforcée par les expériences en Erlenmeyers. En effet, nous n'avons pas observé de plateau de fluorescence pour une durée d'induction supérieure à celle en bioréacteur (Figure 5.7), ce qui peut être expliqué par la resuspension des cellules dans un milieu frais pour la phase d'induction. Avec cette comparaison (Erlenmeyers et bioréacteur), l'apparition d'une substance toxique en phase d'induction simultanément à la GFP semble être rejetée. Pour ces raisons, la suite de l'analyse sera conduite pour le modèle lié au substrat limitant.

### 5.2.3 Détermination des paramètres du modèle (substrat limitant)

Le modèle a trois paramètres :

- La constante de temps  $\tau$  ;
- Le paramètre d'affinité du substrat S,  $\alpha$  ;
- La concentration limite en [GFP]<sub>l</sub>.

Pour déterminer les paramètres, comme  $q_{GFP}^{\max}$ ,  $K_S$  et  $S_0$  sont inconnus, nous avons utilisé la méthode des moindres carrés pour estimer les paramètres  $\tau$  et  $\alpha$  (Pons, 1992,

chapitre 4).  $[GFP]_l$  fut déterminée grâce aux courbes d'évolution de GFP au cours du temps (Figure 5.3) comme étant la concentration limite en GFP.

Pour déterminer  $\tau$  et  $\alpha$ , le problème fut représenté de la façon suivante :

$$y_k = ax_k^1 + bx_k^2 + \varepsilon_k \quad (5.15)$$

$y$  est le temps  $t$ ,  $a$  la constante de temps  $\tau$ ,  $b$  le produit  $-\alpha\tau$ ,  $x^1$  le rapport suivant  $\frac{[GFP]}{[GFP]_l}$ ,  $x^2$  vaut  $\ln(1-x^1)$ , l'indice  $k$  représente le numéro de la série de données et  $\varepsilon$  est l'erreur commise sur les mesures. Nous supposons dans cette méthode que  $\varepsilon$  est un bruit de moyenne nulle, indépendant et uniforme. Nous cherchons à minimiser ce bruit en vue de déterminer les paramètres  $a$  et  $b$ .

En faisant varier  $k$ , nous pouvons représenter la relation 5.14 matriciellement :

$$Y_N = \Psi_N \Theta + E_N \quad (5.16)$$

$$\text{avec } Y_N = \begin{bmatrix} y_1 \\ \vdots \\ y_k \\ \vdots \\ y_N \end{bmatrix}, \Psi_N = \begin{bmatrix} x_1^1 & x_1^2 \\ \vdots & \vdots \\ x_k^1 & x_k^2 \\ \vdots & \vdots \\ x_N^1 & x_N^2 \end{bmatrix}, E_N = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_k \\ \vdots \\ \varepsilon_N \end{bmatrix} \text{ et } \Theta = \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix}$$

Pour obtenir les paramètres du modèle, nous cherchons à minimiser l'erreur, ce qui revient à trouver  $\Theta$  solution de l'équation suivante  $\nabla_{\Theta} E_N^T E_N = 0$ . La solution est :

$$\hat{\Theta} = (\Psi_N^T \Psi_N)^{-1} \Psi_N^T Y_N \quad (5.17)$$

Les résultats pour les trois fermentations sont listés dans les tableaux 5.2 et 5.3. La biomasse a été déterminée par une moyenne des densités optiques obtenues pendant la phase d'induction. Grâce à une relation entre le poids sec et la densité optique, la biomasse moyenne a pu être évaluée approximativement en  $g/L$ .

Tableau 5.2 : Valeur des paramètres du modèle (1).

<b>Fermentation</b>	<b>[GFP]<sub>i</sub> (g/L)</b>	<b><math>\tau</math> (h)</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>Coefficient de corrélation</b>
<i>1</i>	0,32 ± 0,2	48 ± 10	0,7 ± 0,2	0,980
<i>2</i>	0,39 ± 0,2	51 ± 17	0,8 ± 0,4	0,958
<i>3</i>	0,29 ± 0,2	45 ± 14	0,5 ± 0,3	0,930
<i>Les 3 ensembles</i>	0,33 ± 0,2	52 ± 12	0,6 ± 0,2	0,895

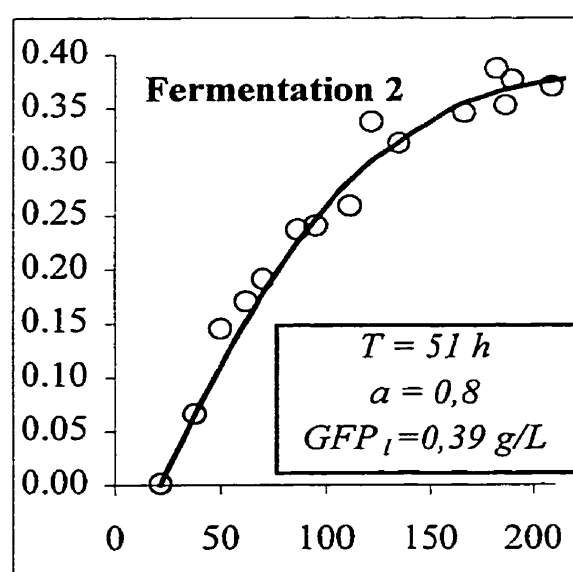
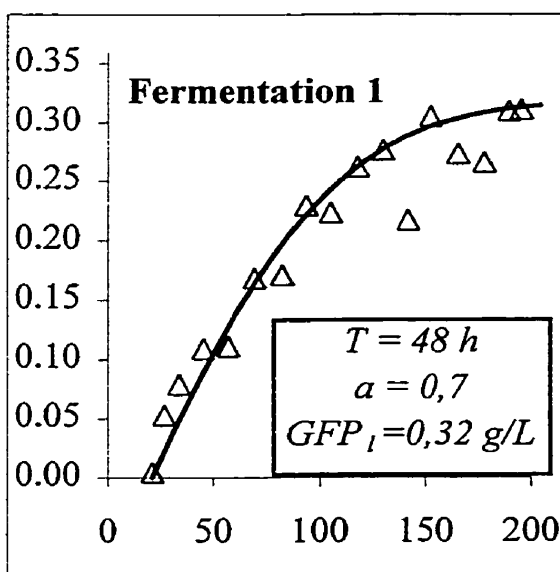
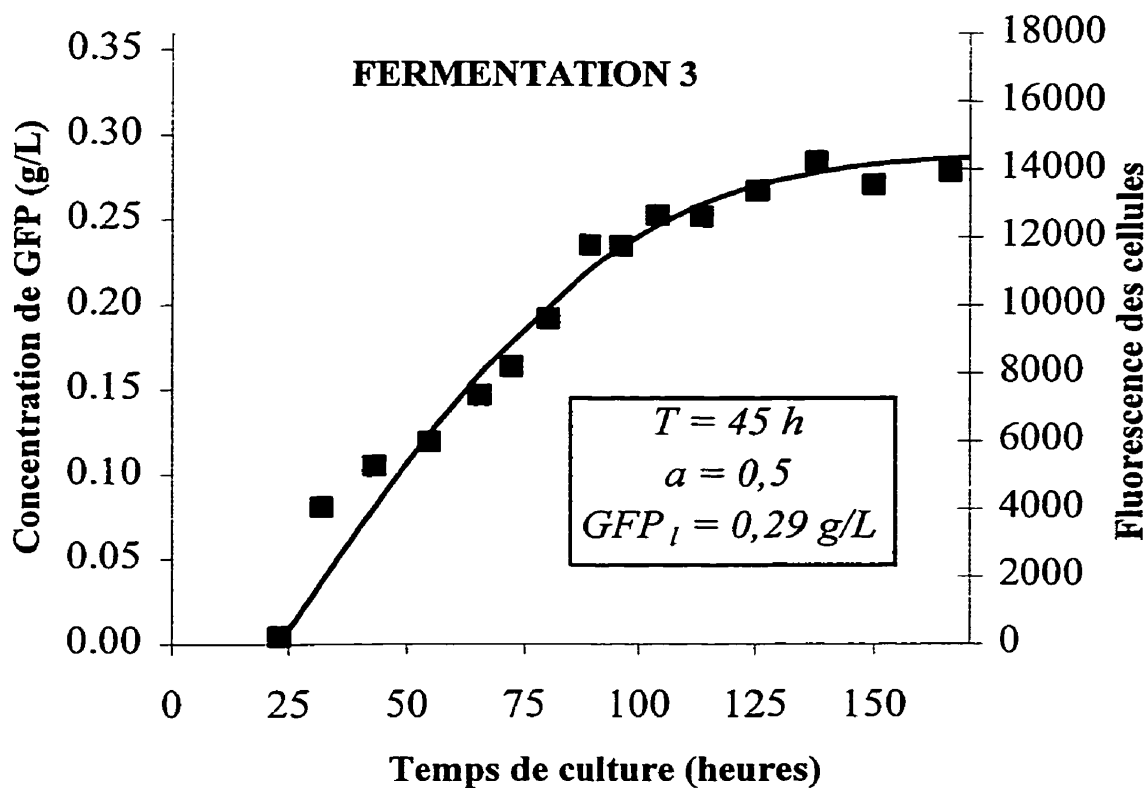


Figure 5.8 : Modèle de production de la GFP en bioréacteur pour chaque fermentation. La ligne continue représente le modèle alors que les signes ■, ○, ▲ représentent les points

expérimentaux. Les paramètres encadrés sont ceux du modèle pour chaque série de données ( $T$  est la constante de temps ( $\tau$ ),  $\alpha$  le paramètre d'affinité du substrat ( $\alpha$ ) et  $[GFP]_l$  la concentration limite en GFP). Le modèle pour la production de GFP dans *Pichia pastoris* avec les paramètres suivants  $\tau = 52$  h,  $\alpha = 0,6$ ,  $[GFP]_l = 0,33$  g/L est illustré dans la Figure 5.3.

## 5.3 Discussion

### 5.3.1 Validité et limites du modèle

#### 5.3.1.1 Commentaires sur les paramètres

Pour déterminer les paramètres (Tableau 5.2, Figure 5.8), tous les points expérimentaux n'ont pas été utilisés. Nous avons éliminé les points expérimentaux lorsque la valeur de la concentration en GFP était supérieure à la valeur de  $[GFP]_l$  car le rapport  $[GFP]$  sur  $[GFP]_l$  est supérieur à 1 et lorsque leur valeur était incertaine liée à une erreur expérimentale. La liste des points expérimentaux qui ont été utilisés dans le calcul des paramètres du modèle est énumérée en annexe A6.1.

Les valeurs des paramètres ( $[GFP]_l$ ,  $\alpha$ ,  $\tau$ , biomasse produite) semblent assez différentes (Tableau 5.2) mais comme l'incertitude sur les valeurs est assez grande, les valeurs de ces paramètres sont dans le même intervalle. La production de GFP est donc caractérisée par une constante de temps ( $\tau = 52$  h), un paramètre d'affinité du substrat limitant ( $\alpha = 0,6$ ) et une concentration limite en GFP ( $[GFP]_l = 0,33$  g/L)

Les paramètres qui devraient être aussi similaires sont le rapport  $[GFP]_l$  sur la biomasse et le  $q_{GFP}^{max}$ ; en effet, le rapport ( $[GFP]_l / \text{biomasse}$ ) représente la capacité de production spécifique de GFP par cellule dans les conditions utilisées et  $q_{GFP}^{max}$  représente le taux maximum de production qui peut être atteint avec ce système en ayant des conditions optimales (non réalisées dans ce projet). Pour déterminer  $q_{GFP}^{max}$ , nous avons utilisé la relation sur la constante de temps ( $q_{GFP}^{max} = [GFP]_l / (X\tau)$ ) trouvée grâce à la modélisation.

Les valeurs obtenues de  $[GFP]_i/X$  et de  $q_{GFP}^{max}$  sont assez semblables (Tableau 5.3). Voici une liste de raisons possibles qui pourraient expliquer les incertitudes sur la valeur des paramètres :

- La contamination de la fermentation 2 peut avoir eu une influence sur la valeur des paramètres. En effet, le substrat limitant pourrait avoir été utilisé par le contaminant. Notons que toute contamination peut nécessairement affecter la valeur de divers paramètres de fermentation, du moins en théorie.
- Le volume de culture était légèrement plus élevé pour les fermentations 1 et 2 que pour la fermentation 3 (15 L au lieu de 14 L de milieu dans un volume de 20 L). Cette modification peut avoir influencé les paramètres car même si les concentrations en substrats sont les mêmes, l'aération et l'agitation peuvent avoir été modifiées à cause de l'augmentation du volume.
- La fermentation 1 étant la première réalisée en bioréacteur, les données expérimentales sont moins précises. Pour déterminer les paramètres du modèle, toutes les données n'ont pas été prises en compte.
- Comme la fluorescence est calculée lorsque la concentration en GFP est supérieure à 0,2 g/L, les résultats de fluorescence au delà de cette valeur sont donc moins précis, ce qui peut encore influencer la valeur des paramètres du modèle.

Tableau 5.3 : Valeur des paramètres du modèle (2).

Fermentation	Biomasse (g/L)	$[GFP]_i/Cellule$ (mg/g)	$q_{GFP}^{max}$ ( $10^{-3}/h$ )
1	$11,8 \pm 0,2$	$27 \pm 2$	$0,56 \pm 0,16$
2	$14,2 \pm 0,3$	$27 \pm 2$	$0,53 \pm 0,21$
3	$12,4 \pm 0,2$	$23 \pm 2$	$0,52 \pm 0,20$

### 5.3.1.2 Utilisation du modèle

Ce modèle a été développé dans le cadre d'une production intracellulaire de GFP par *Pichia pastoris*. Le premier objectif de cette modélisation est tout d'abord de montrer que

la GFP peut être un outil de monitoring et que nous pouvons développer des modèles pour la production de protéines hétérologues avec la mesure de la fluorescence. Ce modèle a mis en évidence un substrat limitant. Il peut donc être utilisé en vue de déterminer le substrat ou les substrats limitants : tout essai sur un substrat pourra être observé grâce à la variation des paramètres du modèle au-delà du domaine d'incertitude de ceux-ci et à la variation de la fluorescence. La troisième utilisation de ce modèle est qu'il permet de définir un temps optimal de récolte. Ce temps dépend de plusieurs facteurs : niveau de production désiré, facteurs économiques (coût des produits, coût de la main d'œuvre...), risques de contamination...etc. En effet, en fonction de la valeur du rapport  $[GFP]_f/[GFP]_i$  ( $[GFP]_f$  représentant la quantité de GFP produite au moment de la récolte) que nous souhaitons obtenir, nous pouvons déterminer le temps de récolte.

Les limites de ce modèle sont liées aux hypothèses et caractéristiques suivantes :

- La GFP est stable en bioréacteur dans *Pichia pastoris* et ne perd pas sa capacité à être fluorescente.
- Ce modèle suppose l'existence d'un substrat limitant comme acteur principal du phénomène de ralentissement de la production de GFP.
- Ce modèle ne tient pas compte de la phase de latence ou phase d'acclimatation de la cellule au méthanol. Cette phase de latence commence quand le méthanol est ajouté au milieu et s'achève dès que la synthèse de la GFP commence.

### 5.3.2 Substrat limitant

Le modèle développé met en évidence un substrat limitant qui serait la cause du ralentissement de la production de GFP. Grâce à nos expériences, nous pouvons déterminer à quelles catégories de nutriments le substrat S peut appartenir. Trois catégories de nutriments sont importantes : les éléments majeurs (C, O, H, N, P, S), les éléments mineurs ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) et les oligo-éléments ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ ) (voir le paragraphe 2.2.1.1 du chapitre II).



Nous avons suivi l'évolution du méthanol au cours des expériences (Figure 5.2 et annexe A4.1). La concentration en méthanol a toujours été suffisante bien que variable dans le temps puisque nous alimentons la culture en méthanol. Le méthanol a toujours été consommé même lorsque la production de GFP a ralenti. Notons que dans nos travaux sur le méthanol, l'évaporation, non négligeable (le méthanol est une substance volatile, voir annexe VII), ne fut pas quantifiée, les courbes d'évolution du méthanol ne peuvent donc pas permettre d'effectuer des calculs précis au niveau de la consommation. Selon d'autres travaux effectués dans le laboratoire par Desautels (2000), la concentration en méthanol ajouté initialement semblerait avoir une influence sur le taux initial de production de GFP ( $q_{GFP}^0$ ).

Le pourcentage d'oxygène dissous a été suivi au moyen de la sonde à  $O_2$  dans le milieu de culture. Au cours de la phase d'induction, le pourcentage d' $O_2$  dissous fluctue en moyenne entre 70 % et 90 % (Figure 5.9). Chaque addition de méthanol au système augmente la consommation de l' $O_2$ . Grâce à la Figure 5.9 et aux figures de l'annexe A4.2, la concentration en  $O_2$  dissous était plus que suffisante et ne semble pas être un facteur limitant à la synthèse de GFP puisque nous alimentons le bioréacteur en oxygène par l'entrée d'air.

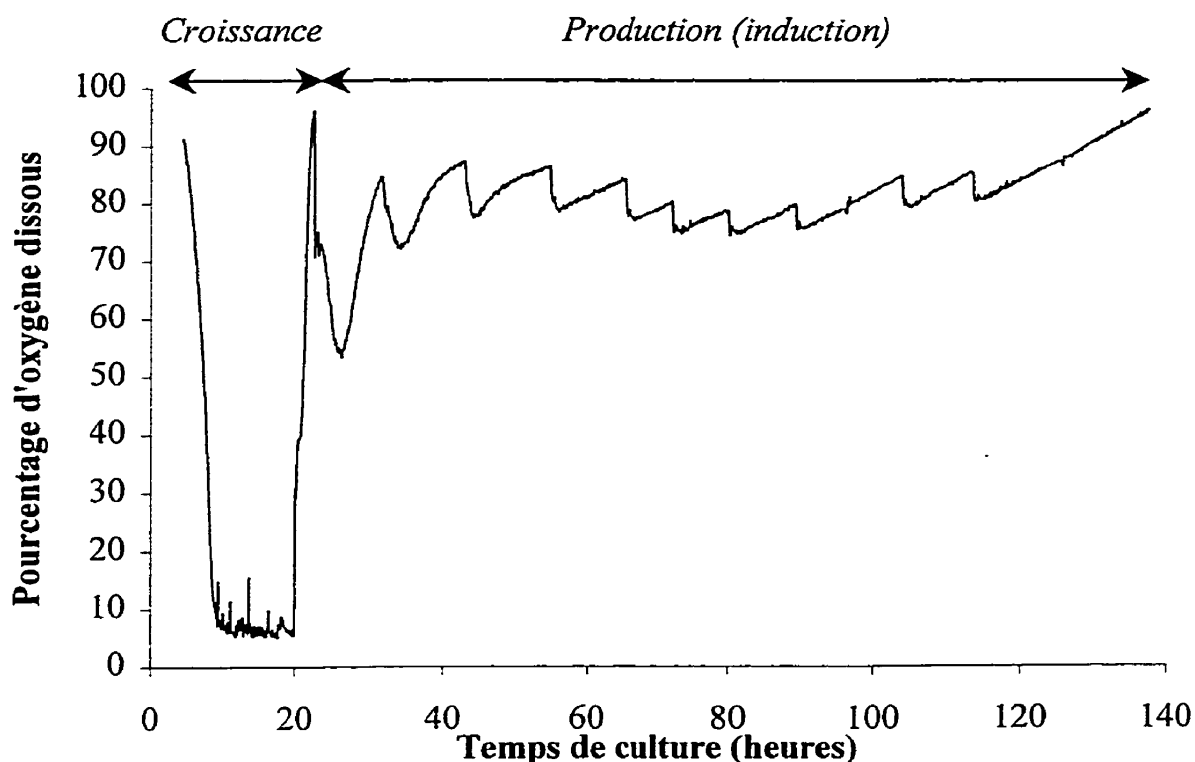


Figure 5.9 : Évolution de l'oxygène dissous pour la fermentation 3. Pour les fermentations 1 et 2, les résultats sont en annexe A4.2.

Nous avons mesuré les concentrations par HPLC des anions suivants,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$ , et des cations suivants,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{NH}_4^+$ . Ces ions ne semblent pas être limitants, ils sont toujours présents à des niveaux de concentrations assez constants (Tableau 5.4 et les figures de l'annexe A4.3). Les variations au cours du temps de celles-ci sont souvent dues au contrôle du pH qui ajoute les solutions d'acide ou de base contenant les ions  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ . Les niveaux de concentration diffèrent pour la fermentation 3 par rapport aux résultats des deux autres fermentations. Il se peut qu'il y ait eu un problème au niveau de la mesure des concentrations. Néanmoins, les éléments majeurs, N, P et S ne semblent pas être ceux qui ralentissent la production de GFP. Les éléments mineurs,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$  ne semblent pas non plus être des facteurs limitants à la synthèse de la GFP.

Tableau 5.4 : Niveau des concentrations ioniques lors des fermentations. Les courbes d'évolution sont dans l'annexe A4.3. (\*Les résultats en italique sont problématiques).

<i>Anions</i>	Fermentations			<i>Cations</i>	Fermentations		
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
<i>Cl<sup>-</sup> (mM)</i>	20	20	<i>1000*</i>	<i>K<sup>+</sup> (mM)</i>	100	100	180
<i>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mM)</i>	0,2	0,2	<i>3000*</i>	<i>Na<sup>+</sup> (mM)</i>	20	20	<i>300*</i>
<i>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mM)</i>	200	200	200	<i>Mg<sup>2+</sup> (mM)</i>	3	4	5
<i>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mM)</i>	100	100	100	<i>Ca<sup>2+</sup> (mM)</i>	0,3	0,5	1
				<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mM)</i>	200	200	Non détecté

Pour récapituler, S ne semble pas être un substrat majeur (C, H, O, N, P, S), ni un substrat mineur (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>). Le fer est peut-être un élément à retenir car il n'a pas pu être mesuré au HPLC avec la colonne utilisée. Les autres éléments qui peuvent faire défaut sont les oligo-éléments (Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mo<sup>2+</sup>), les acides aminés (nécessaires à la synthèse des protéines), les purines et pyrimidines (nécessaires à la synthèse des acides nucléiques) et les vitamines (petites molécules qui forment les cofacteurs d'enzymes ou une partie de ceux-ci).

Le ralentissement de la production de GFP pourrait être dû à un manque énergétique (lacune en ATP). En effet, lorsque *Pichia pastoris* utilise le méthanol comme source de carbone, elle produit beaucoup moins d'ATP (voir la voie métabolique de dégradation du méthanol du chapitre II (Figure 2.1)) que lorsqu'elle utilise le glycérol (Prescott, 1995). Pour produire la GFP, des ATP sont nécessaires à plusieurs niveaux (synthèse des ARN, conformation de la protéine...), la saturation en GFP pourrait donc être causée par un manque d'ATP. Pour cela, l'ajout d'une autre source de carbone, pendant la phase d'induction, pourrait peut-être permettre aux cellules de stocker de l'énergie sous forme d'ATP.

## CHAPITRE VI

### CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

#### 6.1 Conclusion

L'objectif principal de ce projet était de montrer dans quelle mesure la GFP pourrait être utilisée comme une protéine modèle et comme un outil de monitoring dans la production de protéines hétérologues dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* pour des fermentations en bioréacteur de 20 litres. Grâce aux résultats obtenus, plusieurs éléments permettent d'appuyer cette voie d'utilisation de la GFP.

➤ *Fluorescence et stabilité de la GFP*

La GFP est une protéine très stable dans *Pichia pastoris*, la fluorescence mesurée et la concentration en GFP sont linéairement corrélées. La GFP ne semble pas être détruite par l'environnement et en particulier par des protéases de *Pichia pastoris*. Grâce à la fluorescence et à la stabilité de la GFP, nous pouvons quantifier toute la GFP produite par *Pichia pastoris*.

➤ *Protéine d'intérêt*

L'intérêt d'utiliser la GFP en fermentation microbienne est de coupler le gène de la GFP avec celui d'une protéine d'intérêt. En mesurant la fluorescence de façon discontinue, avec un fluoromètre, ou de façon continue, avec une sonde à fluorescence (Randers-Eichhorn et al. (1997), Gilbert et al. (2000)), nous pourrions quantifier la concentration de la protéine d'intérêt. Cependant, des expériences doivent être réalisées en vue d'établir une relation entre la fluorescence de la GFP et la concentration de la protéine d'intérêt dans *Pichia pastoris*. Albano et al. (1998) ont établi une relation entre les concentrations de la GFP et la protéine CAT (Choramphenicol Acetyl Transferase) dans la bactérie hôte, *E. coli*. Néanmoins, n'oublions pas que même si la stabilité de la GFP est avantageuse, elle peut aussi être un inconvénient (Andersen et al., 1998) car elle peut surestimer la

quantité de la protéine de fusion si la protéine de fusion est moins stable que la GFP. Notons que le taux de production de la GFP sera néanmoins le même que celui de la production de la protéine d'intérêt.

➤ *Outil pour la détermination du temps du récolte*

Le suivi du signal de fluorescence peut être un moyen de déterminer le temps de récolte du produit final. Rappelons qu'actuellement les fermentations se font souvent aveuglement et que le temps de récolte est choisi approximativement. En suivant la fluorescence et grâce au modèle, il est possible d'optimiser ce temps en fonction de divers facteurs (coût du procédé, capacité de production du système...).

➤ *Outil pour l'optimisation du procédé*

Grâce à la fluorescence et grâce à la relation linéaire entre le GFP et celle-ci, il a été possible de modéliser la production de GFP dans *Pichia pastoris*. Cette modélisation fait apparaître un substrat limitant inconnu. Le suivi de la fluorescence étant directement corrélé à la GFP, il est possible de déterminer ce substrat en faisant des essais sur certains composés car la conséquence de toute modification est directement observable grâce à la mesure de la GFP qu'elle soit continue (sonde à fluorescence dans le milieu de culture) ou discontinue (fluorométrie). Le procédé peut donc être plus facilement optimisé et l'influence de chaque paramètre peut être réellement évaluée.

La GFP peut donc bien être une protéine modèle pour comprendre et optimiser la production de protéines hétérologues dans le système hôte *Pichia pastoris* en bioréacteur.

## 6.2 Recommandations

Quelques recommandations pourraient être utiles à l'amélioration du modèle développé. Les deux premières sont faciles à mettre en place, le matériel étant disponibles à l'IRB.

➤ *Suivi continu de la composition en CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> des gaz dans le flux de sortie*

Les expériences présentées dans ce projet ne furent pas optimisées. De ce fait, assez peu de paramètres ont été suivis. Certains paramètres assez fondamentaux pour le système

étudié comme la composition du mélange gazeux sortant du réacteur pourrait être intéressante à observer, d'autant plus que ce type d'analyseur est disponible à l'IRB. Les pourcentages de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub> gazeux contenus dans le flux de gaz sortant sont des paramètres qui peuvent permettre de comprendre encore plus le comportement de *Pichia pastoris* et pourraient être des éléments importants dans l'élaboration d'un modèle plus complexe.

➤ *Suivi continu du méthanol dans le milieu de culture*

Dans le même registre, une sonde à méthanol est disponible à l'IRB et peut être installée dans le bioréacteur. Elle permettrait d'observer en continu le comportement de *Pichia pastoris* quant à la consommation du méthanol. Le suivi continu du méthanol est déterminant dans le modèle car il semble que la concentration du méthanol a une influence sur le taux initial de production de GFP,  $q_{GFP}^0$ . Cependant même si la concentration en méthanol peut être suivie facilement grâce à la sonde dans la culture, il ne faudra pas oublier de tenir compte de l'évaporation qui ne semble pas négligeable. Des travaux sont actuellement en cours à l'IRB sur l'influence de différentes stratégies d'alimentation en méthanol, mais ces travaux portent sur la production extracellulaire de GFP par *Pichia pastoris*.

➤ *Utiliser une sonde à fluorescence*

En vue d'améliorer le modèle développé et de mieux comprendre la production de GFP, il serait très intéressant d'avoir une sonde à fluorescence qui permettrait d'avoir des données continues sur l'évolution de la fluorescence au cours du temps. Une telle sonde existe (Randers-Eichhorn et al. (1997), Gilbert et al. (2000)) et, vu les résultats actuels, nous savons que la fluorescence du milieu total est égale à la fluorescence des cellules à une constante près, celle de la fluorescence du surnageant (presque constante). Cependant un tel dispositif poserait certainement des problèmes à cause de la forte production de GFP du système intracellulaire qui induirait une saturation rapide du détecteur. Il serait certainement plus facile d'utiliser la sonde dans le cas de production extracellulaire de GFP, car le niveau de production est 10 fois plus faible.

### 6.3 Perspectives d'avenir

➤ *Utiliser la GFP pour tester différentes stratégies de production*

Notre capacité à modéliser la production de la GFP et celle de mesurer la fluorescence peut devenir un outil très intéressant pour tester différentes stratégies de production de protéines. Les techniques actuelles pour comparer des stratégies différentes sont très approximatives puisque la quantité de protéines est dosée de façons discontinue, lente et approximative.

Prenons l'exemple du mixed-feeding (ajout du méthanol avec du glycérol), certains auteurs (Chruruolu et al. (1997), Thorpe et al. (1999)) affirment que cette stratégie produit plus de protéines dans *Pichia pastoris*. Grâce à la mesure continue (ou discontinue) de la fluorescence, nous pourrions tester la validité d'une telle conclusion. En effet, si l'hypothèse d'un manque d'énergie (lacune en ATP) se confirme ou semble la plus plausible, une alimentation en glycérol, pendant la phase de production de protéines, pourrait peut-être permettre d'accroître la production de protéines.

Une autre stratégie qui peut être essayée est la resuspension des cellules dans un milieu frais au cours de la phase d'induction. Cette stratégie permettrait de voir laquelle des hypothèses de toxicité ou de substrats limitants est valable. Toutefois, la difficulté d'implanter cette stratégie augmente dans la même proportion que l'échelle de production.

➤ *Produire une protéine d'intérêt*

Dans un premier temps, il est important de développer des modèles qui ne produisent que la GFP pour comprendre les atouts et les faiblesses d'un tel outil. Cependant, la production la protéine de fusion avec la GFP doit être essayée pour vérifier que le système GFP et protéine d'intérêt est productif et que les modèles développés avec la GFP seule sont applicables. Des travaux sont en cours dans ce sens à l'IRB.

## RÉFÉRENCES

- ALBANO, C.R., RANDERS-EICHHORN L., CHANG Q., BENTLEY W.E., RAO G., (1996). Quantitative measurement of green fluorescent protein expression. Biotechnology Techniques. Vol. 10, No. 12, 953-958.
- ALBANO C.R., RANDERS-EICHHORN L., BENTLEY W.E., RAO G., (1998). Green Fluorescent Protein as a Real Time Quantitative Reporter of Heterologous Protein Production. Biotechnology Progress. 14 : 351-354.
- ANDERSEN J.B., STERNBERG C., POULSEN L.K., BJORN S.P., GIVSKOV M., MOLIN S., (1998). New unstable variants of Green Fluorescence Protein for Studies of Transient Gene Expression in Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 2240-2246.
- BAILEY J.E., OLLIS D.F., (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Chemical Engineering Series. McGraw-Hill, Inc.
- BASTIN G., DOCHAIN D., (1990). On-line estimation and adaptative control of bioreactors. Process Measurement and Control, 1. Elsevier science publishers, Admsterdam, Pays-bas.
- BOKMAN S.H., WARD W.W., (1981). Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein. Biochemical and Biophysical Research. Communication. 101 : 1372-1380.
- CEREGHINO J.L., CREGG J.M., (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews. 24 : 45-66.
- CHALFIE M., TU Y., EUKIRCHEN G., WARD W.W., PRASHER D.C., (1994). Green Fluorescent Protein as a marker for Gene Expression. Science. Vol. 263, No. 5148, 802-805.



CHIRUVOLU V., CREGG J.M., MEAGHER M.M., (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentation. Enzyme and Microbial technology. **21** : 277-283.

COOPER T.G., (1977). The Tools of Biochemistry. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Toronto.

COUDERC R., BARRATTI J., (1980). Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase. Agri. Biol. Chem. **44** : 2279-2289.

CREGG J.M., MADDEN K.R., BARRINEGER K.J., THILL G.P., STILLMAN C.A., (1989). Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase genes from the Yeast *Pichia pastoris*. Molecular and Cellular Biology. **9** : 1316-1323.

CREGG J.M., VEDVICK T.S., RASCHKE W.C., (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology. **11** : 905-910.

CUBITT A.B., HEIM R., ADAMS S.R., BOYD A.E., GROSS L.A., TSIEN R.Y., (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. Trends Biochem. Sci. **20** : 448-455.

DABROWSKI S., BRILLOWSKA A., KUR J., (1999). Use of the Green Fluorescent Protein Variant (YFP) to Monitor MetArg Human Proinsulin Production in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification. **16** : 315-323.

DESAUTELS C., (2000). Cahier de laboratoire 2370 du projet 49-B10-01. Conseil National de Recherches Canada, Institut de recherche en biotechnologie.

EGLI T., VAN DIJKEN J.P., VEENHUIS M., HARDER W., FIECHTER A., (1980). Methanol metabolism in yeasts : regulation of the synthesis of catabolic enzymes. Arch. Microbiol. **124** : 115-121.

FAVRE S., BOREL-GIRAUD L., (1999). Validation de la production de la GFP par *Pichia pastoris* en fermenteur. Projet de fin d'études, Ecole Polytechnique de Montréal, Canada.

FERNANDEZ J.M., HOFFLER J.P., (1999). Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression. Academic Press, San Diego.

GAAL O., MEDGYESI G.A., VERECZKEY L. (1980). Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. A Wiley – Interscience Publication. John Wiley & Sons, Chichester.

GERVAIX A., WEST D., LEONI L.M., RICHMAN D.D., WONG-STAAAL F., CORBEIL J., (1997). A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. **94** : 4653-4658.

GILBERT P.A., GARNIER A., JACOB D., KAMEN A., (2000). On-line measurement of green fluorescent protein (GFP) fluorescence for the monitoring of recombinant adenovirus production. Biotechnology letters. **22** : 561-567.

HAGENSON M.J. (1991). Production of Recombinant Proteins in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. Bioprocess Technology. **12** : 193-212.

HIGGINS D.R., CREGG J.M., (1998). *Pichia* Protocols. Methods in Molecular Biology<sup>TM</sup>. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

HUMPHREY A, (1998). Shake Flask to Fermentor: What have We Learned?. Biotechnology progress. **14** : 3-7.

INVITROGEN, Carlsbad, California, USA (www.invitrogen.com). EasySelect<sup>TM</sup> *Pichia* Expression Kit. Catalog no.K1740-01.

JETTÉ J.F., BOURQUE D., LARAMÉE L., PACHEO-OLIVIER M., LAROCQUE R., TESSIER D., MIGUEZ C., GROLEAU D., (May 30 – June 3, 1999). Rapid screening method for selecting high GFP secretion potential in recombinant yeast. American Society for Microbiology, 99th General Meeting, Chicago, Illinois, USA.

KAIN S.R. (1999). Green Fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery. DDT. Vol. 4, No. 7, 304-312.

LAFRANCE M., (1996). Cahier de laboratoire 1927 du projet 49-B10-01. Conseil National de Recherches Canada, Institut de recherche en biotechnologie.

LISSEMORE J.L., JANKOWSKI J.T., THOMAS C.B., MASCOTTI D.P., deHASETH P.L., (2000). Green Fluorescent Protein as a quantitative reporter of relative promoter activity in *E. coli*. BioTechniques. **28** : 82-89.

MISTELI T., SPECTOR D., (1997). Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nature Biotechnology. **15** : 961-964.

NAGESWARA RAO B.D., KEMPLE M.D., PRENDERGAST F.G., (1980). Proton nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopic studies of segmental mobility in aequorin and a green fluorescent protein from *Aequorea forskalea*. Biophysical Journal. **32** : 630-632.

NIDENTHAL R.K., RILES L., JOHNSTON M., HEGEMANN J.H., (1996). Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. Yeast. **12** : 773-786.

PERARD A.L., (2000). Cahier de laboratoire 2369 du projet 49-B10-01. Conseil National de Recherches Canada, Institut de recherche en biotechnologie.

PONS M.N., (1992). Bioprocess Monitoring and Control. Hanser Series in Biotechnologie. Hanser Publishers, Munich Vienna New York Barcelona.

POPPENBERG L. FRIEHS K., FLASCHEL E., (1997). The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. Journal of Biotechnology. **58** : 79-88.

PRASHER D.C., ECKENRODE V.K., WARD W.W., PRENDERGAST F.G., CORMIER M.L., (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene. **111** : 229-233.

PRASHER D.C., (1995). Using GFP to see the light. Trends Genet. **11** : 320-323.

PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, (1995). Microbiologie. De Boeck Université.

QUANTUM BIOTECHNOLOGIES INC., (1997). Autofluorescence Proteins. AFP's™ Applications Manual.

RANDERS-EICHHORN L., ALBANO C.R., SIPIOR J., BENTLEY W.E., RAO G., (1997). On-line GFP sensor with LED excitation. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 55, No. 6, 921-926.

ROMANOS M., (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Current Opinion in Biotechnology. 6 : 527-533.

ROSSANESE O.W., SODERHOLM J., BEVIS B.J., SEARS I.B., O'CONNOR J., WILLIAMSON E.K., GLICK B.S., (1999). Golgi Structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of cell Biology. 145 : 69-81.

ROTH A.F., WARD W.W., (1983). Conformation stability after protease treatment in *Aequorea* GFP. Photochem. Photobiol. 37 : S71.

SCORER C.A., BUCKHOLZ R.G., CLARE J.J., ROMANOS M.A., (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene. 136 : 111-119.

SHIMOMURA O., (1981). Resistivity to denaturation of the apoprotein of aequorin and reconstitution of the luminescent photoprotein from the partially denatured apoprotein. Biochemical Journal. 119 : 825-828.

THORPE E.D., d'ANJOU M.C., DAUGULIS A.J., (1999). Sorbitol as a non-repressing carbon for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. Biotechnology Letters. 21 : 669-672.

TOMBOLINI, R., UNGE A., DAVEY M.E., de BRUIJN F.J., JANSSON J.K., (1997). Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 22 : 17-28.

TSCHOPP J.F., BRUST P.F., CREGG, J.M., STILLMAN C.A., GINGERAS T.R., (1987). Expression in the *LacZ* gene from two methanol-regulation promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acids Research. **15** : 3859-3876.

TSIEN R.Y., (1998). The green fluorescent protein. Annual reviews Biochemistry. **67** : 509-544.

WARD W.W., PRENTICE H., ROTH A.F., CODY C.W., REEVES S.C., (1982). Spectral perturbations of the *Aequorea* Green Fluorescent Protein. Photochem. Photobiol. **35** : 803-808.

YANG F., MOSS L.G., PHILLIPS G.N., (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. Nature Biotechnology. **14** : 1246-1251.

## ANNEXES

### Annexe I : Protocoles

#### A1.1 Listes des protocoles de l'IRB

##### A1.1.1 Pour établir le protocole de fermentation

- Protocole pour la production du TGF- $\beta$  type II par *Pichia pastoris*. (Lafrance, 1998).
- Protocole pour la production de GFP par *Pichia pastoris* (Favre, 1999).
- Protocole pour les gels d'électrophorèse (établi par Jean-François Jetté en 1997).

##### A1.1.2 Pour l'utilisation des appareils

- Protocole pour l'utilisation du GC (établi par Jean-François Jetté)
- Procédure de stérilisation des fermenteurs CHEMAP montées sur les bases CHEMAP CF-2000 (établi par Martin Lafrance en 1995, disponible à l'IRB en L-415)
- Procédure de nettoyage et de décontamination des fermenteurs CHEMAP montées sur les bases CHEMAP CF-2000 (établi par Martin Lafrance en 1995, disponible à l'IRB en L-415)
- Procédure de nettoyage des sondes pH INGOLD des fermenteurs CHEMAP (établi par Martin Lafrance en 1995, disponible à l'IRB en L-415)
- Procédure de nettoyage des sondes pO<sub>2</sub> INGOLD des fermenteurs CHEMAP (établi par Martin Lafrance en 1995, disponible à l'IRB en L-415)
- Technical Documentation – maintenance and Instruction Manual for 1 x 20 L Chemap Fermenter and Buffer vessels. NRC- CANADA (disponible en L-415)

## A1.2 Appareils

### A1.2.1 OD Beckmann (DO : densité optique) à 600 nm

Il sert à mesurer la concentration des cellules dans le milieu. Cette mesure permet de comparer mais ne permet pas de quantifier précisément. On choisit 600 nm car 600 est la longueur d'onde qui absorbe le plus les milieux biologiques donc avec cette longueur d'onde, la mesure est la plus significative.

#### *Préparation de l'échantillon*

- ❑ Faire des dilutions successives pour avoir des DO comprises entre 0,07 et 0,5. Au-delà, le résultat n'est plus valide.

#### *Utilisation de l'appareil*

- ❑ Sélectionné **fixed wavelength**
- ❑ Choisir **600 nm**
- ❑ Mettre la lumière visible en route : **vis on** et attendre quelques minutes.
- ❑ Faire l'étalonnage avec la solution saline ou avec le milieu stérile initial : **blank**.
- ❑ Ajouter l'échantillon puis lancer : **read sample**.
- ❑ Eteindre la lumière : **vis off**

### A1.2.2 Autoclave 1 (L449)

Elle sert à stériliser. Ça dure environ 45 minutes..

- ❑ Noter son nom, le numéro du labo, la date, la durée de la stérilisation
- ❑ Rajouter de l'eau dans le fond jusqu'au rebord.
- ❑ Installer les éléments à stériliser.
- ❑ Paramètres à régler : temps : 20 minutes, vitesse : **low** (pour les liquides) ou **fast** (pour les solides).

- ❑ Appuyer sur **Reset** avant de commencer.
- ❑ Fermer l'autoclave en faisant attention au joint.
- ❑ Pour ouvrir, attendre que la pression soit proche de 0.
- ❑ Prendre des gants pour ne pas se brûler.

### **A1.2.3 Autoclave 2 (labo environnement)**

Elle sert à stériliser.

- ❑ Noter son nom, le numéro du labo, la date, la durée de la stérilisation.
- ❑ Installer les éléments à stériliser.
- ❑ Paramètres à régler : temps de stérilisation : 20 minutes, temps de séchage : 0 pour la plupart ou 5 pour les solides (ce temps est important pour la stérilisation des filtres car ils doivent être secs).
- ❑ Appuyer sur **reset** avant de commencer.
- ❑ Choisir **Gravity** ou **Liquids** en fonction de ce que l'on stérilise
- ❑ Fermer l'autoclave
- ❑ Pour ouvrir, attendre que la pression soit proche de 0.
- ❑ Prendre des gants pour ne pas se brûler.

### **A1.2.4 Centrifugeuse**

Elle permet de récupérer le surnageant ou les cellules.

#### ***Préparation de l'échantillon***

- ❑ Prendre des contenant prévus à cet effet (par paire). Il est préférable d'utiliser des contenants en plastique pour résister à des vitesses très élevées.
- ❑ Les remplir avec le milieu avec un poids identique exactement. Utiliser la balance de Roberval et une pipette.



### *Utilisation de l'appareil*

- Déterminer la vitesse de centrifugation en fonction de la force souhaitée grâce à la table (10 kg pendant 10 minutes à 4 C pour les cellules de *Pichia pastoris* est correct).
- Régler les paramètres en appuyant sur le **nom du paramètre** à régler et **enter** à chaque fois.
- Noter son nom, le numéro de labo, la date, la durée, la vitesse du moteur, la température et le type de contenant.

### **A1.2.5 Balance pour le poids sec des cellules**

#### *Préparation de l'échantillon*

- Centrifuger 2 mL, jeter le surnageant et le remplacer par de l'eau, prélever 2 g de ce mélange puis le déposer sur la coupelle par petites gouttes.

#### *Utilisation de l'appareil*

- Appuyer sur **on**.
- Poser une coupelle en aluminium.
- Appuyer sur **enter** pour faire la tare.
- Choisir le mode de résultat désiré (% solide, % liquide...).
- Poser 2 g sur la coupelle par petites gouttes.
- Fermer le couvercle et attendre.

### **A1.2.6 GC (Gas Chromatograph)**

Il sert à mesurer la concentration de méthanol dans le milieu. L'échantillon liquide injecté est transformé en vapeur, cette vapeur est analysée.

Comme l'appareil utilisé lors des expériences est remplacé par un nouveau, le mode d'utilisation ne sera pas décrit dans ce mémoire.

### A1.2.7 Fluoromètre

Il permet de mesurer la fluorescence global d'un échantillon. Le résultat est arbitraire, ce pourquoi on utilise un blanc, il permet juste de voir que la fluorescence augmente ou pas au cours de notre expérience.

#### *Préparation de l'échantillon*

- Prendre une grille avec des puits (cell wells 96)
- Remplir des puits dans le cas extracellulaire avec 100  $\mu$ L de milieu brut comme témoin et avec le surnageant comme mesure. Dans le cas intracellulaire, on peut mettre le surnageant comme témoin et le milieu complet comme mesure. Cependant, dans le cas intracellulaire, mieux vaut prendre trois mesures : le milieu total, le surnageant (témoin de la lyse cellulaire), le milieu avec les cellules (témoin de la production de GFP).
- Remplir plusieurs trous avec le même échantillon pour confirmer les résultats.

#### *Utilisation de l'appareil*

- Allumer l'appareil (imprimante sur le côté, écran, ordinateur et fluoromètre)
- Lancer la commande **cyto**
- Ouvrir un **new file**
- Ecrire son nom, GFP, le mon du labo L-449 et **corning 96**
- Vérifier le type de filtre (**B** pour mesurer la fluorescence dans notre cas) et le sensibilité (choisir 3)
- Mettre la grille dans le trou prévu à cet effet
- Attendre
- Imprimer les résultats
- On peut aussi sauvegarder son document sur une disquette (B:\)

- Eteindre les 4 appareils

NB 1 : si la fluorescence est de 9999 alors il faut diluer l'échantillon avec une solution saline. Il faut prendre plusieurs dilutions pour le même échantillon. La fluorescence doit aussi dépasser 100 pour être significative.

### A1.3 Fermentation en Erlenmeyers

#### A1.3.1 Les souches

<i>Souche</i>	<i>Tubes</i>	<i>BMGY</i> <i>(Erlenmeyers)</i>	<i>Méthanol</i>	<i>BMMY</i> <i>(Erlenmeyers)</i>
D14	1	3	1 % au départ	1
D14	1	3	0,2 % tout le long	1
KM71	1	3	1 % au départ	1

#### A1.3.2 Les solutions

##### *Tampon 1M PO4*

□ 500 mL de 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

<i>Ingrédients</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Numéro de lot</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			87.09 g	
H <sub>2</sub> O			500 mL	

□ 2000 mL de 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

<i>Ingrédients</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Numéro de lot</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			272.18 g	
H <sub>2</sub> O			2000 mL	

□ Mélange

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	264 mL g	
1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1736 mL	

- Vérifier le pH, il doit être prêt de 6. Sinon, il faut l'ajuster en ajoutant de l'acide ou de la base.
- Stériliser le tampon.
- Conserver le à la température de la pièce.

#### ***Solution de 5X YNB***

- Dissoudre les ingrédients suivants. Il peut être nécessaire de chauffer un peu pour dissoudre les ingrédients et d'ajouter quelques mL de HCl

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Fournisseur</i></b>	<b><i>Numéro de lot</i></b>	<b><i>Quantité</i></b>	<b><i>Initiales</i></b>
YNB w/o AA			67 g	
H <sub>2</sub> O			1000 mL	

- Stériliser la solution par filtration dans 1 unité de 1000 mL avec un filtre de 0,2 µm
- Étiqueter le récipient avec la date d'expiration (un an)
- Conserver à 4°C

#### ***Solution de 500X Biotine***

- Dissoudre les ingrédients suivants :

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Fournisseur</i></b>	<b><i>Numéro de lot</i></b>	<b><i>Quantité</i></b>	<b><i>Initiales</i></b>
Biotine			20 mg	
H <sub>2</sub> O			100 mL	

- Stériliser la solution par filtration dans une unité de 250 mL et un filtre de 0.2 µm
- Etiqueter le récipient avec la date d'expiration (un an)
- Garder stérilement la solution à 4°C

#### ***Solution de 10X MeOH (concentration de 10% v/v)***

- Mélanger les ingrédients suivants

<i>Ingrédients</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Numéro de lot</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
MeOH			10 mL	
H <sub>2</sub> O			90 mL	

- Stériliser la solution par filtration dans une unité de 250 mL avec un filtre de 0,2 µm.
- Étiqueter avec la date d'expiration (deux mois).
- Conserver stérilement à 4 C

***Solution de MeOH (Concentration 100%)***

- Stériliser la quantité suivante de méthanol avec une unité de filtre de 0,2 µm.

<i>Ingrédient</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Numéro de lot</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
MeOH			100 mL	

Étiqueter avec la date d'expiration (deux mois).

Conserver stérilement à la température de la pièce dans le cabinet de sécurité jaune.

***Solution saline (Concentration 0,85%)***

- Mélanger les ingrédients suivants

<i>Ingrédients</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Numéro de lot</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
NaCl			1,7 g	
H <sub>2</sub> O			200 mL	

- Étiqueter avec la date d'expiration (un an)
- Stériliser à l'autoclave
- Conserver stérilement à la température de la pièce

***Préparation du milieu BMGY pour les fioles***

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité</i>

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glycérol	10 mL
H <sub>2</sub> O	1000 mL

- Dissoudre les ingrédients dans 70% du volume total (2000 mL) pour tenir compte des solutions qui seront ajoutées après la stérilisation (ie 1400 mL).

<i>Ingrédients</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Numéro de lot</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
Extrait de levure			20 g	
Peptone			40 g	
Glycérol			30 g	
H <sub>2</sub> O			1400 mL	

- Remplir les fioles comme suit avec le BMGY préparé :

<i>Nombre</i>	<i>Erlenmeyer</i>	<i>Volume ajouté</i>	<i>Total</i>
9	500 mL	105 mL	945 mL
<i>Nombre</i>	<i>Tubes</i>		
3	50 mL	7 mL	21 mL
<b>Total</b>			966 mL
<b>BMGY extra</b>			434 mL
<b>Milieu total préparé</b>			1400 mL

- Stériliser les fioles à l'autoclave et la bouteille qui contient l'extra BMGY
- Quand les fioles ont refroidi, ajouter les ingrédients suivants dans chaque

<i>Erlenmeyer</i>	<i>Solutions</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
-------------------	------------------	-----------------	------------------

150 mL dans 500 mL	Tampon 1M PO4	15 mL	
(105 mL de milieu BMGY)	5X YNB	30 mL	
	500X Biotine	0.3 mL	
<b><i>Tubes</i></b>	<b><i>Solutions</i></b>	<b><i>Quantité</i></b>	<b><i>Initiales</i></b>
10 mL dans 50 mL	Milieu BMGY	7 mL	
	Tampon 1M PO4	1 mL	
	5X YNB	2 mL	
	500X Biotine	0.02 mL	

***Préparation du milieu BMMY***

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Quantité</i></b>
Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
H <sub>2</sub> O	1000 mL

- Dissoudre les ingrédients dans 60% du volume total (500 mL) pour tenir compte des solutions qui seront ajoutées après la stérilisation (ie 300 mL).

<b><i>Ingrédients</i></b>	<b><i>Fournisseur</i></b>	<b><i>Numéro de lot</i></b>	<b><i>Quantité</i></b>	<b><i>Initiales</i></b>
Extrait de levure			5 g	
Peptone			10 g	
H <sub>2</sub> O			300 mL	

- Remplir les fioles comme suit avec le BMMY préparé :

<b><i>Nombre</i></b>	<b><i>Erlenmeyer</i></b>	<b><i>Volume ajouté</i></b>	<b><i>Total</i></b>
3	500 mL	60 mL	180 mL



<i>Total</i>			180 mL
<i>BMMY extra</i>			120 mL
<i>Milieu Préparé</i>			300 mL

- Stériliser la fiole à l'autoclave
- Quand les fioles ont refroidi, ajouter les ingrédients suivants :

<i>Erlenmeyer</i>	<i>Solutions</i>	<i>Quantité</i>	<i>Initiales</i>
100 mL dans 500 mL	Tampon 1M PO <sub>4</sub>	10 mL	
(60 mL de BMMY)	5X YNB	20 mL	
	10X MeOH	10 mL pour D14 et témoin 2 mL pour D14 + 8 mL H <sub>2</sub> O	
	500X Biotine	0.2 mL	

### A1.4 Feuille de suivi pour le SDS-PAGE

Date de la manipulation :

Type d'expérience :

Numéro de lot du gel :

Date d'expiration :

# du puits	Contenu du puits	Volume dans le puits	Volume de l'échantillon (μL)	Volume de RB (μL)	Volume de SB (μL)
1	LMW pharmacia	20	5	15	10
2		20	20	0	10
3		20	20	0	10
4		20	20	0	10
5		20	20	0	10
6		20	20	0	10
7		20	20	0	10
8		20	20	0	10
9		20	20	0	10
10	LMW Pharmacia	20	5	15	10

## Annexe II : Taux spécifique de croissance

Dans le cadre de nos cultures, la croissance a lieu sur glycérol. Lorsque le glycérol est épuisé, les cellules sont encore en croissance exponentielle. La phase de latence semble assez courte, voire négligeable. En effet, l'observation de l'évolution de l'oxygène dissous en bioréacteur montre que les cellules consomment très rapidement l'oxygène.

Dans les cultures en cuvée, le bilan sur la production de biomasse est le suivant avec  $\mu$  le taux de croissance et  $X$  la biomasse :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{A.1})$$

La solution est la relation suivante où  $X_0$  est la biomasse à  $t_0$ .  $t_0$  est le temps de fin de la phase de latence.

$$X = X_0 \exp(\mu(t - t_0)) \quad (\text{A.2})$$

Pour déterminer le taux de croissance  $\mu$ , nous avons fait une interpolation exponentielle des points en phase de croissance en considérant la période de latence négligeable (i.e.  $t_0 = 0$ ). La Figure A.VI.1 illustre la méthode, ces résultats proviennent d'une fermentation en bioréacteur avec *Pichia pastoris*.

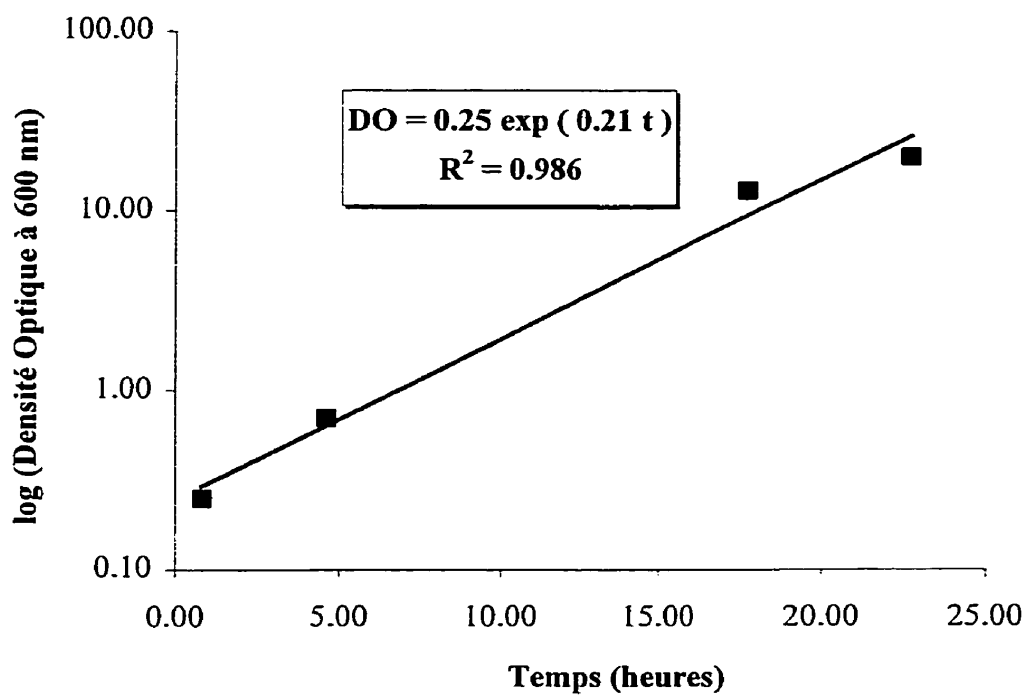


Figure A.VI.1 : Exemple de détermination du taux de croissance.  $\mu$  vaut dans cet exemple  $0,21 \text{ h}^{-1}$ .

### Annexe III : Validité des analyses des échantillons

Nous avons quantifié ici le degré d'incertitude sur les principales analyses désirées (densité optique, fluorescence des cellules et concentration en méthanol). Pour un même échantillon brut, nous avons répété cinq fois la procédure d'analyse (dilution, mesure et calcul). Nous avons comparé les cinq mesures en calculant un pourcentage d'erreur par rapport à la moyenne. Les résultats sont présentés dans la Figure A.VI.2. Les erreurs commises sont inférieures à 6 % (Tableau A.1).

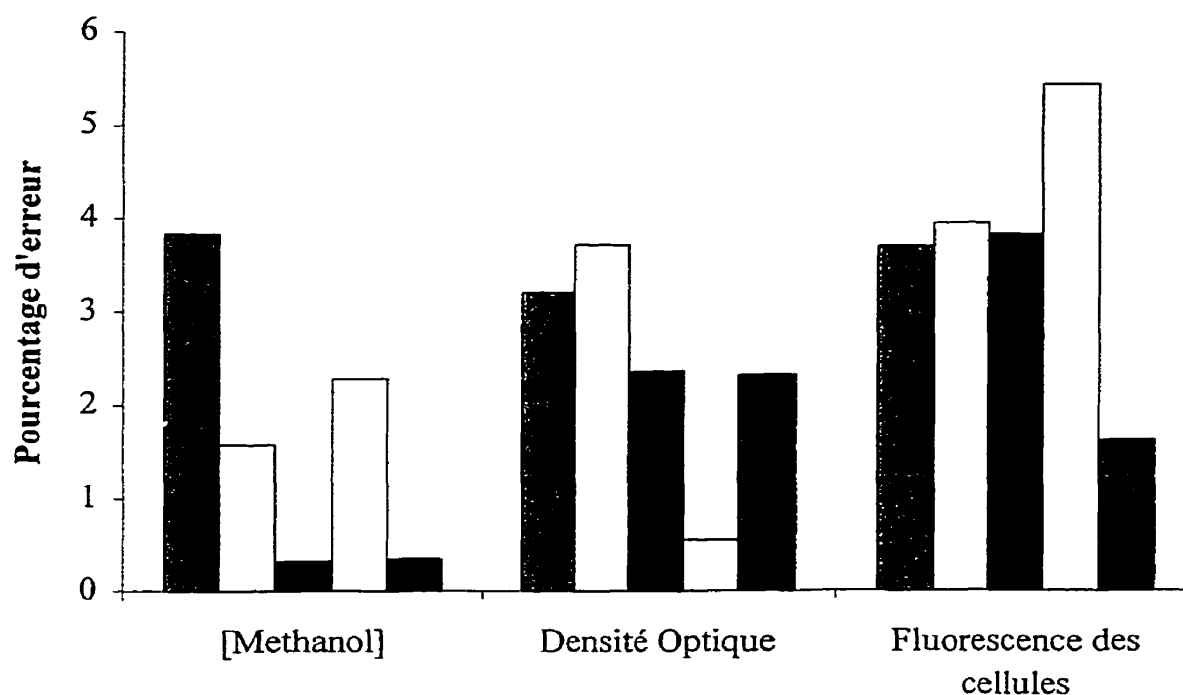


Figure A.VI.2 : Intervalle d'erreur des analyses de densité optique, concentration en méthanol et fluorescence des cellules pour 5 essais différents.

Tableau A.1 : Comparaison des pourcentages d'erreur à partir des données de la Figure A.VI.2.

	<b>Méthanol</b>	<b>Densité Optique</b>	<b>Fluorescence des cellules</b>
<i>Moyenne</i>	1,67 %	2,43 %	4 %
<i>Erreur minimale</i>	0,32 %	0,55 %	1,62 %
<i>Erreur maximale</i>	3,83 %	3,71 %	5,44 %

## Annexe IV : Cinétiques

### A4.1 Évolution des sources de carbone pour F1 et F2

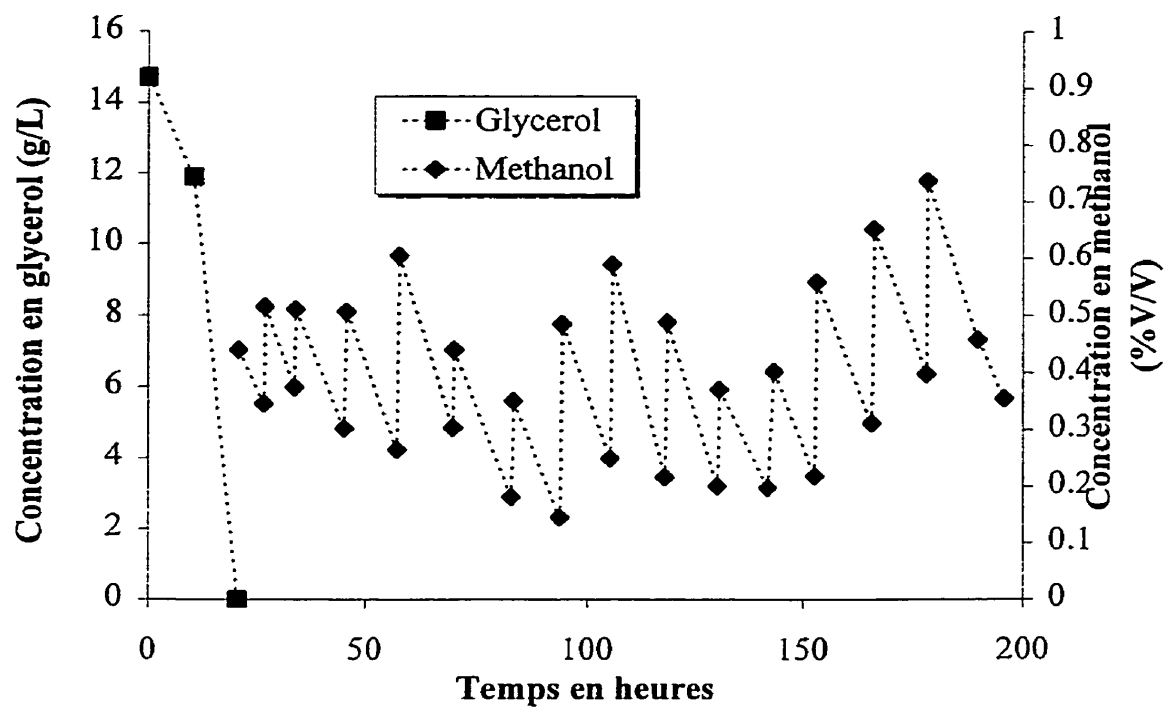


Figure A.VI.3 : Évolution des sources de carbone pour F1

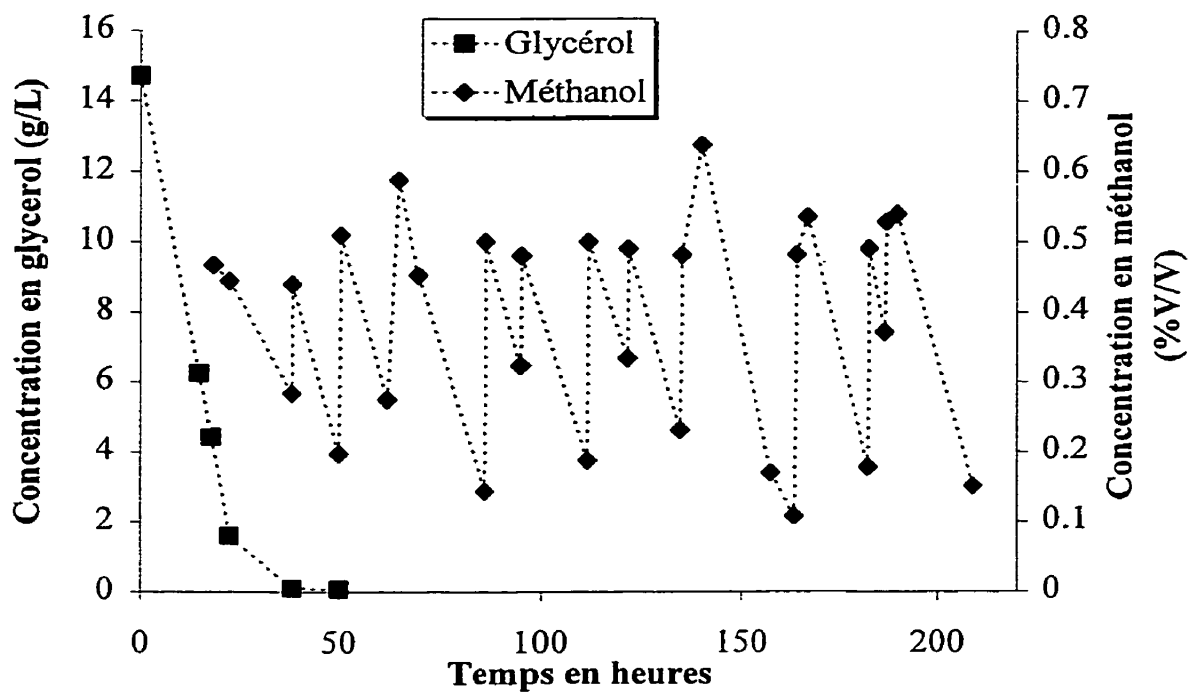


Figure A.VI.4 : Évolution des sources de carbone pour F2.



## A4.2 Évolution de la concentration en oxygène dissous pour F1 et F2

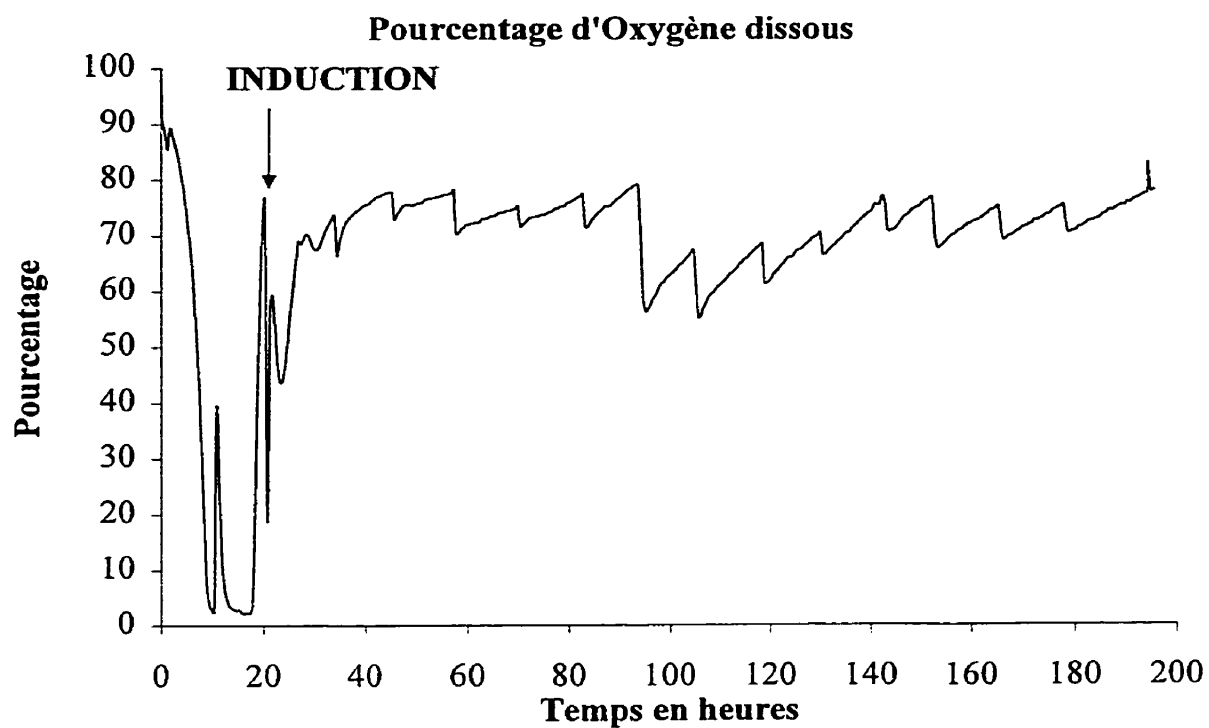


Figure A.VI.5 : Évolution de la concentration en oxygène dissous pour F1.

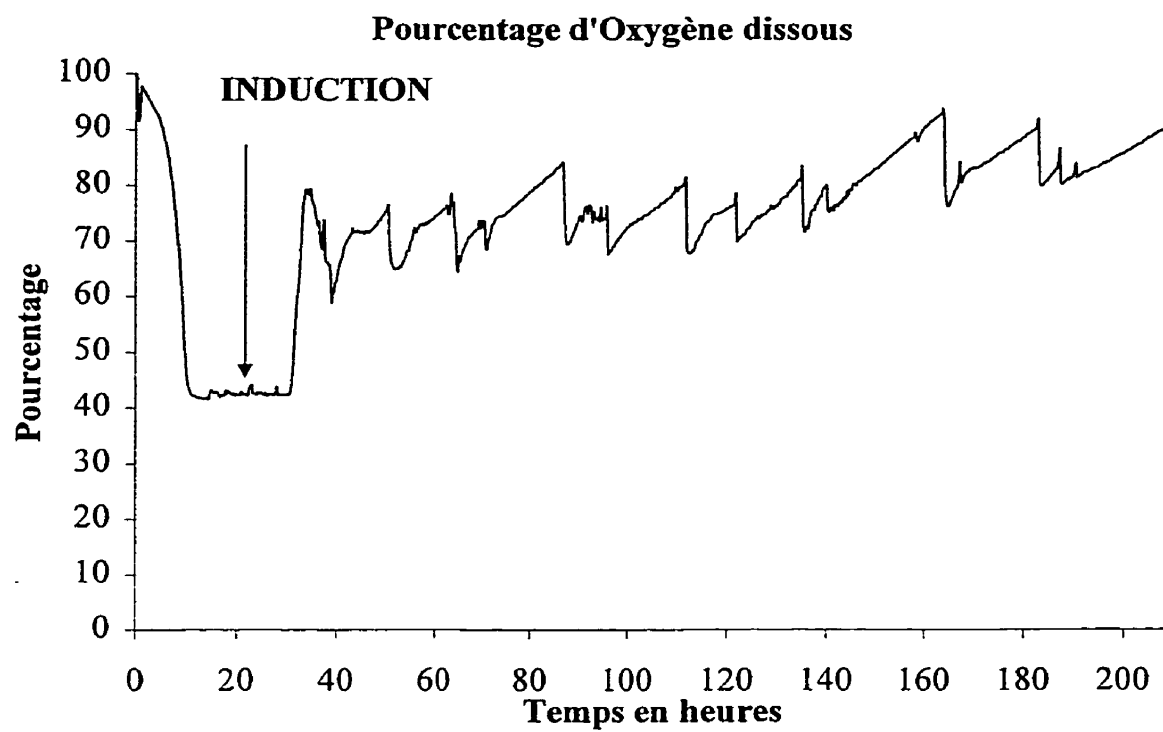


Figure A.VI.6 : Évolution de la concentration en oxygène dissous pour F2.

### A4.3 Évolution des concentrations ioniques pour F1, F2 et F3

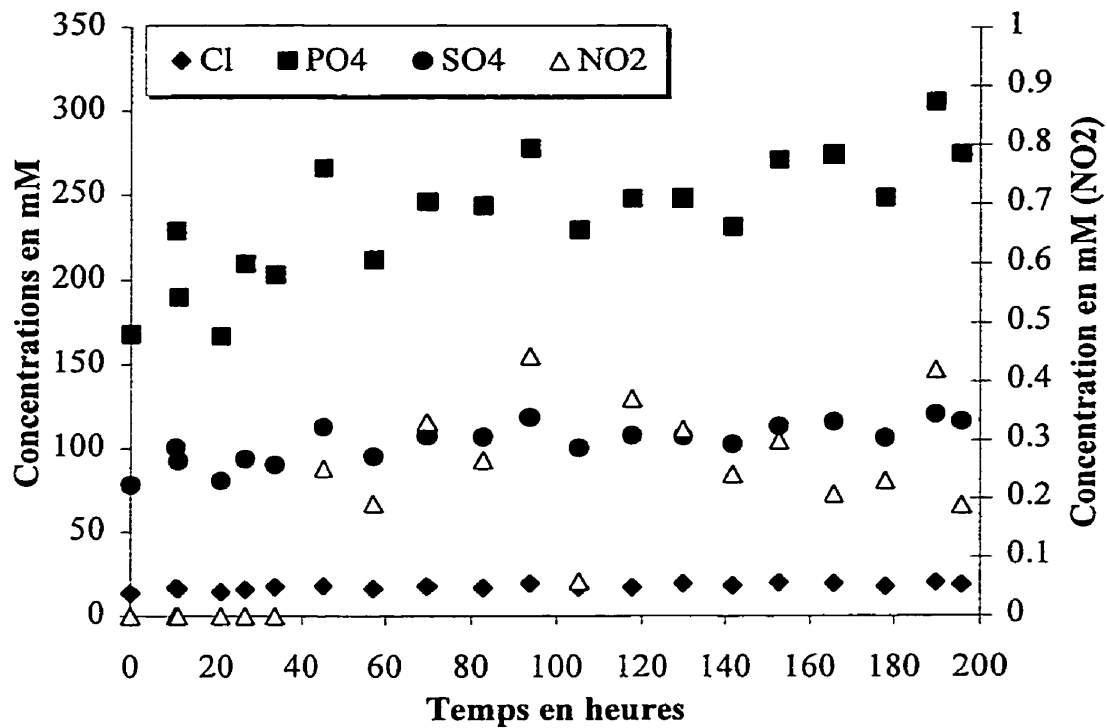


Figure A.VI.7 : Évolution de la concentration en anions pour F1.

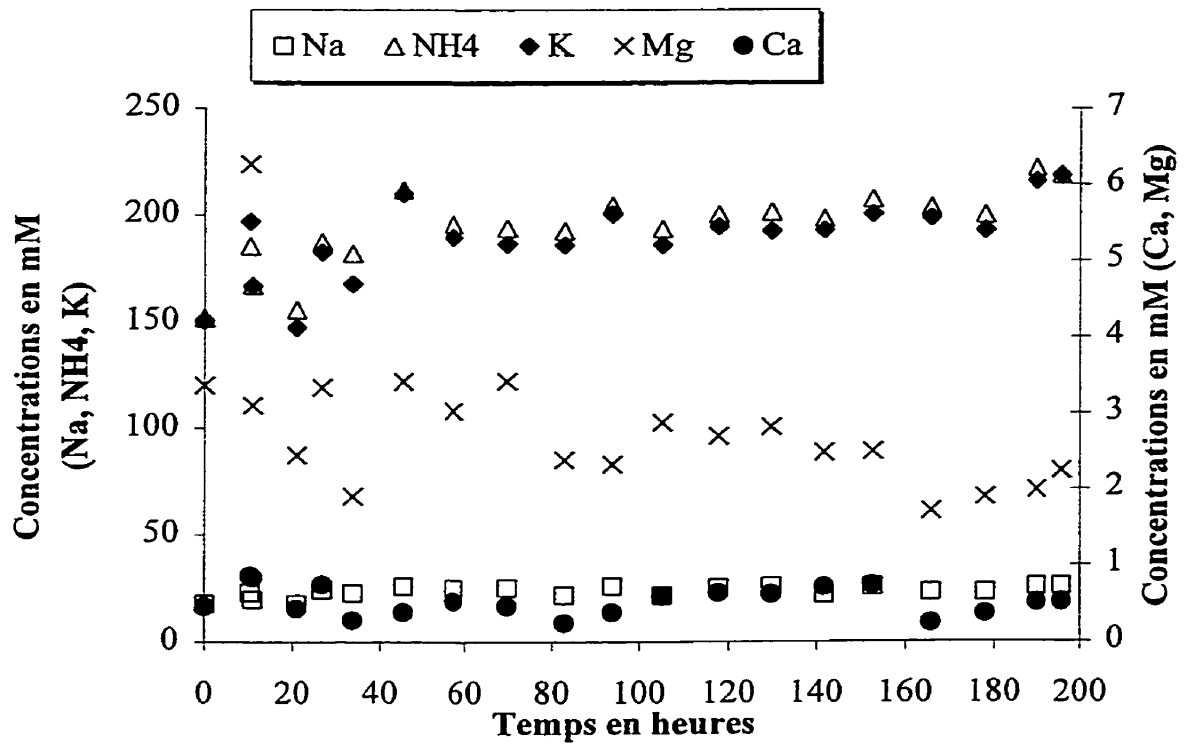


Figure A.VI.8 : Évolution de la concentration en cations pour F1.

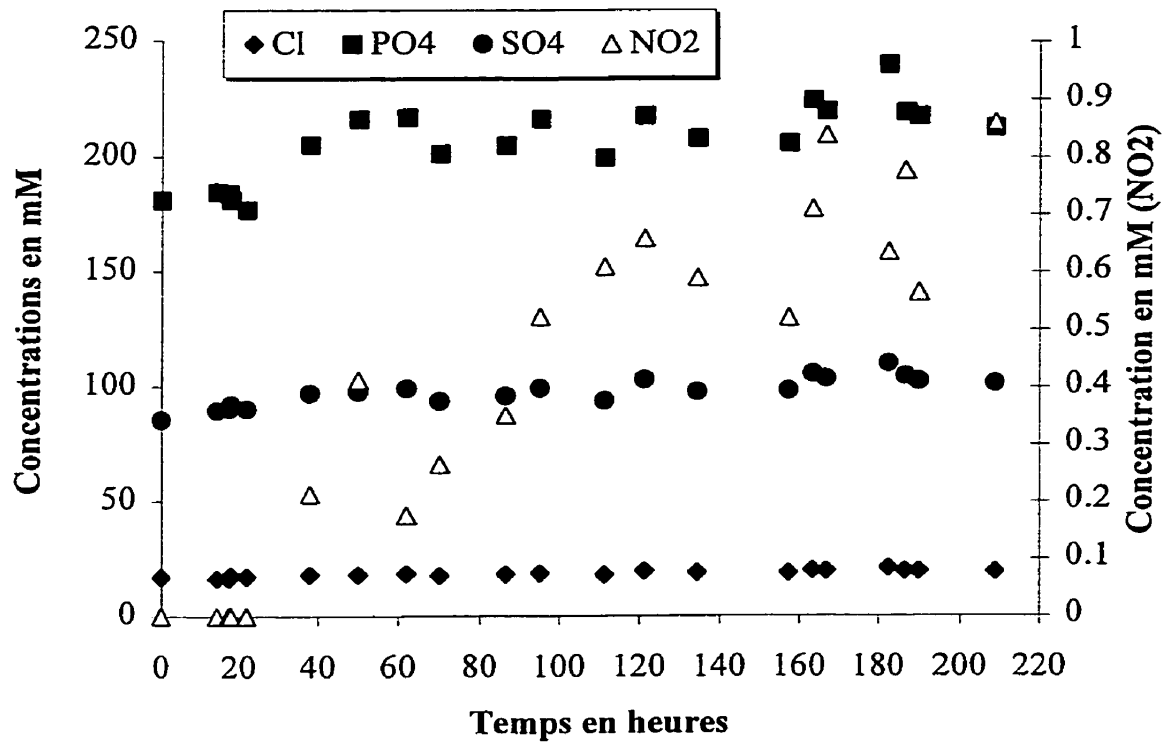


Figure A.VI.9 : Évolution de la concentration en anions pour F2.

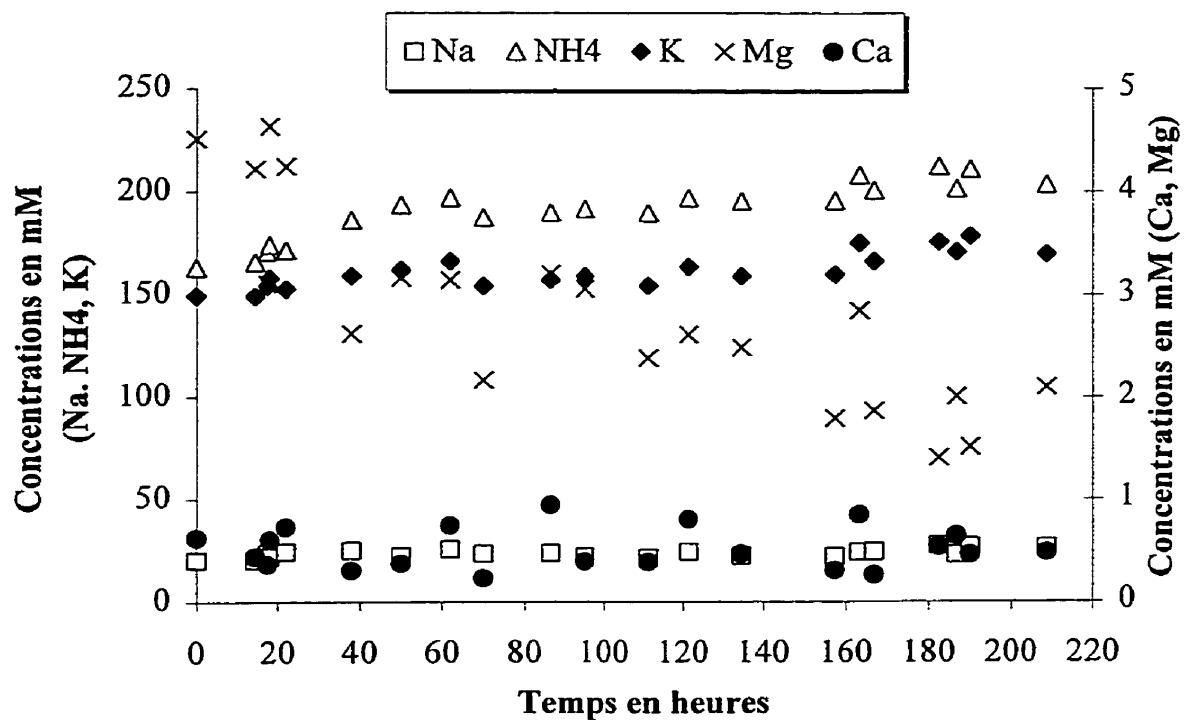


Figure A.VI.10 : Évolution de la concentration en cations pour F2.

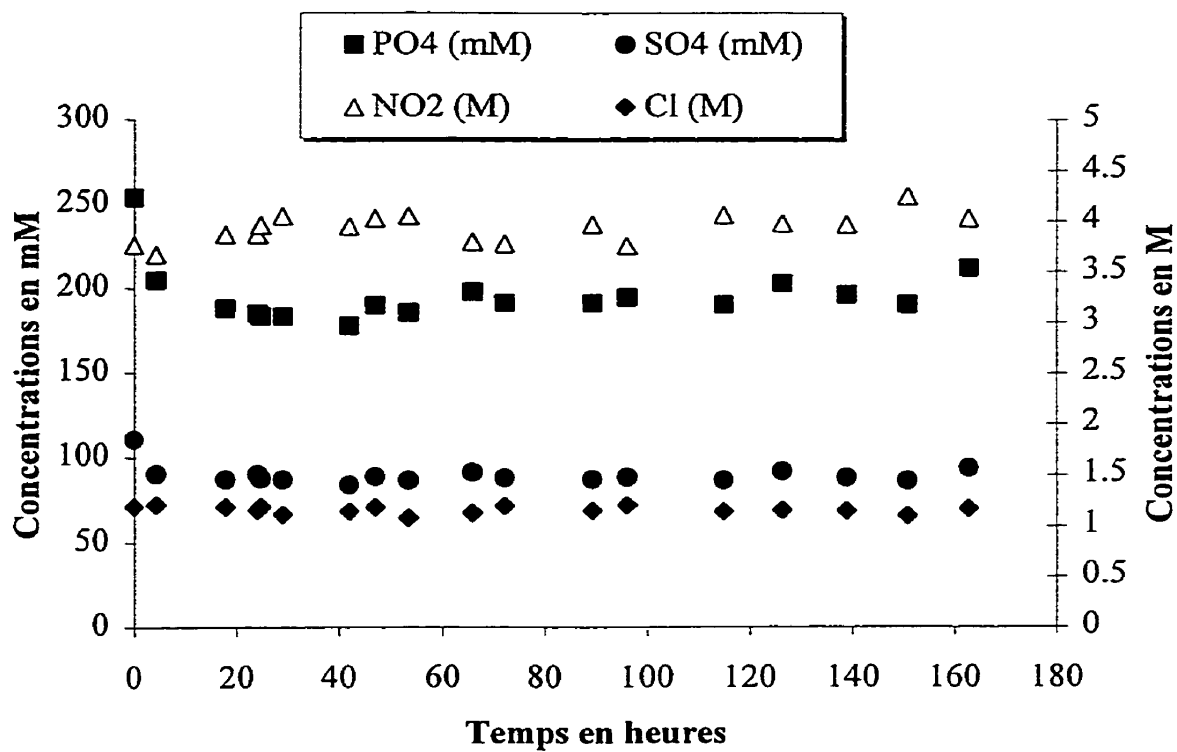


Figure A.VI.11 : Évolution de la concentration en anions pour F3.

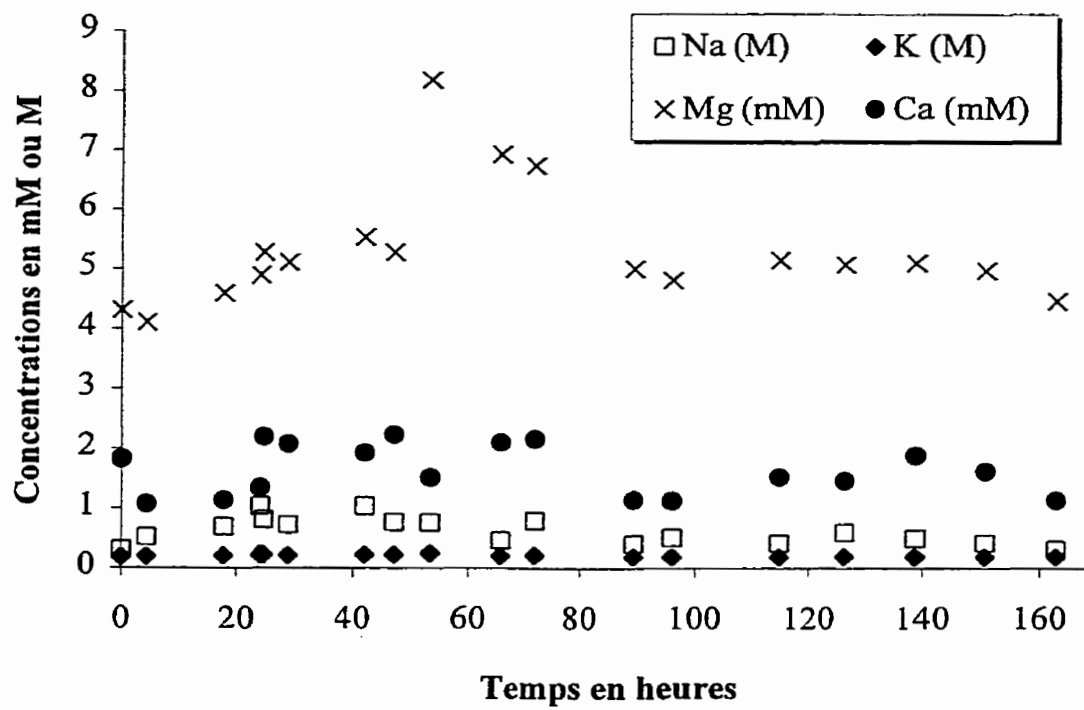


Figure A.VI.12 : Évolution de la concentration en cations pour F3.



## Annexe V : Étude de la distribution de fluorescence

### A5.1 Par microscopie

#### A5.1.1 Méthode

Pour une dilution fixée, compter dans 5 champs différents (environ 100 cellules par champ)

- Le nombre de cellules totales
- Le nombre de cellules fortement éclairées
- Le nombre de cellules moyennement ou faiblement éclairées

#### A5.1.2 Résultats

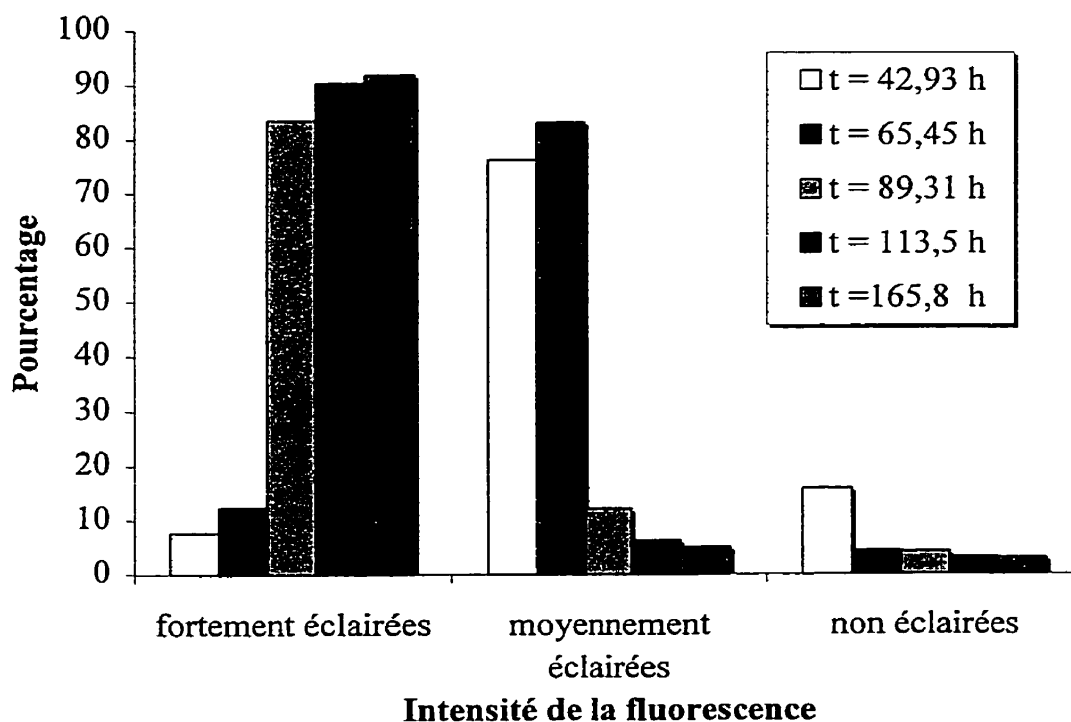


Figure A.VI.13 : Distribution de la fluorescence au cours de la fermentation 3 par observation microscopique.

## A5.2 Par cytofluorométrie

### A5.2.1 Méthode

On a utilisé pour cela un appareil qui mesure la fluorescence de chaque cellule. Les mesures ont été réalisées par Lucie Bourget (IRB) pour la fermentation 3. Les échantillons ont été dilués 1000 fois dans de l'eau saline.

### A5.2.2 Résultats

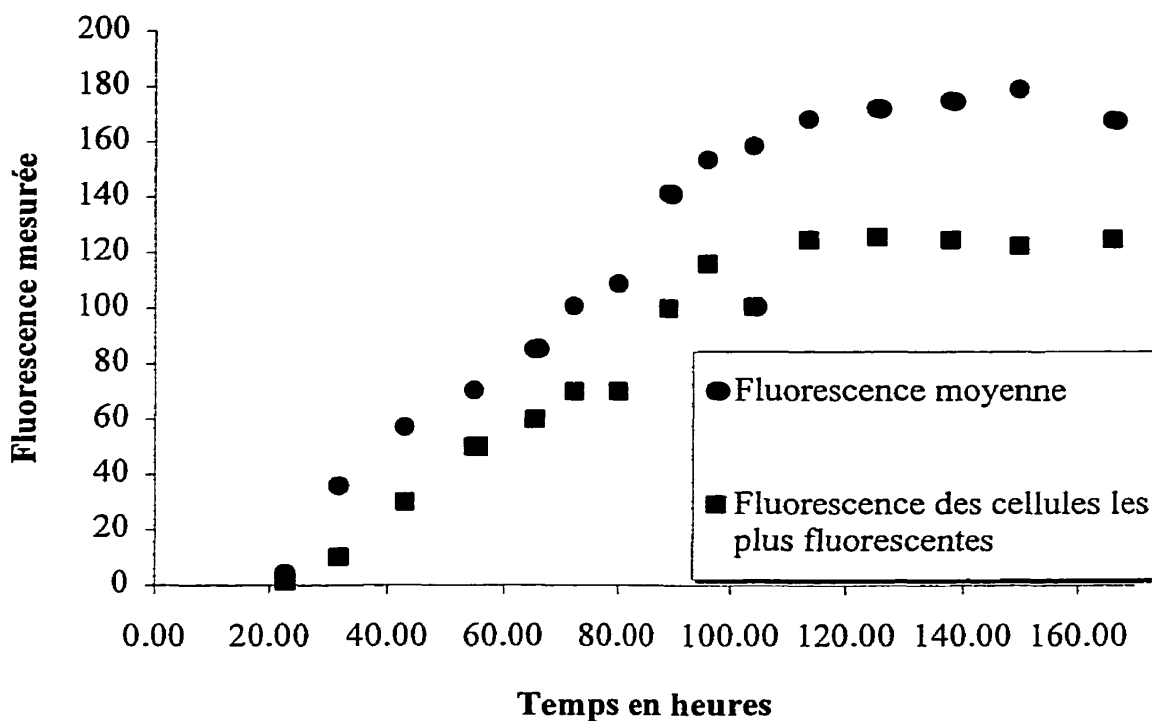


Figure A.VI.14 : Évolution de la fluorescence au cours du temps pour F3. Confirmation des résultats obtenus par fluorométrie.

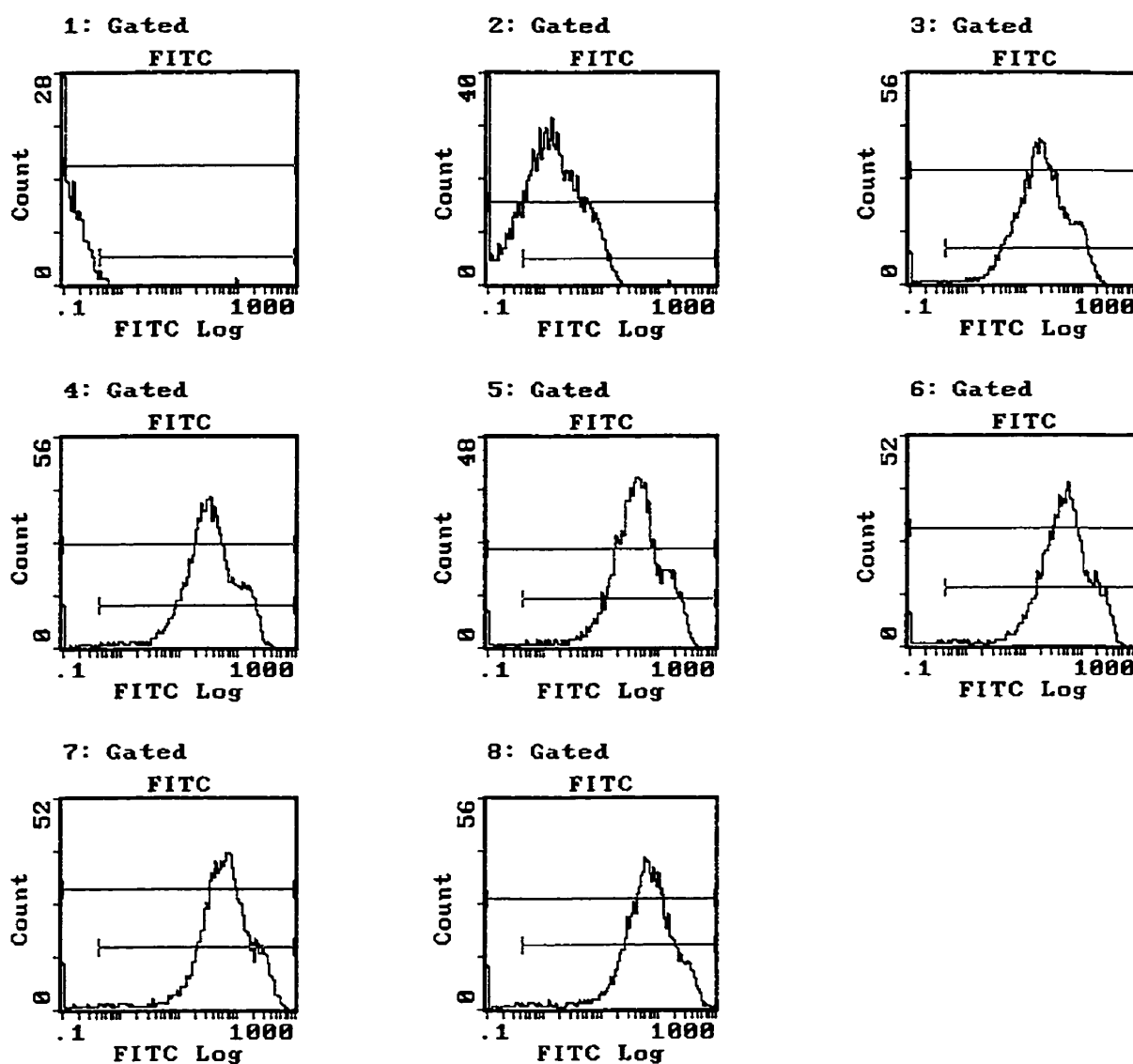


Figure A.VI.15 : Évolution au cours du temps de la distribution de fluorescence dans les cellules. Chaque graphique représente à un instant  $t$ , le nombre de cellules (en ordonnée) à une certaine fluorescence (en abscisse, échelle logarithmique). 1)  $t = 17,8$  h, 2)  $t = 22,7$  h, 3)  $t = 31,8$  h, 4)  $t = 42,9$  h, 5)  $t = 54,8$  h, 6)  $t = 65,5$  h, 7)  $t = 72,2$  h, 8)  $t = 80,1$  h.

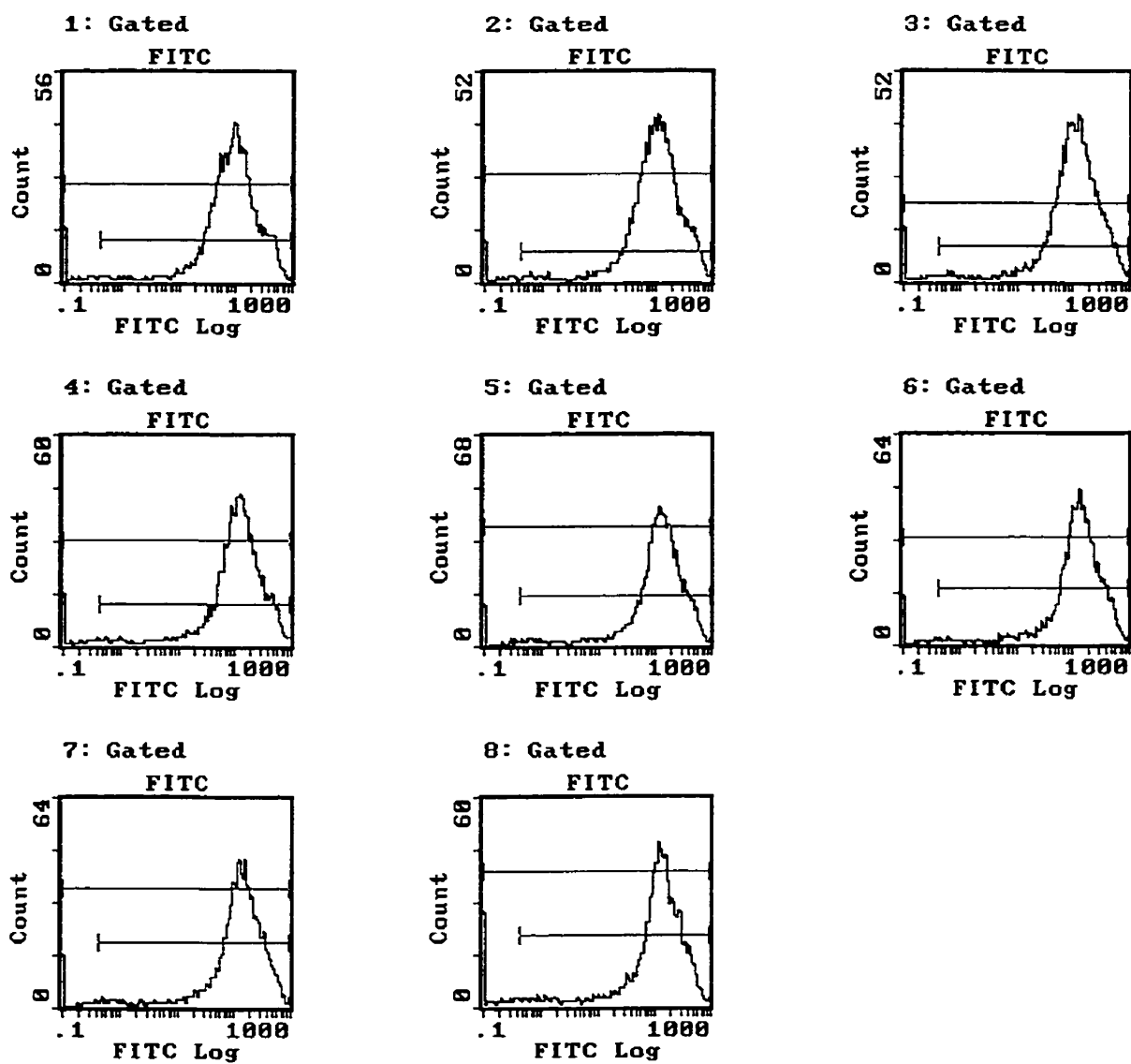


Figure A.VI.16 : suite de la figure précédente, 1)  $t = 89,3$  h, 2)  $t = 96$  h, 3)  $t = 104$  h, 4)  $t = 113,5$  h, 5)  $t = 125,4$  h, 6)  $t = 137,7$  h, 7)  $t = 150$  h, 8)  $t = 165,8$  h.

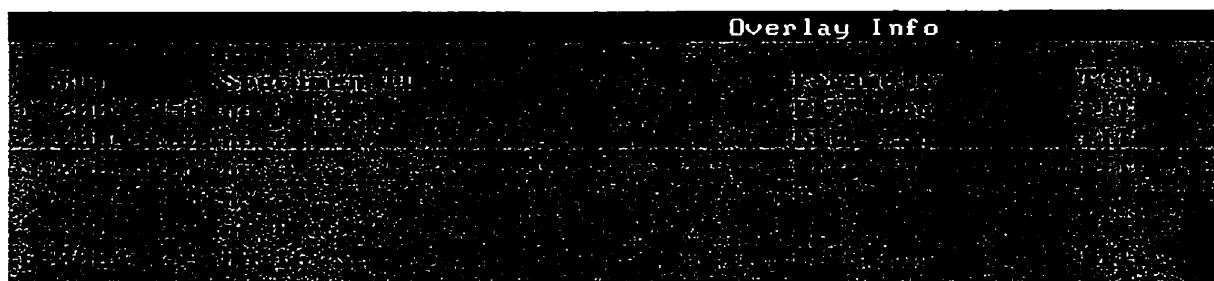
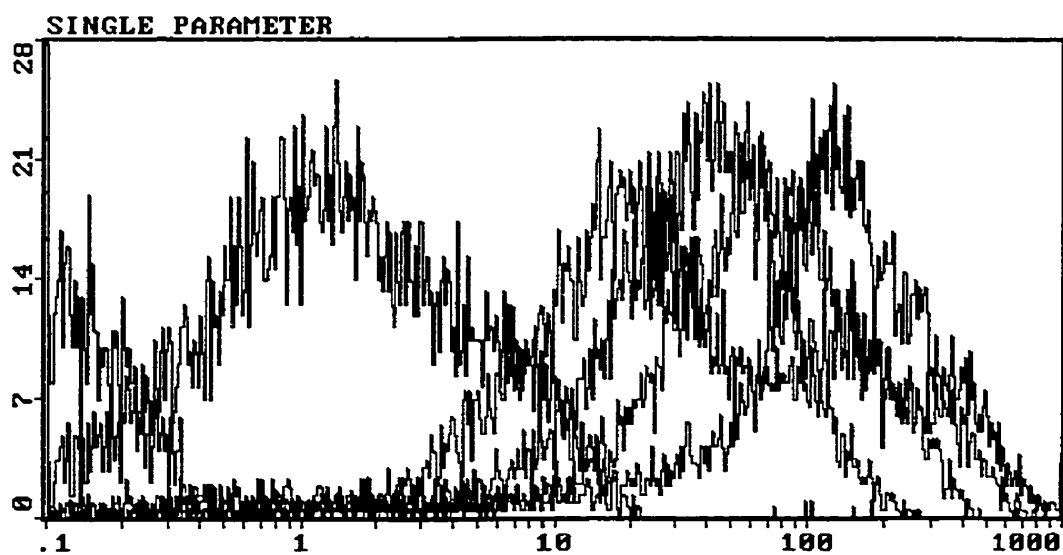


Figure A.VI.17 : Comparaison des échantillons 1)  $t = 17,8$  h, 2)  $t = 22,7$  h, 3)  $t = 31,8$  h,  
4)  $t = 54,8$  h, 5)  $t = 80,1$  h, 6)  $t = 165,8$  h.

## Annexe VI : Modélisation

### A6.1 Liste des points expérimentaux

Tableau A.2 : Fermentation 1.

Temps	X = GFP/GFPf	ln(1-X)
0	0.0139375	-0.014035539
5.75	0.165020833	-0.180348505
12.75	0.24640625	-0.282901849
24.25	0.34038125	-0.416093262
36.25	0.346916667	-0.426050542
48.75	0.526166667	-0.746899637
61.75	0.53403125	-0.763636707
72.75	0.7160625	-1.259001135
84.25	0.69740625	-1.195364132
96.75	0.818453125	-1.706241394
108.75	0.862375	-1.983222684
131.75	0.95225	-3.041776212
168.75	0.967390625	-3.423155455
174.75	0.970604167	-3.526902338

Tableau A.3 : Fermentation 2.

<b>Temps</b>	<b>X = GFP/GFPf</b>	<b>ln(1-X)</b>
0	0.004205128	-0.00421
16	0.169897436	-0.18621
28	0.372615385	-0.4662
40.15	0.437487179	-0.57534
48	0.490615385	-0.67455
64.5	0.607589744	-0.93545
73.25	0.61774359	-0.96166
89.3	0.664051282	-1.0908
99.3	0.865897436	-2.00915
112.5	0.814871795	-1.68671
144.75	0.888358974	-2.19247
168	0.967076923	-3.41358
186.75	0.950358974	-3.00294

Tableau A.4 : Fermentation 3.

<b>Temps</b>	<b>X = GFP/GFPf</b>	<b>ln(1-X)</b>
0.00	0.015172414	-0.015288693
8.67	0.278896552	-0.326972673
19.83	0.362965517	-0.450931492
31.73	0.412137931	-0.531262935
42.35	0.506344828	-0.705918037
49.12	0.564965517	-0.83232998
56.95	0.661655172	-1.083689704
66.22	0.81	-1.660731207
72.92	0.808413793	-1.652417405
80.88	0.870758621	-2.046073466
90.40	0.868344828	-2.027569105
102.25	0.920551724	-2.532649087
114.60	0.980137931	-3.918943448
126.67	0.933310345	-2.707705433
142.70	0.959931034	-3.217153172



## A6.2 Résultats statistiques

Les tableaux de résultats statistiques se composent de la façon suivante pour la détermination des paramètres a et b de l'équation suivante traitée :

$$y = ax + b \ln(1-x)$$

a	b	c = a/b
Se <sub>a</sub>	Se <sub>b</sub>	$Se_c = \frac{Se_a}{ a } + \frac{ a Se_b}{b^2}$
Ta = Se <sub>a</sub> /a	Tb = Se <sub>b</sub> /b	Tc (d <sub>f</sub> , 0.95)
R <sup>2</sup>	Se <sub>y</sub>	
F	d <sub>f</sub>	Fc (m, k, 0.95)
SSreg	SSresid	

- a et b sont les valeurs des paramètres.
- Se est la valeur d'erreur type correspondant aux paramètres.
- Se<sub>y</sub> est l'erreur type pour la valeur y estimée.
- R<sup>2</sup> est le coefficient de détermination. Il compare les valeurs y estimées aux valeurs y réelles et varie entre 0 et 1. Un coefficient de détermination égal à 1 indique une corrélation parfaite de l'échantillon (aucune différence entre les valeurs y estimées et réelles). A l'inverse, un coefficient de détermination égal à 0 indique que l'équation de régression ne peut servir à prévoir une valeur y.
- d<sub>f</sub> représente le nombre de degrés de liberté. Il aide à trouver les valeurs critiques de la statistique F dans une table statistique.
- Ssreg : la somme de régression des carrées.
- Ssresid : la somme résiduelle des carrés.
- T est la valeur de la statistique T pour chaque paramètre. En comparant cette valeur à la valeur critique de Tc qui dépend du nombre de degrés de liberté (d<sub>f</sub>) et du niveau

de confiance (0,95) ( $T_c$  est déterminé grâce à une table statistique), on peut déterminer si le paramètre est important ou non.

- $F$  est la statistique  $F$  ou la valeur  $F$  observée. On utilise ce paramètre pour déterminer si la relation observée entre les variables dépendantes et indépendantes est due au hasard ou non en comparant  $F$  observée à  $F$  critique ( $F_c$ ) qui dépend du nombre de valeurs de paramètres à déterminer ( $k$ ) et du nombre ( $m = n - k + 1$ ) où  $n$  est le nombre de points expérimentaux ( $F_c$  est déterminé grâce à une table statistique pour un niveau de confiance donné 0,95).

Tableau A.5 : Fermentation 1

-34.2278	47.5974455	-0.719109128
3.933495	10.6831816	0.244043948
-8.70161	4.45536239	$T_c(12) = 1.782$
0.980289	8.39075441	
298.403	12	$F_c(11,2) = 3.9823$
42017.99	844.857114	

Tableau A.6 : Fermentation 2

-39.387	50.92576	-0.773419283
6.885105	17.19636	0.396363215
0.007659	1.1374	$T_c(11) = 1.796$
0.957873	12.5114	
125.0573	11	$F_c(10,2) = 4.1028$
39151.74	1721.887	

Tableau A.7 : Fermentation 3

-23.9162	45.25518867	-0.528473803
5.375798	14.41541163	0.287126523
-4.44886	3.139361527	Tc(13)=1.771
0.929613	11.85645274	
85.84717	13	Fc(12,2)=3.8853
24136.01	1827.481132	

Tableau A.8 : Les 3 fermentations ensemble

-29.8485	51.82325	-0.575966609
4.77669	12.60751	0.232293294
-6.24878	4.110507	Tc(40)=1.684
0.894586	17.12962	
169.728	40	Fc(39,2)=3.3158
99604.49	11736.96	

## Annexe VII : Propriétés physiques du méthanol

Tableau A.9 : Propriétés physiques du méthanol.

<b>État physique</b>	liquide
<b>Odeur</b>	Légère odeur d'alcool
<b>Seuil de l'odeur</b>	2000 ppm, irritation à 1000 ppm, faible détectabilité
<b>Aspect</b>	Transparent, incolore
<b>Densité</b>	0,792 (H <sub>2</sub> O = 1)
<b>Point de congélation</b>	-97,8°C (-144 F)
<b>Point d'ébullition</b>	64,5°C (148 F)
<b>Tension de vapeur</b>	96 mm Hg a 20°C (68 F)
<b>Densité de vapeur (air=1)</b>	1,105 a 15°C (59 F)
<b>Taux d'évaporation (acétate de n-butyle = 1)</b>	2,1
<b>Matières volatiles (% vol.)</b>	100 %
<b>Solubilité aqueuse à 20°C</b>	Soluble
<b>Coefficient de répartition eau/huile</b>	Se dissout facilement dans l'eau, se sépare de l'huile.