

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU MÉTHANOL SUR LA PRODUCTION
EXTRACELLULAIRE DE LA GFP PAR *PICHIA PASTORIS***

Par
Catherine Desautels

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en
microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	François Shareck, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Claude Champagne, CRDA
Directeur de recherche	François Lépine, INRS-Institut Armand-Frappier
Co-directeur de recherche	Denis Groleau, CNRC-IRB

© droits réservés de Catherine Desautels, 2001

RÉSUMÉ

L'utilisation de micro-organismes pour la production de protéines recombinantes répond à un besoin actuel des industries du secteur des biotechnologies. Grâce à ses nombreux avantages, la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* est de plus en plus utilisée pour la production industrielle de protéines provenant d'organismes variés. Pour ce faire, le gène codant pour la protéine à produire est cloné sous le contrôle du promoteur fort de l'alcool oxydase (AOX1), induit par la présence du méthanol. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, la levure *P. pastoris* est utilisée comme hôte pour produire et sécréter la «GFP», «Green Fluorescent Protein» ou protéine fluorescente verte. La fluorescence de la GFP étant directement proportionnelle à sa concentration, celle-ci peut-être utilisée comme protéine modèle pour étudier l'effet de différents paramètres sur la production de protéines hétérologues.

Ce projet avait pour but d'étudier l'influence de la stratégie d'alimentation en méthanol sur la production et la sécrétion de la GFP par *Pichia pastoris*. En effet, l'utilisation du méthanol, alcool inflammable et explosif, est sujet d'inquiétudes pour la production de protéines recombinantes à grande échelle par *P. pastoris*.

Trois séries de fermentation en Erlenmeyers agités ont été effectuées comme première partie de ce travail de recherche. Dans un deuxième temps, des informations supplémentaires sur la culture ont pu être obtenues grâce à 8 fermentations en bioréacteur de 20 L équipé d'appareils d'analyse en continu. Dans tous les cas, le procédé utilisé pour produire la GFP par *Pichia pastoris* était séparé en deux étapes : d'abord une augmentation de la biomasse a été obtenue par la croissance des cellules sur un milieu riche à base de glycérol, puis la production de GFP a été induite par l'ajout de méthanol. Des stratégies d'ajout du méthanol variant en terme de fréquence et de quantité ont été essayées et comparées avec les résultats décrits dans la littérature scientifique.

Parmi les stratégies testées, il a été démontré qu'un ajout unique d'une concentration en méthanol de 1 % (v/v) au début de la phase d'induction permettait d'obtenir de meilleurs

résultats en terme de rendement (quantité de GFP sécrétée par quantité de méthanol ajouté) et de productivité (quantité de GFP sécrétée par volume de culture, par heure). Cette stratégie a l'avantage de diminuer le temps de production, la quantité totale de méthanol utilisée pour l'ensemble du procédé ainsi que les manipulations effectuées avec le méthanol par rapport aux autres stratégies testées. Nous croyons que ce nouveau protocole d'alimentation en méthanol permettra de minimiser les risques associés à l'utilisation de ce substrat pour produire des protéines recombinantes à grande échelle avec *Pichia pastoris*.

C. Desautels

Étudiante

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS ET REMARQUES PRÉALABLES

Je ne saurais être brève dans mes remerciements tant ce travail est dû en grande partie aux gens qui m'ont si bien entourée pendant ces 18 mois.

✧ *En premier lieu...*

Je commencerai évidemment par remercier mes directeurs pour m'avoir suivie, conseillée, épaulée et surtout corrigée tout au long de la maîtrise. Une petite note particulière pour la gentillesse, la générosité et la bonne humeur du Dr Groleau ainsi que pour l'efficacité et la franchise que j'ai appréciée chez le Dr Lépine.

Plusieurs idées sont nées de discussions enrichissantes avec le Dr Anke Kayser dont les nombreux conseils et corrections m'ont aidé à comprendre le présent et à planifier l'avenir.

Étant en France pour poursuivre mes études, j'ai dû confier l'impression de ce mémoire à Caroline Sotomey qui, avec l'aide de Wayne Levadoux et du Dr Denis Groleau, a eu la gentillesse de m'épargner un aller-retour Toulouse-Montréal.

Je n'aurais jamais pu deviner tous les caprices d'un fermenteur et de ses sondes sans Manon Beauchemin qui m'a appris dans la bonne humeur à fonctionner dans l'usine pilote.

Merci surtout à mes parents qui ont toujours cru en moi et m'ont transmis le plus beau des héritages : le goût d'apprendre et les moyens pour le faire.

✧ *Aux gens de l'usine pilote, CNRC-IRB :*

Merci à Mario qui n'a jamais lésiné sur le temps afin de m'expliquer le fonctionnement des systèmes de contrôle, le RQ et les mystérieuses équations, et sans qui mes données de fermentation ne se seraient jamais rendues sous format Excel ; à

Michelle et à Pat pour m'avoir facilité la vie à bien des occasions ; à Nathalie et à Michel sans qui un fermenteur ne fonctionnerait que rarement et finalement à Dany pour son sourire et ses conseils.

✧ *Aux gens du labo de recherche :*

Merci à l'artiste Denis Bourque pour ses oeuvres, à Louise pour ses explications en «bio mol», à Martin qui connaît toujours les petits détails que tout le monde oublie, à Jean-François qui a heureusement déjà travaillé avec l'appareil dont on a besoin et à Michael pour les analyses au HPLC. Même si je n'ai pas eu l'occasion de travailler avec les autres du groupe, j'ai apprécié la bonne ambiance de tous les jours dans le labo et les réunions si enrichissantes du Micro-club qui me manqueront beaucoup!.

✧ *Et enfin aux autres...*

Un merci tout particulier à Jacques pour ses encouragements, ses précieux conseils et sa présence dans les bons comme les mauvais moments, à ma bande de filles qui, heureusement, savent me faire oublier le labo ainsi qu'à Adeline et Caroline pour leur présence et leurs encouragements permanents.

Je tiens finalement à remercier la compagnie Lallemand Inc. pour son financement pendant la session d'automne 1999, ainsi que pour m'avoir permis de continuer à travailler à temps partiel au laboratoire R&D durant mes études. L'expérience que j'ai acquise lors de mon travail pour la compagnie m'a grandement aidée dans la poursuite de mon projet de maîtrise.

Remarques préalables :

✧ Les mots fermenteur et bioréacteur sont utilisés pour décrire le même appareil.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	III
Remerciements et remarques préalables.....	V
Liste des tableaux.....	X
Liste des figures.....	XII
Liste des fournisseurs.....	XV
Liste des sigles et abréviations.....	XVIII
Introduction.....	1
Chapitre 1-Revue de littérature.....	5
1.1 Le système d'expression <i>Pichia pastoris</i>	5
1.1.1 Les systèmes d'expression; 1.1.2 Historique de l'utilisation de <i>Pichia pastoris</i> ; 1.1.3 Caractéristiques générales; 1.1.4 Voie métabolique du méthanol; 1.1.5 Sécrétion; 1.1.6 Protéines produites par <i>Pichia pastoris</i>	
1.2 La protéine fluorescente verte.....	15
1.2.1 Historique; 1.2.2 Caractéristiques de la protéine; 1.2.3 Applications	
1.3 La culture.....	19
1.3.1 Paramètres pour la culture des micro-organismes; 1.3.2 Systèmes de fermentation	
1.4 Le méthanol : source de carbone et inducteur.....	29
1.4.1 Dangers liés à l'utilisation du méthanol; 1.4.2 Mesure du méthanol; 1.4.3 Stratégies d'alimentation en méthanol	
Chapitre 2-Matériel et méthodes.....	35
2.1 Souches utilisées.....	35
2.2 Milieux de culture.....	36
2.3 Évaluation de la toxicité du méthanol.....	37
2.4 Déroulement des cultures en Erlenmeyers agités.....	38
2.5 Déroulement des cultures en bioréacteur.....	40
2.6 Échantillonnage.....	43

2.6.1 Évaluation de la biomasse; 2.6.2 Concentration en glycérol; 2.6.3 Concentration en méthanol; 2.6.4 pH du milieu de culture; 2.6.5 Observations microscopiques; 2.6.6 Mesures de la fluorescence	
2.7 Gel d'électrophorèse.....	46
2.8 Courbe standard de la GFP.....	47
Chapitre 3-Résultats.....	49
3.1 Toxicité du méthanol.....	49
3.2 Fermentations en Erlenmeyers.....	51
3.2.1 Comportement de la culture; 3.2.2 Production de GFP extracellulaire; 3.2.3 Influence du méthanol; 3.2.4 Influence du glycérol	
3.3 Fermentations en bioréacteur.....	68
3.3.1 Caractéristiques communes des huit fermentations; 3.3.2 Comparaison entre différentes stratégies d'alimentation en méthanol	
Chapitre 4-Discussion.....	85
4.1 Toxicité du méthanol.....	85
4.2 Fermentations en Erlenmeyers.....	86
4.2.1 Comportement de la culture; 4.2.2 Influence du méthanol; 4.2.3 Influence du glycérol;	
4.3 Fermentations en bioréacteur.....	90
4.3.1 Cinétique de croissance; 4.3.2 Comparaison Erlenmeyers et bioréacteur; 4.3.3 Comparaison entre les stratégies d'alimentation en méthanol; 4.3.4 Efficacité de sécrétion; 4.3.5 Choix d'une stratégie d'induction	
Conclusion.....	103
Appendice A-Liste des protocoles du CNRC utilisés.....	105
Appendice B-Feuilles de suivi.....	106
Appendice C-Paramètres du système de contrôle du méthanol.....	110
Appendice D-Reproductibilité des résultats.....	111
Appendice E-Mesure de la densité optique.....	112
Appendice F-Évaporation du méthanol.....	113

Appendice G-Évolution de la concentration en méthanol pour les fermentations en bioréacteur.....	114
Appendice H- Gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Fermentation F8).....	123
Liste des références.....	125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Comparaison de systèmes d'expression pour la production de protéines hétérologues.....	6
Tableau 1.2 Avantages et désavantages de l'utilisation de <i>Pichia pastoris</i> pour la production de protéines hétérologues.....	8
Tableau 1.3 Production de protéines par <i>Pichia pastoris</i> à ce jour.....	15
Tableau 1.4 Les macronutriments.....	21
Tableau 1.5 Critères pour la conception d'un bioréacteur	26
Tableau 1.6 Description des appareils de mesure utilisés en fermentation.	27
Tableau 1.7 Propriétés physiques et toxicologiques du méthanol.....	30
Tableau 1.8 Stratégies suggérées par Invitrogen pour l'ajout de méthanol.....	31
Tableau 2.1 Paramètres utilisés pour chaque fermentation en Erlenmeyer.....	39
Tableau 2.2 Stratégies d'induction pour chaque fermentation en bioréacteur de 20 L.....	40
Tableau 3.1 Quantités de GFP et rendements obtenus pour les cultures en Erlenmeyers lors des séries d'expériences E1 et E3.....	62
Tableau 3.2 Quantités de GFP extracellulaire et rendements obtenus pour les cultures en Erlenmeyers lors de la série d'expériences E2.....	64
Tableau 3.3 Quantités de GFP extracellulaire et rendements obtenus lors des cultures en Erlenmeyers et en bioréacteur.....	74
Tableau 3.4 Mesure de la fluorescence totale (FT), de la fluorescence extracellulaire (FE) et de la fluorescence intracellulaire (FI) lors de la première fermentation en bioréacteur (F1)	75
Tableau 3.5 Résumé des résultats obtenus pour les fermentations F1 à F8.....	83
Tableau A.1 Feuille de suivi des fermentations en Erlenmeyers.....	107
Tableau A.2 Données en continu	108

Tableau A.3 Analyse des échantillons.....109

Tableau A.4 Paramètres de la stratégie et du système de contrôle du méthanol..... 110

Tableau A.5 Mesure de DO à 600 nm pour plusieurs dilutions d'un échantillon de la fermentation F7.....112

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	<i>Pichia pastoris</i>	9
Figure 1.2	Voie métabolique du méthanol.....	10
Figure 1.3	Étapes de la sécrétion de protéines chez les levures.....	13
Figure 1.4	La protéine fluorescente verte (GFP).....	16
Figure 1.5	Utilisation des sources d'énergie par les micro-organismes.....	20
Figure 1.6	Stades de croissance en cuvée.....	25
Figure 1.7	Fermenteur.....	26
Figure 3.1	Croissance cellulaire (DO) de la souche C-20 en tubes de milieu BMMY contenant diverses concentrations en méthanol après 24 h et 48 h d'incubation.....	50
Figure 3.2	Évolution de la biomasse (DO) pour les souches C-20 et KM71 lors de la série d'expériences E1.....	52
Figure 3.3	Évolution du pH du milieu de culture pour les souches C-20 et KM71 lors de la période d'induction de la série d'expériences E1.....	54
Figure 3.4	Évolution de la concentration extracellulaire de GFP pour les souches KM71 et C-20 lors des séries d'expériences E1 et E3.	56
Figure 3.5	Reproduction d'un gel d'électrophorèse du surnageant de culture de la souche C-20 lors de la série d'expériences E1.....	58
Figure 3.6	Évolution de la concentration en méthanol des Erlenmeyers de la série d'expériences E1.....	60
Figure 3.7	Évolution de la concentration en méthanol des Erlenmeyers de la série d'expériences E3.....	61
Figure 3.8	Évolution de la concentration spécifique de GFP extracellulaire lors des expériences de la série E2 pendant la phase d'induction.....	65
Figure 3.9	Évolution de la biomasse (DO) lors de la série d'expériences E2.....	66
Figure 3.10	Évolution de la concentration en méthanol lors de la série d'expériences E2 pendant la phase d'induction.....	67

Figure 3.11	Évolution de la concentration en glycérol (g.L^{-1}), de la biomasse (DO), de la concentration en méthanol (% v/v), de l'oxygène dissout (%) et de la fluorescence extracellulaire (U) et intracellulaire (U) pour la fermentation F3.....	70
Figure 3.12	Évolution des gaz de sortie et du quotient respiratoire pour la fermentation F3.....	72
Figure 3.13	Pic d'oxygène dissout indiquant l'épuisement en glycérol à la fin de la phase de croissance	73
Figure 3.14	Évolution de la concentration en GFP extracellulaire pour les 8 fermentations en bioréacteur de 20 L.....	77
Figure 3.15	Quantité maximale de GFP extracellulaire (g) obtenue, quantité de méthanol ajoutée (g) et temps requis pour l'obtention de la quantité maximale de GFP extracellulaire (h) selon la stratégie d'alimentation en méthanol employée.....	79
Figure 3.16	Rendement de GFP extracellulaire sur méthanol, productivité volumétrique et quantité maximale de GFP (g) extracellulaire obtenue selon la stratégie d'alimentation en méthanol employée.....	80
Figure 3.17	Efficacité moyenne de sécrétion (%) pour les fermentations F1 à F8 et quantité totale de méthanol ajoutée (g)	82
Figure A.1	Reproductibilité de la mesure de la densité optique, de la fluorescence du surnageant et de la concentration en méthanol pour 5 essais différents.....	111
Figure A.2	Exemple de calcul de densité optique.....	112
Figure A.3	Évaporation du méthanol en Erlenmeyers et en bioréacteur de 20 L...	113
Figure A.4	Évolution de la concentration en méthanol mesurée au GC lors de la fermentation F1.....	115
Figure A.5	Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F2.....	116
Figure A.6	Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro et par GC lors de la fermentation F3.....	117
Figure A.7	Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F4.....	118

Figure A.8	Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F5.....	119
Figure A.9	Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F6.....	120
Figure A.10	Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F7.....	121
Figure A.11	Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F8.....	122
Figure A.12	Reproduction d'un gel d'électrophorèse du surnageant de culture de la souche C-20 lors de la fermentation F8.....	123

LISTE DES FOURNISSEURS

Appareils utilisés :

- Analyseur de gaz Servomex modèle 1400 : Servomex (Crowborough, England)
- Balance de poids secs Sartorius modèle MA 30 : VWR Scientific (Mont-Royal, QC)
- Bioréacteur de 20 L, cuve en acier inoxydable de type S : Chemap (Volkestwill, Suisse)
- Centrifugeuse, modèle J6-MI, rotor JS-4 : Beckman (Palo Alto, CA)
- Chromatographe capillaire en phase gazeuse, modèle Sigma 2000 : Perkin Elmer (Norwalk, CO)
- Colonne du GC, modèle HayeSep Q («80/100 O.D.») de Supelco (Oakville, ON)
- Colonne du HPLC, modèle ICsep no. 11715033 de Transgenomic Inc. : Transition Technology Inc. (Toronto, ON)
- Fluoromètre, modèle Cytofluor 2300 : Millipore (Marlborough, MA)
- HPLC modèle Millennium³², Logiciel «Chromatography Manager», version 3.05 : Waters (Mississauga, ON)
- Incubateur à table agitante modèle 4300 : New Brunswick Scientific (Fairlawn, NJ)
- Kit d'électrophorèse : Bio-Rad (Hercules, CA)
- Microscope à fluorescence modèle Leitz Orthoplan : Leica (Wetzlar, Allemagne)
- Microscope modèle Axioskop : Zeiss (Oberkochen, Allemagne)
- pH-mètre modèle Accumet 815MP : Fisher (Fairlawn, NJ)
- Pompes modèles 74 4302 et 75 2025, tête 7015-20 : Masterflex (Chicago, IL)
- Sonde à méthanol, senseur SnO₂, modèle TGS 822 : Figaro Engineering (Wilmette, IL)
- Sonde d'oxygène dissout modèle 465 : Ingold (Willmington, MA).
- Sonde de pH à gel, modèle InPro 3000/225 : Ingold
- Spectrophotomètre modèle DU 640 : Beckman
- Système de contrôle et d'acquisition de données «PCP» ou «Process Control Partner» VIRGO, version 2.5 : Altersys (Longueuil, QC)

Matériel utilisé :

- 2-mercaptoéthanol : Sigma Aldrich (Oakville, ON)
- Acide acétique glacial : BDH (Toronto, ON)
- Acide phosphorique 16 M : Fisher
- Acide sulfurique 0.0085 N : Anachemia (Montréal, QC)
- Alcool éthylique 95 % : Commercial Alcohols (Brompton, ON)
- Anti-mousse Mazu 204 : PPG Canada (Mississauga, ON)
- Azote : Praxair (Mississauga, ON)
- Bacto-peptone : Difco (Détroit, MI)
- Biotine : Sigma (Saint-Louis, MO)
- Bleu de Commassie R-250 : Bio Rad
- Bromophénol : BDH
- Chlorure de sodium : ACP (Montréal, QC)
- Di-hydrogène-orthophosphate de potassium (KH_2PO_4) : BDH
- Dodécylsulfate de sodium (SDS) : Bio-Rad
- Eau MilliQ : CNRC-IRB
- Extrait de levure : Gibco BRL (Paisey, Écosse)
- Filtre 0.45 μm : Millipore
- Gaz carbonique : Praxair
- Gel SDS-PAGE : Bio-Rad
- Glycérol : BDH
- Glycine : Bio-Rad
- Hélium : Praxair
- Hydrogène : Praxair
- Hydroxyde d'ammonium 2 M : Anachemia
- Hydrogène-orthophosphate de di-potassium (K_2HPO_4) : BDH
- Méthanol : EM Science (Gibbstown, NJ)
- Microplaques de 96 puits Costar : Fisher
- Oxygène : Praxair
- Standard de protéines de faible poids moléculaire : Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC)

- Tris Base : Gibco BRL
- Tris HCl : Bio-Rad
- Tubes de 50 mL : Starstedt (Nümbrock, Allemagne)
- Unités filtrantes, membrane en Nylon de 0.2 μm (pour filtrer le NH_4OH) : Corning (Corning, NY)
- Unités filtrantes, membrane «GP express» de 0.2 μm : Millipore
- YNB sans acides aminés ou «Yeast Nitrogen Base» : Difco

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ARN :	Acide Ribonucléique
ATP :	Adénosine triphosphate
AOX :	Alcool oxydase
AOX1 :	Gène de l'enzyme AOX1 contrôlé par le promoteur 1
AOX2 :	Gène de l'enzyme AOX2 contrôlé par le promoteur 2
ARG 4 :	Un gène permettant la synthèse de l'arginosuccinate lyase
ARG ± :	Phénotype de la souche capable de synthétiser l'arginine (+) ou non (-)
BMGY :	«Buffered Glycerol-Complex Medium» (milieu complexe à base de glycérol)
BMMY :	«Buffered Methanol-Complex Medium» (milieu complexe à base de méthanol)
C-20 :	Souche de <i>Pichia pastoris</i> de phénotype Mut ^s , Arg ⁺ , His ⁻ qui possède le gène de la GFP et le signal de sécrétion α de <i>S. cerevisiae</i>
cGMP	«current Good Manufacturing Practices», Bonnes pratiques de fabrication
DHAS :	«Dihydroxyacetone Synthase» (Synthétase dihydroxyacétone)
DO :	Densité Optique
e1 :	Erlenmeyer numéro 1 d'une série d'expériences
e2 :	Erlenmeyer numéro 2 d'une série d'expériences
e3 :	Erlenmeyer numéro 3 d'une série d'expériences
e4 :	Erlenmeyer numéro 4 d'une série d'expériences
e5 :	Erlenmeyer numéro 5 d'une série d'expériences
E1 :	Première série d'expériences en Erlenmeyers
E2 :	Deuxième série d'expériences en Erlenmeyers
E3 :	Troisième série d'expériences en Erlenmeyers
F1 :	Première fermentation en bioréacteur
F2 :	Deuxième fermentation en bioréacteur
F3 :	Troisième fermentation en bioréacteur
F4 :	Quatrième fermentation en bioréacteur
F5 :	Cinquième fermentation en bioréacteur

F6 :	Sixième fermentation en bioréacteur
F7 :	Septième fermentation en bioréacteur
F8 :	Huitième fermentation en bioréacteur
GC :	«Gas Chromatography» (Chromatographie en phase gazeuse)
GFP :	«Green Fluorescent Protein» (Protéine fluorescente verte)
His + :	Gène permettant la synthèse de l'histidine
HPLC :	«High Pressure Liquid Chromatography» (Chromatographie en phase liquide à haute pression)
GS115 :	Souche de <i>Pichia pastoris</i> de phénotype Mut ⁺ d'Invitrogen
IRB :	Institut de recherche en biotechnologie de Montréal (CNRC)
kDa :	Kilodalton
KM71 :	Souche de <i>Pichia pastoris</i> de phénotype Mut ^S d'Invitrogen
LMW :	«Low Molecular Weight» (Marqueur de protéines de faible poids moléculaire)
Lpm	Litres par minute
M :	Molaire
MD+H :	Milieu minimal à base de dextrose + histidine (Invitrogen)
MeOH :	Méthanol
MM+H :	Milieu minimal à base de méthanol + histidine (Invitrogen)
μ :	Taux de croissance (h ⁻¹)
Mut ⁺ :	«Methanol utilization positive» (utilisation positive du méthanol)
Mut ^S :	«Methanol utilization slow» (utilisation lente du méthanol)
Mut ⁻ :	«Methanol utilization negative» (utilisation négative du méthanol)
N :	Normalité
O ₂ :	Oxygène
PCP :	«Process Control Partner», logiciel de contrôle et d'acquisition de données
POU :	Protéines d'Origine Unicellulaire
P p/t :	Productivité volumétrique (concentration de GFP produite (mg.L ⁻¹) par heure)
pAOX :	promoteur de l'alcool oxydase

pAOX1 :	promoteur «1» de l'enzyme AOX1
pAOX2 :	promoteur «2» de l'enzyme AOX2
RB :	«Running Buffer» (tampon de migration)
RE :	Réticulum endoplasmique
RPM	Rotations par minute
rsGFP :	«red-shifted GFP» (mutant de la GFP)
SB :	«Sample Buffer» (tampon pour les échantillons)
SDS-PAGE :	«Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis»
td :	Temps de dédoublement (h)
tpm :	tour par minute
U	Unités arbitraires
v/v :	volume par volume
v/v/min :	volume par volume de culture par minute
Y p/s :	Rendement du produit (GFP, en mg) sur le substrat ajouté (méthanol, en g)
YNB :	«Yeast Nitrogen Base» (base azotée pour les levures)

INTRODUCTION

La recherche en biotechnologie au cours de cette dernière décennie a donné accès à une multitude de gènes dont les fonctions demeurent souvent obscures. Afin d'obtenir plus d'information sur la fonction de ces gènes, il devient intéressant de produire les protéines codées par ceux-ci dans des systèmes simples à contrôler tels les micro-organismes. En plus d'être un outil prometteur pour l'avancement de la recherche fondamentale, la production de protéines recombinantes permet l'identification de composés d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique (vaccins, anticorps et hormones), pour l'industrie agro-alimentaire (enzymes) ainsi que pour l'industrie forestière (insecticides biologiques). L'identification d'un besoin pour des protéines recombinantes à des fins industrielles et de recherche a amené le groupe de technologie microbienne et enzymatique du Secteur des Bioprocédés (CNRC-IRB) à développer une expertise dans ce domaine.

Dans cette optique, l'équipe de l'Usine Pilote du Secteur des Bioprocédés a produit des protéines hétérologues dans différents micro-organismes tels *Escherichia coli*, *Flavobacterium heparinum*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces pombe*. L'augmentation des projets à l'échelle mondiale employant la levure *Pichia pastoris* et les nombreux avantages de l'utilisation de *P. pastoris* pour la production de protéines hétérologues ont incité le groupe à concentrer une partie de ses recherches sur l'utilisation de cette levure. En effet, ce système d'expression est doté d'un promoteur fort et bien contrôlé induit par le méthanol, source de carbone peu dispendieuse (Higgins et Cregg, 1998).

La production de protéines recombinantes à l'échelle industrielle est difficile à optimiser puisque les techniques permettant de quantifier la protéine recombinante d'intérêt sont souvent longues et fastidieuses. Pour cette raison, le groupe de technologie microbienne et enzymatique a cloné le gène rapporteur de la GFP dans la levure *Pichia pastoris*. La GFP, originaire de la méduse *Aequorea victoria*, produit une fluorescence verte proportionnelle à sa concentration sans nécessiter de co-facteur. Des clones de la levure *Pichia pastoris* ont été sélectionnés pour une

production maximale de GFP intracellulaire et extracellulaire (Jetté *et al.*, 1999). En plus d'accroître ses connaissances en génétique moléculaire, la construction de cette souche a permis au groupe de se munir d'un outil de diagnostic de la quantité de GFP produite en fermentation par *Pichia pastoris*. La GFP a déjà été utilisée avec succès comme protéine modèle chez la bactérie *E. coli* (Albano *et al.*, 1998). Éventuellement, la GFP pourrait être fusionnée à une autre protéine d'intérêt et utilisée comme rapporteur de la quantité de cette autre protéine dans la culture de *Pichia pastoris*.

Un problème demeure cependant pour la production de protéines hétérologues par *Pichia pastoris* à grande échelle : l'utilisation de grandes quantités de méthanol pour l'induction présente un risque d'explosion et d'inflammabilité. Afin d'évaluer les moyens concrètement réalisables pour diminuer ce risque, sans pour autant compromettre la productivité du système, il fut suggéré d'étudier d'autres stratégies d'induction pour produire des protéines recombinantes chez *Pichia pastoris*. L'objectif principal de ce projet de maîtrise était donc d'étudier l'effet de la stratégie d'induction (alimentation en méthanol) sur la production de GFP, utilisée comme protéine modèle. Nous avons émis l'hypothèse que la stratégie d'induction avait une influence sur la production de GFP, et que cette étude permettrait de suggérer une nouvelle stratégie d'induction plus sécuritaire quant à l'utilisation du méthanol.

Afin de vérifier cette hypothèse, les travaux furent effectués sur trois volets : dans un premier temps, une brève étude de la toxicité du méthanol sur la souche de *P. pastoris* C-20 fut effectuée, deuxièmement, la production de GFP et l'influence de plusieurs stratégies d'induction furent étudiées en Erlenmeyers et finalement huit productions de GFP en bioréacteur de 20 L furent effectuées et analysées selon l'effet de la stratégie d'alimentation en méthanol utilisée.

En première partie de ce mémoire, un résumé de la littérature scientifique à ce jour sur la levure *Pichia pastoris*, la GFP, la culture ainsi que l'utilisation du méthanol comme substrat et inducteur est présenté. Le Chapitre 2 explique le matériel et les méthodes

utilisés pour effectuer ce projet alors que les principaux résultats obtenus sont décrits au Chapitre 3. Enfin, les résultats des travaux de recherche sont discutés au Chapitre 4.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le système d'expression *Pichia pastoris*

1.1.1 Les systèmes d'expression

L'utilisation de systèmes d'expression pour la production de protéines hétérologues a connu une effervescence depuis le milieu des années 80 (Fernandez et Hoeffler, 1999). Les causes principales de cet intérêt sont la synthèse de produits thérapeutiques et l'élaboration d'outils pour la recherche fondamentale (Cereghino et Cregg, 1999). Plusieurs systèmes ont été développés incluant les virus cultivés en cellules de mammifères, les procaryotes (bactéries), les eucaryotes inférieurs (levures, champignons), et les eucaryotes supérieurs (insectes, animaux transgéniques). Le Tableau 1.1 résume quelques caractéristiques de ces systèmes (Biopharm, 1999, Fernandez et Hoeffler, 1999).

Tableau 1.1 : Comparaison de systèmes d'expression pour la production de protéines hétérologues

Caractéristiques recherchées	Systèmes d'expression			
	Bactéries	Levures	Insectes	Cellules de mammifères
Croissance cellulaire	Rapide	Rapide	Lente	Lente
Complexité du milieu de croissance	Minimale	Minimale	Élevée	Élevée
Coût du milieu de croissance	Faible	Faible	Élevé	Élevé
Manipulations génétiques	Bien Connues	Bien Connues	Moins connues	Moins connues
Niveau d'expression	Élevé	Faible à élevé	Faible à élevé	Faible à moyen
Expression extracellulaire	Sécrétion dans le périplasme	Sécrétion dans le milieu	Sécrétion dans le milieu	Sécrétion dans le milieu
Modifications post-traductionnelles	Non	Oui	Oui	Oui
Repliement post-fermentation	Souvent requis	Parfois requis	Non nécessaire	Non nécessaire
Glycosylation extrémité N-terminale	Non	Souvent élevée en mannose	Simple	Complexe
Glycosylation extrémité O-terminale	Non	Oui	Oui	Oui

1.1.2 Historique de l'utilisation de *Pichia pastoris*

Pour obtenir un produit à un coût économiquement rentable, le système choisi doit permettre une production simple et rapide à l'aide de matières premières bon marché. De plus, la protéine produite doit posséder les caractéristiques désirées (repliement, glycosylation). La levure *Pichia pastoris* allie les caractéristiques économiques des systèmes d'expression procaryotes (manipulation simple, croissance rapide et à haute densité cellulaire, milieux bon marché) aux caractéristiques qualitatives des systèmes d'expression d'eucaryotes supérieurs (modifications post-traductionnelles, glycosylation acceptable) (Romanos, 1995, Cregg et Higgins, 1995).

L'utilisation du méthanol comme seule source de carbone par certaines espèces de levures fut observée il y a 30 ans par Koichi et Ogata (Cereghino et Cregg, 2000, Cregg et Higgins, 1995). Ces organismes furent aussitôt exploités pour la production de protéines d'origine unicellulaire (POU) pour l'alimentation animale par la compagnie Phillips Petroleum (Wegner, 1990, Cereghino et Cregg, 2000, Faber *et al.*, 1995). La crise du pétrole des années 70 affectant la rentabilité de ce système, Phillips Petroleum a par la suite établi des accords avec l'Institut Salk de biotechnologie et des associés industriels (SIBIA) (La Jolla, Ca) pour la production de protéines hétérologues (Cereghino et Cregg, 2000). La combinaison des méthodes de fermentation déjà développées pour la production de POU et la présence d'un promoteur fortement induit et contrôlé, celui de l'alcool oxydase, a permis la production de grandes quantités de protéines hétérologues par la levure *Pichia pastoris*. En 1993, Phillips Petroleum a vendu son brevet pour la production de protéines hétérologues à la «Research Corporation Technologies» (RCP) (Tucson, AZ), et les droits de distribution des composantes du système à Invitrogen (Carlsbad, CA) (Cereghino et Cregg, 2000). Une licence de la RCP est nécessaire pour l'utilisation commerciale. Toutefois, le système est distribué à faible coût par Invitrogen pour la recherche académique (Higgins et Cregg, 1998). Les recherches sur ce système ont connu une impressionnante recrudescence grâce aux nombreux

avantages de *Pichia pastoris*. Ceux-ci, ainsi que les désavantages de l'utilisation de cette levure, sont exposés au Tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Avantages et désavantages de l'utilisation de *Pichia pastoris* pour la production de protéines hétérologues (Fernandez et Hoeffler, 1999, Romanos, 1995, Higgins et Cregg, 1998, Yinliang *et al.*, 1997, Klein *et al.*, 1998)

Avantages	Désavantages
<ul style="list-style-type: none"> • Croissance rapide • Croissance à haute densité cellulaire • Mise à échelle facile • Méthodes de génétique moléculaire bien connues (semblables à celles pour <i>S. cerevisiae</i>) • Promoteur fort et bien contrôlé • Modifications post-traductionnelles possibles • Peu de protéines endogènes sécrétées 	<ul style="list-style-type: none"> • Culture en fermenteur souvent requise pour atteindre un haut taux de production • Vecteurs disponibles limités • Modifications post-traductionnelles parfois inadéquates • Difficulté de sécrétion de certaines protéines • Possibilité de dégradation de la protéine d'intérêt par les protéases du milieu

1.1.3 Caractéristiques générales

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires qui font partie du règne des mycètes (Brock et Madigan, 1996). Les levures méthylophiles se divisent en deux principaux groupes : les asporogènes dont font partie les espèces appartenant aux genres *Candida* et *Torulopsis*, et les ascomycètes qui regroupent les espèces des genres *Hansenula* et *Pichia* (Faber *et al.*, 1995). Les cellules de *Pichia pastoris* se reproduisent par bourgeonnement multipolaire et leur taille moyenne est de 4-6 μm (Figure 1.1) (Higgins et Cregg, 1998).

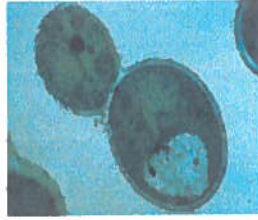


Figure 1.1 : *Pichia pastoris* (Invitrogen, 1999)

1.1.4 Voie métabolique du méthanol

Pichia pastoris est une levure méthylotrophe, c'est à dire qui peut utiliser le méthanol comme source unique de carbone. Celui-ci pénètre dans la cellule par simple diffusion (Arnold, 1981). L'alcool oxydase (AOX) (réaction 1) est l'enzyme clé qui lui permet d'oxyder le méthanol (CH_3OH) en formaldéhyde (HCOH) (Figure 1.2). Cette réaction entraîne la formation d'une molécule de peroxyde d'hydrogène toxique pour la cellule, c'est pourquoi elle a lieu dans un compartiment cellulaire appelé le peroxysome. Cette organelle peut représenter jusqu'à 80 % du volume cellulaire total lorsque les cellules de *Pichia pastoris* croissent en utilisant le méthanol comme source de carbone (Faber *et al.*, 1995). À cet endroit, le peroxyde d'hydrogène sera décomposé en oxygène et eau par la seconde enzyme de cette voie métabolique, la catalase (réaction 2). Une partie du formaldéhyde quitte le peroxysome pour être transformé en énergie à la suite de plusieurs réactions impliquant deux autres enzymes (réactions 3 et 4). L'autre partie sera convertie en dihydroxyacétone par l'enzyme DHAS («dihydroxyacétone synthase») (réaction 5) pour la production de constituants cellulaires (Sakai, Tani et Kato, 1999).

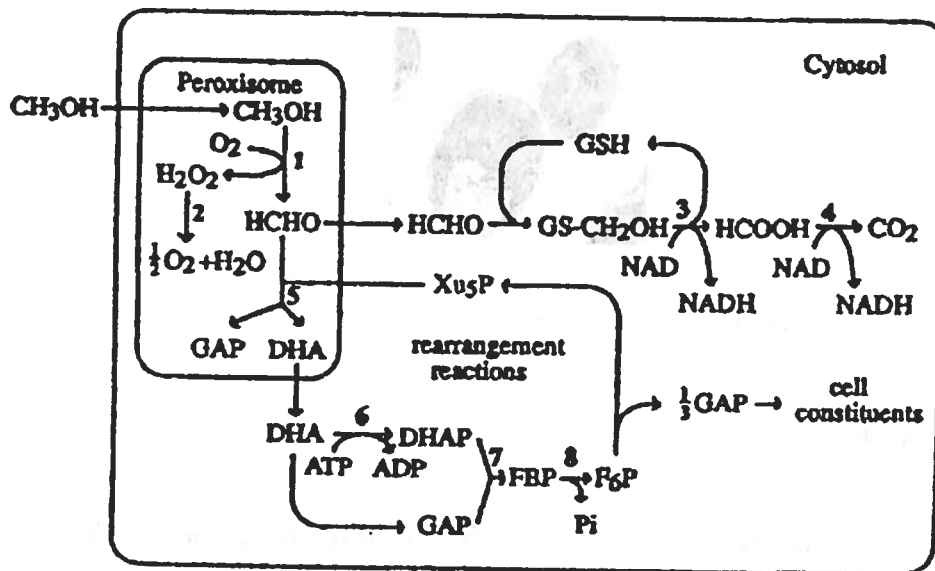


Figure 1.2 : Voie métabolique du méthanol (Sakai, Tani et Kato, 1999)

(Note : Les ions H⁺ ne sont pas indiqués sur le schéma, exemple : NAD⁺ devient NADH + H⁺)

Suite à des cultures en bioréacteur utilisant le méthanol comme source de carbone, les chercheurs ont observé que l'enzyme AOX pouvait représenter jusqu'à 30 % des protéines solubles totales (Cregg et Higgins, 1995, Sakai, Tani et Kato, 1999, Cregg *et al.*, 1989, Siegel et Brierley, 1989). L'enzyme alcool oxydase n'est pas détectée lors de la croissance avec d'autres sources de carbone (Cregg et Higgins, 1995). L'étude de la voie métabolique du méthanol a démontré que cette enzyme a une très faible affinité pour l'oxygène, la cellule compense donc cette faiblesse en produisant de très grandes quantités de l'enzyme (Cregg et Higgins, 1995).

À partir de cette observation, il fut proposé d'utiliser le promoteur de l'alcool oxydase pour la production de grandes quantités de protéines hétérologues. La première étape pour le développement de ce système fut le clonage et la caractérisation du promoteur du gène de l'alcool oxydase. C'est alors que les chercheurs découvrirent que cette enzyme est codée par deux gènes qu'ils nommèrent AOX1 et AOX2 (Cregg, Vedvick et Raschke, 1993). Les protéines codées par ces deux gènes sont à 90 % et plus identiques (Fernandez et Hoeffler, 1999). Toutefois, le gène AOX1 est responsable

de la production quasi totale de l'enzyme alcool oxydase (Cregg, Vedvick et Raschke, 1993). La stratégie à employer pour la production de protéines hétérologues est donc de cloner le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur du gène AOX1. L'activation ou l'inactivation des gènes AOX1 et AOX2 permet d'obtenir trois phénotypes au niveau de l'utilisation du méthanol, soit Mut⁺, Mut^s ou Mut⁻ (utilisation du méthanol) (Higgins et Cregg, 1998).

✧ Phénotype Mut⁺

Les gènes AOX1 et AOX2 sont actifs chez les souches de phénotype Mut⁺ (utilisation positive du méthanol). Le gène d'intérêt et le gène de l'alcool oxydase sont contrôlés par le promoteur AOX1. La souche peut donc croître sur un milieu dont la source de carbone est le méthanol et produire la protéine d'intérêt en même temps. Le taux de croissance sur méthanol est d'environ 0.14 h⁻¹ (un dédoublement aux 4 à 6 h) (Invitrogen, 1999). La production de ce type de souche nécessite une concentration de méthanol dans le milieu variant de 0.4 à 3 % (v/v) (Higgins et Cregg, 1998). De plus, les souches de phénotype Mut⁺ sont beaucoup plus sensibles que les souches Mut^s aux concentrations résiduelles de méthanol puisqu'un mélange de méthanol et d'oxygène (souvent ajouté à la culture pour la croissance des souches de phénotype Mut⁺) à haute concentration dans le milieu produira des quantités de formaldéhyde toxiques pour la cellule (Higgins et Cregg, 1998, Invitrogen, 1999).

✧ Phénotype Mut^s

Le gène AOX1 étant désactivé par l'insertion d'un autre gène, les cellules de phénotype Mut^s doivent utiliser le gène AOX2 actif pour oxyder le méthanol. Il en résulte donc une souche possédant un taux de croissance (μ) très lent sur méthanol ($\mu = 0.04 \text{ h}^{-1}$, environ un dédoublement toutes les 17 à 18 h), d'où l'appellation «Méthanol utilisation slow» (Invitrogen, 1999 et Higgins et Cregg, 1998). La concentration de méthanol requise dans le milieu pour l'induction de ce type de souche est de 0.2 à 0.8 % (v/v) (Higgins et Cregg, 1998). Des concentrations supérieures peuvent être toxiques pour les cellules (Guarna *et al.*, 1997). Il est généralement plus facile de faire la mise à échelle de souches de ce phénotype

puisqu'elles sont moins sensibles que les souches Mut⁺ à des concentrations résiduelles de méthanol (Higgins et Cregg, 1998) et que la quantité de méthanol nécessaire à grande échelle est inférieure à celle nécessaire pour les souches Mut⁺ (Cereghino et Cregg, 2000, Wood et Komives, 1999). De plus, des taux de production de protéines supérieurs sont parfois obtenus avec l'utilisation de souches de phénotype Mut^s comparativement aux taux obtenus avec des souches de phénotype Mut⁺ (Werten *et al.*, 1999, Cregg et Higgins, 1995).

❖ Phénotype Mut⁻

Les gènes AOX1 et AOX2 sont inactifs chez les souches de phénotype Mut⁻ (utilisation **négative** du méthanol). Ces souches ne peuvent pas utiliser le méthanol mais celui-ci permet tout de même l'induction de la protéine d'intérêt placée sous le contrôle du promoteur fort AOX1. Une source de carbone supplémentaire comme le glycérol, par exemple, est donc nécessaire pour la croissance. L'inconvénient de l'utilisation de cette souche est la répression que peut causer l'ajout de la seconde source de carbone sur le promoteur de l'alcool oxydase (Higgins et Cregg, 1998).

1.1.5 Sécrétion

La sécrétion d'une protéine dans le milieu extracellulaire implique une dépense supplémentaire d'énergie qui a comme effet une baisse du rendement de production de la protéine d'intérêt. Toutefois, la purification d'une protéine sécrétée chez *Pichia pastoris* est beaucoup plus simple, rapide et engendre moins de perte que la purification d'une protéine intracellulaire. Il peut donc être avantageux de construire un système permettant la sécrétion de la protéine d'intérêt dans le milieu extracellulaire.

Chez *Pichia pastoris*, la protéine d'intérêt contrôlée par le promoteur du gène AOX1 et liée à un facteur de sécrétion peut représenter plus de 80 % des protéines totales extracellulaires (Romanos, 1995). Les chercheurs qui utilisent *Pichia pastoris* ont eu plus de succès avec les signaux de sécrétion de levures qu'avec ceux d'autres organismes (Romanos, 1995). Le peptide signal α de *S. cerevisiae* «yeast mating

pheromone», efficace pour la sécrétion de protéines de petites tailles (Sreekrishna *et al.*, 1997), est utilisé par plusieurs chercheurs (Romanos, 1995, Bruin, Wolf et Laane, 2000, McAleer et Rima, 2000, Sreekrishna *et al.*, 1997). De nombreux auteurs ont obtenu la sécrétion de protéines recombinantes actives et repliées de manière adéquate chez *Pichia pastoris* (Bruin, Wolf et Laane, 2000, Jimenez *et al.*, 1997, Klein *et al.*, 1998, Maeda *et al.*, 1999, McAleer et Rima, 2000, Werten *et al.*, 1999). À notre connaissance, la quantité maximale de protéines hétérologues sécrétées chez *Pichia pastoris* a été obtenue par Werten *et al.* (1999) avec la gélatine.

Le mécanisme de sécrétion chez les levures est bien connu et la sécrétion s'effectue selon les étapes suivantes (Figure 1.3) :

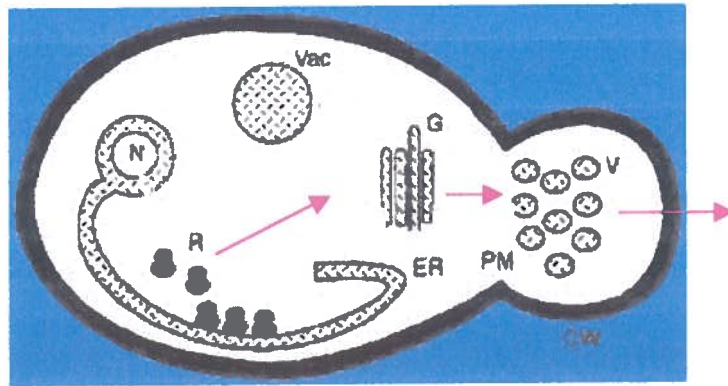


Figure 1.3 : Étapes de sécrétion de protéines chez les levures (N : noyau, Vac : vacuole, R : ribosomes, G : appareil de Golgi, ER : réticulum endoplasmique, PM : membrane plasmique, CW : paroi cellulaire, V : vésicules de sécrétion)

(Romanos, Scorer et Clare, 1992)

✧ Translocation vers le réticulum endoplasmique (RE ou «ER») (Romanos, Scorer et Clare, 1992)

Grâce à une séquence signal située à l'extrémité N-terminale, les protéines devant être sécrétées sont dirigées vers le réticulum endoplasmique pendant la traduction. Dans le RE, le peptide signal est clivé par une enzyme signal peptidase. De plus, il peut y avoir N-glycosylation des protéines. Le signal pour l'addition de ces sucres est le même pour les levures et les mammifères, soit Asn-X-Ser/Thr. Des oligosaccharides peuvent aussi être ajoutés à l'extrémité C-terminale. C'est dans cette organelle que la protéine se replie et acquière sa conformation.

◇ Transport des protéines vers l'appareil de Golgi (G)

Les protéines sont ensuite transportées par des vésicules au Golgi. C'est dans cet appareil qu'ont lieu les modifications des structures glycosylées ajoutées à l'étape précédente. Ces modifications diffèrent souvent entre les levures et les eucaryotes supérieurs. Celles-ci constituent un problème majeur pour la sécrétion de glycoprotéines thérapeutiques chez les levures, puisqu'elles peuvent conduire à des propriétés antigéniques (Romanos, Scorer et Clare, 1992). Toutefois, les protéines sécrétées par *Pichia pastoris* ne sont pas hyperglycosylées comme celles sécrétées par *S. cerevisiae*. Elles ne comportent pas les chaînes α 1,3-mannose très antigéniques présentes chez d'autres levures (Romanos, 1995). Même si ces modifications post-traductionnelles ressemblent plus à celles des eucaryotes supérieurs que les modifications effectuées par d'autres levures, elles ne sont pas identiques. Une étude sur la glycosylation de six protéines recombinantes produites chez *Pichia pastoris* (Montesino *et al.*, 1998) révèle qu'il existe des différences et des similitudes entre la glycosylation des protéines originales et celles des protéines produites chez *Pichia pastoris*. Les protéines produites à des fins thérapeutiques doivent donc être testées pour leurs propriétés antigéniques.

◇ Empaquetage dans des vésicules de sécrétion (V)

Les protéines à être sécrétées sont empaquetées dans des vésicules de sécrétion et amenées vers la surface des cellules. En fusionnant avec la membrane cytoplasmique, ces vésicules permettent la sécrétion des protéines dans le milieu extracellulaire (Romanos, Scorer et Clare, 1992).

1.1.6 Protéines produites par *Pichia pastoris*

À ce jour, plus de 120 protéines, dont 81 sécrétées, ont été produites par *Pichia pastoris*. Le Tableau 1.3 énumère quelques unes de ces protéines (Cereghino et Cregg, 2000) retrouvées dans la liste la plus récemment publiée sur la production de protéines par *P. pastoris*. Pour plus d'informations sur l'utilisation de *Pichia pastoris* pour la production de protéines hétérologues et pour une liste exhaustive des protéines

produites à ce jour, les revues suivantes peuvent être consultées : Cereghino et Cregg, 2000, Cregg et Higgins, 1995, Romanos, 1995, Faber *et al.*, 1995, Cregg, Vedvick et Raschke, 1993.

Tableau 1.3 : Production de protéines par *Pichia pastoris* à ce jour (juin 1999)

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

1.2 La protéine fluorescente verte («Green Fluorescent Protein» ou GFP)

Afin d'étudier la production de protéines hétérologues chez *Pichia pastoris*, le gène de la GFP a été choisi comme modèle pour ce travail de maîtrise. Ce gène rapporteur code pour une protéine fluorescente verte qui n'a besoin d'aucun co-facteur pour être fluorescente (Tsien, 1998). La fluorescence étant directement proportionnelle à la concentration de la protéine (Pérard, 2000), celle-ci peut-être utilisée pour faire un suivi rapide de la concentration en GFP pendant la fermentation.



Figure 1.4 : La protéine fluorescente verte (GFP)

1.2.1 Historique

La GFP fut découverte en 1962 par Shimomura (1981) chez la méduse du Nord-Ouest du Pacifique, *Aequorea victoria*. Le gène de la GFP fut cloné pour la première fois en 1991 par Prasher (Misteli et Spector, 1997). Ce fut le début du développement d'une multitude d'applications pour l'utilisation de cette protéine en recherche biologique. Chalfie *et al.* (1994) démontrèrent ensuite que l'expression du gène de la GFP cloné chez un organisme hétérologue (*E. coli*) crée de la fluorescence. Ils ont ainsi prouvé que le gène de la GFP contient toute l'information nécessaire pour la formation post-traductionnelle du chromophore, et qu'aucune enzyme spécifique à la méduse n'est nécessaire pour obtenir cette fluorescence.

1.2.2 Caractéristiques de la protéine

1.2.2.1 Généralités

La GFP est une protéine d'environ 27 kDa et de 238 acides aminés dont la propriété est d'être fluorescente (Yang, Moss et Phillips, 1996). Cette fluorescence est produite grâce au chromophore. Celui-ci consiste en un p-hydroxybenzylideneimidazolinone formé des résidus 65 à 67 soit une sérine, une tyrosine et une glycine (Tsien, 1998). Il est créé par cyclisation et oxydation post-traductionnelle du tripeptide Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ (Yang, Moss et Phillips, 1996). La protéine doit être repliée de manière

adéquate et en présence d'une molécule d'oxygène pour générer de la fluorescence. Le chromophore est relativement stable puisque la structure tridimensionnelle révèle une forme d'amphore à l'intérieur de laquelle se retrouve le chromophore. Cette amphore est constituée de 11 feuillets β qui entourent le chromophore lui-même ancré à une hélice α (Tsien, 1998).

1.2.2.2 Fluorescence

Les molécules fluorescentes absorbent la lumière à une longueur d'onde donnée et l'émettent à une longueur d'onde plus élevée (Alberts *et al.*, 1993). La GFP de type sauvage absorbe principalement la lumière à 395 nm mais possède aussi un pic mineur d'absorbance à 470 nm. Le spectre d'émission se situe à 509 nm (Cody *et al.*, 1992). Suite à certaines limitations de l'utilisation de la GFP de type sauvage, des mutants ont été créés dans le but d'augmenter l'intensité du signal, la vitesse oxydative de la formation du chromophore et la résistance à la surexposition à la longueur d'onde d'excitation. Les maxima d'excitation sont aussi plus faciles à détecter à l'aide d'instruments de mesure conventionnels (Yang *et al.*, 1998). Le remplacement de la Ser⁶⁵ du chromophore par une thréonine ou une cystéine résulte en une protéine qui continue à émettre à 509 nm, mais dont la longueur d'onde d'excitation est déplacée dans l'infra-rouge, à 473 nm. Cette protéine, nommée «Red shifted GFP» ou rsGFP, permet l'utilisation de fluoromètres ou du FACS («Fluorescence Activated Cell Sorting») à des longueurs d'onde déjà utilisées pour d'autres applications. De plus, la formation du chromophore chez ces mutants est plus rapide et le signal est plus fort (Quantum Biotechnology Inc., 1997). C'est pourquoi le clone 20 utilisé dans ce projet contient le gène codant pour la «Red-shifted GFP». D'autre part, le remplacement de la Tyr⁶⁷ par une histidine déplace le pic d'excitation à 387 nm et le pic d'émission à 450 nm, ce qui se traduit par une protéine à fluorescence bleue. Cette dernière peut être utilisée en combinaison avec la GFP pour colorer de façon différente des protéines ou organelles (Quantum Biotechnology Inc., 1997). Enfin, en 1998, Andersen *et al.* (1998) ont construit des mutants de GFP qui sont plus sensibles aux protéases que la GFP de type sauvage, elle-même très

résistante. Ces mutants peuvent être utilisés pour faire le suivi par fluorescence de la production de protéines hétérologues sensibles à la dégradation par les protéases.

1.2.3 Applications

1.2.3.1 Criblage biologique

Facilement et rapidement détectée par simple excitation à la longueur d'onde appropriée, la GFP est un outil prometteur pour le criblage de nouveaux composés actifs par l'industrie pharmaceutique (Misteli et Spector, 1997). En effet, des composés peuvent être mis en présence d'une cible d'intérêt couplée à la GFP. Les composés qui peuvent se lier à cette cible seront rapidement détectés grâce à la fluorescence de la GFP.

1.2.3.2 Visualisation de la machinerie cellulaire

La GFP peut être fusionnée avec un gène codant pour une protéine dont on veut étudier la localisation cellulaire. L'observation au microscope à fluorescence permet de situer la protéine puisqu'elle apparaît verte. Cette technique a été utilisée pour visualiser le transport de protéines du cytoplasme au noyau après activation (Tsien et Miyawaki, 1998). Tagge *et al.* (1997) ont utilisé une fusion de la GFP avec la ricine pour étudier le transport de peptides internalisés. La GFP a aussi été utilisée chez les levures pour localiser les protéines impliquées dans le bourgeonnement des cellules de *S. cerevisiae* (Nidenthal *et al.*, 1996). Enfin, elle a déjà été clonée chez *Pichia pastoris* pour observer le rôle des protéines de translocation dans le transport d'autres protéines aux peroxisomes (Kalish *et al.*, 1996).

1.2.3.3 Indicateur de changements dans l'environnement (Tsien, 1998)

Bien que la fluorescence de la GFP soit relativement stable, celle-ci est sujette à des variations dans le spectre d'émission ou d'excitation lorsque certains paramètres de l'environnement varient. Ceci est le cas pour des changements de pH, de phosphorylation et de potentiel membranaire. Ces variations peuvent être exploitées

pour étudier les changements de l'environnement intra ou extracellulaire de manière non invasive.

1.2.3.4 Suivi et contrôle de la quantité de protéines produites

Dans le cadre d'un projet de recherche au CNRC-IRB, le gène de la GFP a été cloné dans *Pichia pastoris* afin de pouvoir mesurer rapidement la quantité de protéines recombinantes présentes à tout moment dans le milieu de culture et ainsi optimiser les procédés de production. Cette stratégie a déjà été utilisée pour mesurer l'effet de différents promoteurs sur le niveau de production de protéines hétérologues chez *E. coli* par Melichar *et al.* (2000). Poppenborg et ses collaborateurs ont plutôt utilisé la GFP comme protéine de fusion pour faire le suivi d'un procédé de séparation (Poppenborg, Friehs et Flaschel, 1997). Toutefois, la très grande stabilité de la GFP peut devenir une limitation lors de son utilisation, puisque la fluorescence de celle-ci ne reflète pas toujours la concentration de la protéine de fusion étudiée (Andersen *et al.*, 1998). L'utilisation de la GFP pour faire le suivi de la production de protéines recombinantes en fermenteur a aussi été décrite chez *E. coli* (Dabrowski, Brillowska et Kur, 1999) et chez *A. niger* (Siedenberg *et al.*, 1999).

1.3 La culture

Après avoir étudié le micro-organisme cultivé ainsi que la protéine d'intérêt à exprimer dans ce système, la méthode de culture doit être déterminée. En premier lieu, nous devons identifier les paramètres nécessaires à la croissance du micro-organisme et à la production de la protéine hétérologue. Puis, nous choisirons un système de culture répondant à nos besoins.

1.3.1 Paramètres pour la culture des micro-organismes

1.3.1.1 Nutriments

On affirme que la formulation de milieux de culture pour la fermentation est une combinaison d'art et de science (Zabriskie *et al.*, 1982). La base scientifique repose sur les besoins nutritionnels fondamentaux communs à tous les micro-organismes. L'art est nécessaire lorsque les besoins spécifiques de l'espèce d'intérêt sont inconnus. En général, deux facteurs nutritionnels sont essentiels pour l'activité microbienne : une source d'énergie pour les procédés métaboliques de la cellule, et des matériaux pour la synthèse des produits cellulaires. Les micro-organismes utilisent plusieurs stratégies pour obtenir leur énergie. La Figure 1.5 résume les différentes méthodes d'utilisation de l'énergie par les micro-organismes. Les catégories dont fait partie la levure *Pichia pastoris* sont en gras.

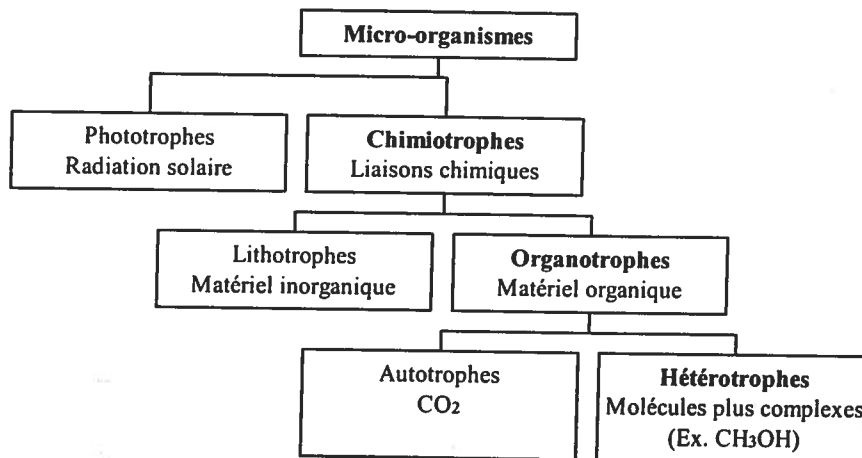


Figure 1.5 : Utilisation des sources d'énergie par les micro-organismes
(Ward, 1992)

Les cellules requièrent des éléments pour le maintien et la croissance que nous pouvons classer en deux catégories : les macronutriments et les micronutriments. Les macronutriments sont les constituants majeurs de la cellule, ensemble ils représentent 95 % du poids sec de celle-ci (Prescott, Harley et Klein, 1995). Ils sont nécessaires en quantité importante pour assurer une bonne croissance des micro-

organismes. Les macronutriments, le pourcentage du poids sec d'une cellule qu'ils représentent, leur rôle ainsi que leur provenance sont décrits dans le Tableau 1.4.

Tableau 1.4 : Les macronutriments

Macronutriments	% poids sec*	Rôle (Prescott, Harley et Klein, 1995)	Sources industrielles (Prescott, Harley et Klein, 1995)
Carbone	50 %	Constituants des glucides, lipides, protéines et acides nucléiques	Mélasse, déchets agricoles, petit-lait, divers sucres
Oxygène	20 %		Air, oxygène pur
Azote	14 %		Eaux de lavage du maïs, farine de soja, ammoniacque et sels d'ammonium, nitrates
Hydrogène	8 %		Eau
Phosphore	3 %		Sels de phosphate
Soufre	<1 %		Sels de soufre
Potassium	<1 %		Support à diverses activités enzymatiques
Sodium	<1 %	Équilibre osmotique	NaCl
Calcium	<1 %	Équilibre osmotique, thermorégulation	
Magnésium	<1 %	Cofacteurs, stabilisation des ribosomes et membranes	MgSO ₄
Fer	<1 %	Cofacteur, synthèse des cytochromes	

* (van Dam-Mieras *et al.*, 1992)

Les micronutriments sont aussi indispensables à la plupart des cellules, mais en quantité tellement faible que les impuretés de l'eau, de la verrerie et des milieux de culture sont généralement suffisantes. Ceux-ci sont le manganèse, le zinc, le cobalt, le molybdène, le nickel et le cuivre (Prescott, Harley et Klein, 1995). Selon le micro-organisme cultivé, d'autres micronutriments peuvent être requis.

1.3.1.2 Le pH

Le pH du milieu de culture affecte grandement la croissance de tous les micro-organismes. Ceux-ci peuvent habituellement croître dans une fourchette d'unités de

pH assez restreinte. En général, on peut affirmer que les mycètes préfèrent les pH plutôt acides alors que les bactéries préfèrent les pH voisins de la neutralité et parfois même légèrement alcalins. Lors de la croissance de micro-organismes, il peut s'avérer difficile de maintenir le pH à une valeur non toxique pour les cellules (van Dam-Mieras *et al.*, 1992). La croissance de plusieurs micro-organismes entraîne la production de grandes quantités d'acides organiques qui diminuent le pH du milieu. Deux stratégies peuvent être envisagées pour éliminer ce problème : utiliser un milieu tamponné ou contrôler le pH à l'aide d'un ajout de base forte (van Dam-Mieras *et al.*, 1992).

Bien que des valeurs de pH comprises entre 3 et 7 puissent convenir à la croissance de *Pichia pastoris*, la production de protéines hétérologues nécessite un pH précis permettant une activité maximale de la protéine d'intérêt tout en limitant l'activité protéolytique. Les travaux d'optimisation de Inan *et al.* démontrent que le pH est le paramètre qui influence le plus le rendement en protéines hétérologues chez *Pichia pastoris* (Inan *et al.*, 1999).

1.3.1.3 La température

Selon leur température optimale de croissance, les micro-organismes peuvent être divisés en trois groupes : les psychrophiles qui préfèrent les températures froides (0° à 20° C), les mésophiles qui préfèrent les températures moyennes (10° à 40° C) et enfin les thermophiles qui sont des micro-organismes pouvant croître à des températures très élevées (40° à 80° C) (Alberts *et al.*, 1993, van Dam-Mieras *et al.*, 1992). Bien que les levures aient la capacité de survivre à des températures extrêmes sous certaines conditions, la température optimale pour leur croissance se situe habituellement entre 20° et 37°C (van Dam-Mieras *et al.*, 1992). Lors de la production de protéines recombinantes chez un micro-organisme, la température optimale pour la croissance cellulaire n'est pas nécessairement la température optimale pour la production de protéine. Par exemple, McAleer et Rima (2000) ont obtenu plus de protéines virales recombinantes à 25°C chez *Pichia pastoris* qu'à

30°C, même si la température optimale de croissance de cette levure est 30°C. Les résultats des recherches de Inan *et al.* (1999) en vue d'optimiser la production de protéines chez *Pichia pastoris* suggèrent l'utilisation de température entre 24° et 30° C.

1.3.1.4 La stérilité

Les milieux de culture contiennent souvent des micro-organismes contaminants car les ingrédients et l'environnement de travail ne sont pas stériles. Lors de la culture de cellules microbiennes, les nutriments et les conditions présentes dans le fermenteur sont aussi propices à la croissance d'autres micro-organismes. Cette contamination peut avoir plusieurs effets indésirables : augmentation de l'utilisation des nutriments entraînant une perte de productivité, croissance des contaminants supérieure à celle du micro-organisme d'intérêt, contamination du produit final, etc. (Stanbury et Whitaker, 1984). L'absence totale de contamination est un défi pour tout spécialiste de la fermentation. Toutefois, pour minimiser les chances d'invasion par d'autres micro-organismes opportunistes, les stratégies suivantes doivent être employées (Stanbury et Whitaker, 1984) :

- ◇ Utilisation d'une culture pure pour l'inoculum de départ
- ◇ Stérilisation du milieu
- ◇ Stérilisation du fermenteur et des sondes qui sont en contact avec la culture
- ◇ Stérilisation du matériel à ajouter au fermenteur
- ◇ Utilisation de techniques aseptiques pour toute manipulation de la culture

Pour stériliser les nutriments qui entrent dans la composition du milieu de culture, deux solutions sont possibles : la stérilisation par filtration et la stérilisation par la chaleur.

1.3.1.5 Types de milieux de culture

Selon l'étude à effectuer, différents types de milieux peuvent être utilisés pour la croissance des micro-organismes. Pour obtenir de la biomasse et/ou un produit métabolique à grande échelle, l'utilisation d'un milieu riche est préférable, car il

contient en excès tous les éléments nécessaires à la croissance (Zabriskie *et al.*, 1982). Pour la croissance des levures, un milieu riche contient souvent une source de carbone (glucose, saccharose, glycérol...), une ou plusieurs sources d'azote («Yeast Nitrogen Base», ammoniac, Bacto-peptone) et de l'extrait de levure. Toutefois, pour étudier les besoins métaboliques d'un micro-organisme, l'utilisation d'un milieu défini est plus adéquate (Zabriskie *et al.*, 1982). Pour ce type de milieu, la quantité exacte de chaque élément est connue. La croissance est parfois moins efficace que dans un milieu riche car certains éléments peuvent faire défaut. En effet, les souches peuvent nécessiter la présence d'autres éléments qui seraient présents dans un milieu riche.

Certains milieux peuvent aussi être utilisés pour identifier les micro-organismes. Les milieux sélectifs contiennent un élément permettant la croissance d'un type particulier de micro-organisme aux dépens des autres (van Dam-Mieras *et al.*, 1992). Les milieux différentiels permettent la croissance de plusieurs micro-organismes, mais avec des caractéristiques nous permettant de les identifier (van Dam-Mieras *et al.*, 1992). Enfin, lorsque des micro-organismes sont cultivés à l'échelle industrielle, la priorité pour le choix des nutriments réside dans le coût de ceux-ci. C'est pourquoi les compagnies de production utilisent souvent des déchets industriels économiques et très riches (mélasse, liqueur de maïs,...) comme source de nutriments pour les cellules (Zabriskie *et al.*, 1982).

1.3.2 Systèmes de fermentation

1.3.2.1 Méthodes de culture (Ward, 1992)

Les fermentations peuvent être conduites en mode cuvée («batch»), en mode cuvée alimentée («fed-batch»), en mode continu ou selon une variante de ces modes. Le procédé de culture en cuvée peut être considéré comme un système fermé sauf pour l'aération. Tous les nutriments sont ajoutés au début et la croissance des micro-organismes est divisée en plusieurs stades illustrés à la Figure 1.6. Lors du procédé de cuvée alimentée, certains nutriments sont ajoutés pendant la fermentation. Cette technique peut être utilisée pour diminuer l'effet répressif de l'utilisation rapide d'une

source de carbone, pour diminuer la viscosité du milieu, pour minimiser l'effet toxique de certains constituants du milieu de culture, ou simplement pour augmenter la période de formation du produit. Les procédés de culture en cuvée ou cuvée alimentée sont utilisés pour la majorité des fermentations industrielles. Toutefois, l'inconvénient de ces types de fermentation est que la formation du produit a lieu seulement pendant une petite fraction du cycle de fermentation. Pour contrer ce problème, des méthodes de fermentation en continu ont été développées. Ces fermentations sont des systèmes ouverts dans lesquels le milieu de culture est continuellement ajouté et un volume égal de bouillon de fermentation est retiré du système. L'état de régime permanent est atteint lorsque le taux de dilution est égal au taux de croissance des micro-organismes. Les problèmes de ce système sont la conservation en état de régime permanent ainsi que la prévention de la contamination et de la dérive génétique.

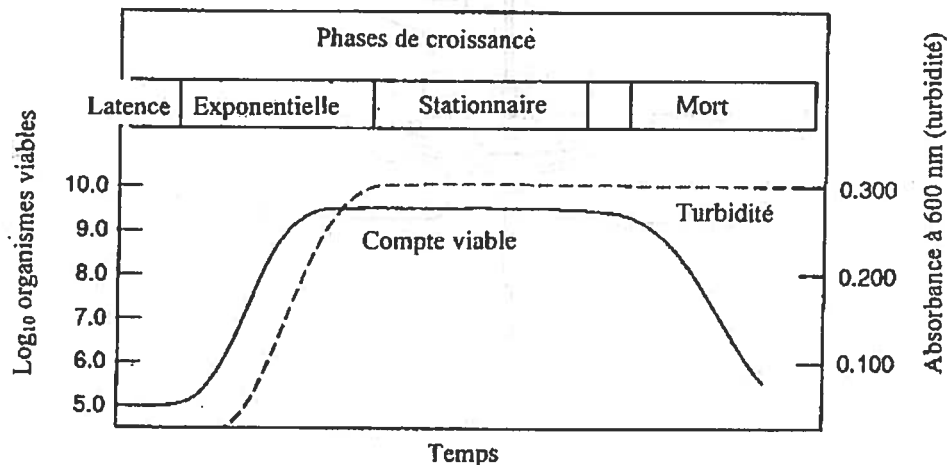


Figure 1.6 : Stades de croissance en cuvée (adapté de Brock et Madigan, 1996)

1.3.2.2 Conception du bioréacteur (Ward, 1992)

La fonction du bioréacteur (fermenteur) est d'établir un environnement contrôlé favorisant la croissance du micro-organisme cible et la formation du produit désiré. Les bioréacteurs industriels doivent être construits pour permettre le contrôle des paramètres nécessaires au procédé désiré de manière économique. De plus, la majorité des fermentations doivent être conduites de façon stérile. Dans cette optique, les bioréacteurs et instruments de mesure associés doivent être construits de manière à

supporter la pression due à la stérilisation. Plusieurs types de bioréacteurs existent pour convenir aux différents procédés. Les critères suivants s'appliquent aux bioréacteurs utilisés pour la croissance de micro-organismes et la production de protéines hétérologues (Figure 1.7 et Tableau 1.5).

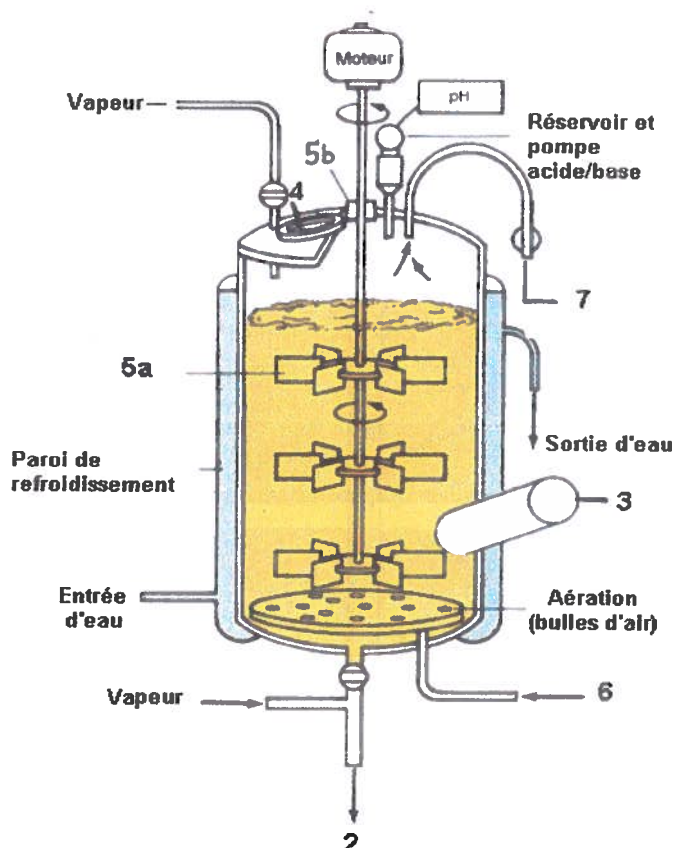


Figure 1.7 : Fermenteur (adapté de Brock et Madigan, 1996)

Tableau 1.5 : Critères pour la conception d'un bioréacteur (Ward, 1992)

Pièces/unités	Critères	Utilisation
1. Cuve	Stérilisable et résistante à divers pH	Contenir le bouillon de fermentation
2. Entrées et sorties	Stérilisables	Faire des ajouts pré-stérilisation et recueillir le produit final
3. Pores latéraux	Étanches	Permettre l'ajout de sondes
4. Pores supérieurs	Étanches	Permettre l'ajout de solutions
5. Agitateur (a) + joint mécanique (b)	Étanches	Permettre le transfert d'oxygène et de nutriments, homogénéiser la culture
6. Entrée d'air	Filtre	Insuffler de l'air stérile
7. Sortie d'air	Filtre	Permettre la sortie d'air sans l'entrée de micro-organismes
8. Condenseur (non-illustré)	Stérilisable	Réduire la perte de liquide par évaporation

1.3.2.3 Instrumentation et contrôle

Plusieurs sondes et appareils intégrés au fermenteur ont pour fonction de mesurer les paramètres d'intérêt en temps réel. En plus de mieux comprendre l'évolution de la culture, ces appareils nous permettent aussi de contrôler les paramètres critiques à l'intérieur des zones optimales de croissance pour les micro-organismes ou de formation du produit. Les systèmes de mesure le plus fréquemment utilisés sont énumérés au Tableau 1.6.

Tableau 1.6 : Description des appareils de mesure utilisés en fermentation
(Ward, 1992)

Paramètres	Appareils de mesure	Principe de mesure
Température	Thermomètre à résistance électrique	Résistance électrique varie avec la température
Pression	Senseur de pression à diaphragme	Mouvement du diaphragme varie avec la pression
Contenu de la cuve	Sonde à niveau ou Pèse matière	Capacité de la sonde varie avec le volume Résistance électrique varie avec le poids
Mousse	Sonde en métal (électrode)	Contact avec la mousse complète un circuit électrique qui active une pompe pour l'addition d'anti-mousse
Vitesse d'agitation	Tachymètre	Mécanisme de détection qui utilise la génération de voltage, la lumière ou la force magnétique
pH	Électrode de verre	Mesure de la concentration en protons ou ions hydronium
O ₂ dissout	Électrode à O ₂	Mesure du courant généré par les électrons produit par le contact entre le métal et l'oxygène
Gaz de sortie	Spectromètre de masse Analyseur de gaz	Molécules de gaz ionisées et analysées en fonction de leur masse. Transducteur infra-rouge (CO ₂) et cellule paramagnétique (O ₂)

1.3.2.4 Mise à échelle

- ◇ Passage de l'Erlenmeyer au fermenteur de laboratoire (20 L) (Humphrey, 1998)

Les résultats obtenus en Erlenmeyers ne sont pas toujours reproductibles en fermenteur. Cette première étape de mise à échelle implique trop de conditions différentes pour réussir à obtenir des résultats identiques. La liste suivante résume les différences que l'on peut observer entre la culture en Erlenmeyers et celle en fermenteur

- ◇ Transfert d'oxygène
- ◇ Transfert de chaleur
- ◇ Qualité de l'agitation
- ◇ Stress causé par l'agitation
- ◇ Auxotrophie cachée

Tous ces facteurs font en sorte que les fermentations en Erlenmeyers doivent être validées en fermenteur lorsque l'objectif final du projet est industriel. Pour plus de détails sur les cinétiques impliquées lors du transfert de l'Erlenmeyer au fermenteur, l'article suivant est suggéré : Humphrey, 1998.

- ◇ Passage du fermenteur de laboratoire (20 L) au fermenteur pilote (75-1500 L)

En plus des points mentionnés pour le transfert de l'Erlenmeyer au fermenteur de laboratoire, d'autres problèmes doivent être résolus lors du passage à plus grande échelle. Dans le cas de *Pichia pastoris*, un transfert d'inoculum de 5 à 10 % devra être fait entre l'Erlenmeyer, le fermenteur inoculum et le fermenteur de production (Dale, Allen et Fogerty, 1999). Puisque l'utilisation du méthanol génère de la chaleur, une attention spéciale est requise pour ce qui est du système de refroidissement à grande échelle (Dale, Allen et Fogerty, 1999). La concentration en oxygène dissout doit être supérieure à 20 % (100 % étant le maximum d'oxygène qu'il est possible de dissoudre) pendant toute la durée du procédé. En raison de la diminution du rapport surface/volume due à l'augmentation de la taille du bioréacteur,

les niveaux d'agitation et d'aération nécessaires pour maintenir la concentration critique d'oxygène dissout seront donc supérieurs. Un enrichissement en oxygène peut être envisagé si l'oxygène de l'air et l'agitation sont insuffisants (Dale, Allen et Fogerty, 1999). Enfin, il est important de mentionner que le facteur le plus important lors du passage à grande échelle est l'augmentation des coûts (Biopharm, 1999). En effet, les coûts en capital (bioréacteur et instruments) ainsi que les coûts courants (milieu, maintenance, personnel, etc.) sont nettement plus importants à grande échelle. Il faut donc s'assurer que le procédé produise une quantité de protéines recombinantes suffisante pour justifier ces coûts (Biopharm, 1999).

1.4 Le méthanol : source de carbone et inducteur

1.4.1 Dangers liés à l'utilisation du méthanol

Le méthanol est souvent utilisé comme seule source de carbone et comme inducteur en phase de production de protéines avec les systèmes d'expression basés sur *Pichia pastoris*. Celui-ci est donc nécessaire en quantité importante pour la production de protéines à grande échelle. Toutefois, l'utilisation de cet alcool représente un danger potentiel pour les manipulateurs puisqu'il est toxique, explosif et inflammable (Fernandez et Hoeffler, 1999) (voir Tableau 1.7). Il est aussi toxique pour les cellules de phénotype Mut^s lorsque la concentration dans le milieu de culture est supérieure à 1 % (v/v) (Guarna *et al.*, 1997). Certains chercheurs suggèrent même que les concentrations en méthanol du milieu de culture ne devraient jamais dépasser 0.5 % (v/v) (Jimenez *et al.*, 1997). Dans une optique de production industrielle, il est donc souhaitable de minimiser les quantités de méthanol utilisées pour l'induction.

Tableau 1.7 : Propriétés physiques et toxicologiques du méthanol
(Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, 2000)

Synonymes	Alcool méthylique, hydrate de méthyle
Formule chimique	CH ₃ OH
État physique	liquide
Odeur	Légère odeur d'alcool
Aspect	Transparent, incolore
Densité	0,792 (H ₂ O = 1)
Point de congélation	-97,8°C (-144 F)
Point d'ébullition	64,5°C (148 F)
Tension de vapeur	96 mm Hg à 20°C (68 F)
Densité de vapeur (air=1)	1,105 à 15°C (59 F)
Taux d'évaporation (acétate de n-butyle = 1)	2,1
Solubilité aqueuse à 20°C	Soluble
Seuil de l'odeur	2000 ppm, irritation ; à 1000 ppm, faiblement détectable
DL50 (Lapin, cutané)	20 mL/Kg
CL50 (Rat, inhalation)	64 000 ppm
Limite inférieure d'explosivité	6 %
Limite supérieure d'explosivité	36 %
Température d'auto-inflammation	385°C (725°F)

1.4.2 Mesure du méthanol

Pour mieux contrôler la phase d'induction, la concentration en méthanol doit être mesurée. La technique qui a été la plus utilisée à ce jour est la mesure en discontinu d'échantillons prélevés du bioréacteur soit par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Jara, Allais et Braratti, 1983), soit par chromatographie à haute pression en phase liquide (HPLC) (Guarna *et al.*, 1997), ou soit par spectrométrie de masse (Camelbeeck *et al.*, 1992). L'inconvénient de ces techniques d'analyse est qu'elles ne permettent pas de connaître la concentration en méthanol en tout temps, et d'établir des protocoles de contrôle. Plusieurs chercheurs ont développé des sondes pour mesurer la concentration de méthanol en continu dans le milieu de culture. Guarna *et al.* (1997) ont mis sur pied un système de mesure et de contrôle du méthanol en Erlenmeyers. D'autres chercheurs ont utilisé des sondes leur permettant de mesurer le méthanol en continu en bioréacteur (Camelbeeck *et al.*, 1992, Katakura *et al.*, 1998 et Wagner *et al.*, 1997). Ces derniers utilisent en majorité un senseur couplé à une

membrane de silicone perméable aux alcools. Le principe de ce senseur est le suivant : il consiste en un semi-conducteur et une unité chauffante. Une augmentation de la concentration en molécules de gaz inflammable (méthanol, éthanol,...) diminue la résistance du senseur. Il existe une relation logarithmique entre la diminution de la résistance du senseur et la concentration en méthanol (Katakura *et al.*, 1998). Grâce à ces méthodes de mesure, différentes stratégies d'alimentation en méthanol ont pu être développées.

1.4.3 Stratégies d'alimentation en méthanol

1.4.3.1 La stratégie d'Invitrogen

Les stratégies suggérées par la compagnie possédant le brevet pour les souches de *Pichia pastoris* sont décrites dans le Tableau 1.8.

Tableau 1.8 : Stratégies suggérées par Invitrogen (1999) pour l'ajout de méthanol

Phénotype	Mut ⁺	Mut ^s	Mut ⁻
Fréquence d'ajout (Invitrogen, 1999)	12 à 24 h	12 à 24 h	12 à 24 h
Concentration après ajout (%, v/v) (Higgins et Cregg, 1998)	0.5	0.5	0.5
Concentrations limites (%, v/v) (Higgins et Cregg, 1998)	0.4-3	0.2-0.8	Non déterminées

1.4.3.2 Autres stratégies d'ajout de méthanol

Dans le but d'optimiser la production de protéines chez *Pichia pastoris*, certains chercheurs ont développé des stratégies d'alimentation en méthanol. Jimenez *et al.* (1997) ont testé trois stratégies d'alimentation basées sur la croissance cellulaire ou sur l'oxygène dissout avec une souche de phénotype Mut^s. Ces résultats suggèrent que la meilleure production peut être obtenue en utilisant une technique d'alimentation basée sur les variations d'oxygène dissout. Muslin *et al.* (2000) ont

eux aussi utilisé une stratégie de contrôle du méthanol basée sur la mesure de l'oxygène dissout pour la production d'une glucosidase d'orge.

1.4.3.3 Contrôle du méthanol

À l'aide des différents appareils de mesure énumérés précédemment et d'une pompe contrôlée, il est possible d'ajuster automatiquement la concentration en méthanol à une valeur désirée. Camelbeeck *et al.* (1992) ont réussi à contrôler la concentration en méthanol à 1.8 g.L^{-1} , $\pm 0.2 \text{ g.L}^{-1}$ (sans prise d'échantillon) et à $\pm 1 \text{ g.L}^{-1}$ (avec échantillonnage, ce qui déstabilise le système) pour la production d'un antigène dans une souche de *Pichia pastoris* de phénotype Mut^s. La concentration de méthanol était mesurée dans la phase gazeuse du bioréacteur à l'aide d'un spectromètre de masse et une boucle de rétroaction permettait d'activer une pompe pour l'ajout de méthanol.

L'utilisation d'une sonde équipée d'une membrane de silicone ainsi que les paramètres influençant la réponse de la sonde ont été étudiés par Wagner *et al.* (1997). Ceux-ci ont réussi à contrôler la concentration de méthanol jusqu'à $1 \text{ \% (v/v)} \pm 0.24 \text{ \%}$ pour une durée de 72 h.

Katakura *et al.* (1998) ont testé quatre différentes concentrations en méthanol maintenues pour la production d'une β -glycoprotéine chez une souche de *Pichia pastoris* de phénotype Mut⁺ : 1.5, 10, 17 et 31 g.L^{-1} . Ils ont constaté que le taux spécifique de production de cette protéine augmentait avec la concentration de méthanol, même si le taux de croissance diminuait. Ils ont émis l'hypothèse qu'une plus grande concentration fournissait plus d'énergie pour la production de protéines. Par ailleurs, les expériences effectuées par McAleer et Rima (2000) avec une souche de phénotype Mut^s ont démontré qu'une concentration inférieure à 1 \% (v/v) était préférable pour l'induction, ce qui suggère, pour ce type de souche, une toxicité à de plus hautes concentrations.

1.4.3.4 Alimentation mixte («Mixed-feeding»)

L'alimentation mixte, c'est à dire l'ajout d'une autre source de carbone en plus du méthanol pendant la phase d'induction, est déjà utilisée pour la croissance des souches de phénotype Mut⁻. Certains auteurs suggèrent d'utiliser cette technique pour la production de protéines avec des souches de phénotype Mut^s (Higgins et Cregg, 1998) pour contrer la déficience en énergie. Le glycérol est utilisé en parallèle avec le méthanol dans des proportions allant de 1 : 1 à 1 : 3 (Higgins et Cregg, 1998). Le glycérol étant reconnu comme un inhibiteur potentiel du promoteur du gène de l'alcool oxydase, il a été suggéré d'utiliser le sorbitol comme source de carbone supplémentaire pour l'alimentation mixte (Sreekrishna *et al.*, 1997 et Chauhan, Arora et Khanna, 1999). Thorpe et ses collaborateurs (Thorpe, d'Anjou et Daugulis, 1999) ont démontré que l'alimentation mixte avec l'ajout de sorbitol permettait effectivement d'atteindre des niveaux de production spécifique plus élevés qu'avec l'ajout de glycérol.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches utilisées

KM71 est une souche de la levure *Pichia pastoris* de phénotype Mut^s obtenue de chez Invitrogen (Carlsbad, CA). La souche mère, GS115 (Mut⁺, Arg⁻, His⁻, aussi de Invitrogen) possède une mutation dans le gène de l'argininosuccinate lyase (*arg4*) ainsi que dans le gène *his4*. Afin d'obtenir la souche KM71 de phénotype Mut^s, le gène de l'alcool oxydase 1 (AOX1) de la souche GS115 a été désactivé par l'insertion du gène *ARG4*. Au CNRC-IRB (Montréal), avant le début de ce projet, la souche KM71 (*his4, aox1::ARG4*) a été génétiquement modifiée par Denis Bourque (groupe de technologie microbienne et enzymatique, Secteur des bioprocédés) afin que la souche produise et sécrète la GFP. La nouvelle souche obtenue, après sélection parmi 20 clones, est appelée C-20 (Mut^s, Arg⁺, His⁻) et contient le gène de la «Red-shifted GFP» (Quantum Biotechnology Inc., Montréal, QC) ainsi que le signal de sécrétion α (du gène de l'« α mating pheromone» de *Saccharomyces cerevisiae*). Le gène de la GFP et le signal de sécrétion ont été intégrés dans le génome de la levure et placés sous le contrôle du promoteur du gène AOX1. Dans un milieu minimal, l'addition d'histidine était nécessaire pour la croissance de la souche C-20, puisque cette souche possédait encore une auxotrophie vis-à-vis l'histidine, comme la souche mère GS115.

Au début de ce projet, une banque de 50 tubes de la souche C-20 a été réalisée puis conservée à -80°C pour servir d'inoculum de départ. Pour ce faire, nous avons utilisé un milieu constitué de 50 % (v/v) de glycérol et de 50 % (v/v) d'un milieu minimal à base de dextrose (Milieu MD + H, Invitrogen) préalablement inoculé avec la souche C-20 et incubé pendant 24 h à 30°C. Le glycérol a été ajouté au milieu minimal après la croissance des levures. Le milieu MD + H contient 2 % (p/v) de D-glucose, 0.0004 g.L⁻¹ de biotine, 1.34 % (p/v) de YNB («Yeast Nitrogen Base», sans acides aminés) ainsi que 0.04 % (p/v) d'histidine. La souche KM71 a été conservée de la même

façon. Pour toutes les cultures effectuées dans ce projet, un tube congelé de la souche C-20 était utilisé comme inoculum de départ, sauf lorsque l'utilisation de la souche KM71 est mentionnée. Un tube congelé de la souche KM71 a été utilisé comme témoin lors de la première fermentation en Erlenmeyers agités puisque cette souche est de phénotype Mut^s mais ne contient pas le gène de la GFP.

2.2 Milieux de culture

Les levures ont été cultivées dans le milieu complexe «BMGY» ou «Buffered Complex Glycerol + Yeast Extract» recommandé par Invitrogen pour la croissance cellulaire de *Pichia pastoris*. Ce milieu était tamponné à pH 6 au départ grâce à un tampon phosphate de potassium 1 M. Le glycérol a été utilisé comme source de carbone et sa concentration dans le milieu était de 1 % (v/v). Le milieu BMGY contenait aussi les ingrédients suivants : du YNB (sans acides aminés, 1.34 %, p/v), de l'extrait de levure (10 g.L⁻¹), du Bacto-peptone (20 g.L⁻¹) et de la biotine (0.0004 g.L⁻¹). Il n'a pas été nécessaire d'ajouter de l'histidine puisque le BMGY est un milieu riche qui contient normalement cet acide aminé en quantité suffisante pour cette application. Toutes les composantes du milieu ont été stérilisées, soit par la chaleur (20 minutes à 121°C à l'autoclave ou 40 minutes à 121°C par stérilisation *in situ* dans le bioréacteur) ou par filtration (unités filtrantes, porosité de 0.2 µm).

Le milieu BMMY («Buffered Complex Méthanol + Yeast Extract», Invitrogen) a ensuite été utilisé pour permettre la production de GFP. Ce milieu était identique au BMGY, mis à part que le méthanol remplaçait le glycérol pour induire les promoteurs de l'alcool oxydase (AOX1 et AOX2). La concentration de méthanol qui a été utilisée pour chacune des expériences est mentionnée au Tableau 2.1 pour les cultures en Erlenmeyers et au Tableau 2.2 pour les cultures en bioréacteur. Les concentrations des autres composants du milieu n'ont pas été modifiées malgré les variations de concentration de méthanol, puisque les différences entre les concentrations de méthanol ont été jugées négligeables (± 1 %, v/v).

2.3 Évaluation de la toxicité du méthanol

Avant de débiter les fermentations, la toxicité du méthanol envers la souche C-20 de *Pichia pastoris* a été évaluée. Pour ce faire, des cultures de la souche C-20 en boîtes de Pétri contenant un milieu MM + H gélosé (milieu minimal méthanol + histidine, Invitrogen) ont été effectuées. Les boîtes de Pétri ont été préparées en duplicata avec les concentrations suivantes en méthanol (v/v) :

0 %, 0.25 %, 0.5 %, 0.75 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3 %, 3.5 %.

La souche C-20 a d'abord été transférée dans un tube de 50 mL contenant 10 mL de milieu BMGY. Cet inoculum a ensuite été dilué de facteurs 10^3 et 10^4 , puis des aliquots de 1 mL de chacune des dilutions ont été étalés sur les boîtes de Pétri. Les milieux gélosés ont été incubés pendant 5 jours à 30°C. La quantité et l'aspect des colonies ont été notés pour chaque boîte de Pétri.

Dans un deuxième temps, des bouillons BMMY (10 mL dans 50 mL) ont été préparés en duplicata selon les concentrations en méthanol suivantes (v/v) :

0.5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %

Un inoculum de la souche C-20 a été préparé de la même manière que pour les boîtes de Pétri. Les bouillons BMMY ont été inoculés avec 1 mL de l'inoculum puis incubés pendant 48 h à 30°C et à 250 tpm. La densité optique a été mesurée pour chaque bouillon BMMY après 24 h et 48 h d'incubation.

2.4 Déroulement des cultures en Erlenmeyers agités

Plusieurs cultures en Erlenmeyers ont été effectuées simultanément afin d'expérimenter diverses stratégies d'induction en parallèle. Les protocoles utilisés existaient déjà au sein du groupe de recherche de technologie microbienne et enzymatique (CNRC-IRB, voir Appendice A) et ont été adaptés selon les besoins de ce projet. Les protocoles étaient basés sur ceux d'Invitrogen (Invitrogen, 1999) pour la production de protéines hétérologues chez *Pichia pastoris*.

Trois séries de fermentations en Erlenmeyers ont été réalisées. Les cultures de chaque série ont été effectuées en parallèle. Dans la mesure du possible, les paramètres de culture ont été gardés constants afin d'étudier uniquement les effets causés par le paramètre étudié. Le Tableau 2.1 présente les paramètres utilisés pour chaque culture (alimentation en méthanol et/ou utilisation de la souche KM71).

Tableau 2.1 : Paramètres utilisés pour chaque fermentation en Erlenmeyer

Séries d'expériences (fermentations)	Erlenmeyers BMMY	Valeur du paramètre (concentration en méthanol et/ou utilisation de la souche KM71)
E1	e1	Souche KM71
	e2	Concentration en méthanol : 0.15-0.65 % (v/v)
	e3	Concentration en méthanol : 0.15-0.65 % (v/v)
	e4	Concentration en méthanol : 0-0.12 % (v/v)
	e5	Concentration en méthanol : 0-0.12 % (v/v)
E2	e1	Concentration en méthanol : 0-0.1 % (v/v)
	e2	Concentration en méthanol : 0-0.1 % (v/v)
	e3	Concentration en méthanol : 0-0.1 % (v/v) et ajouts de glycérol : 0.1-0.2 % (v/v) après 55 h
	e4	Concentration en méthanol : 0-0.1 % (v/v) et ajouts de glycérol : 0.1-0.2 % (v/v) après 55 h
E3	e1	Concentration en méthanol : 0.01-0.3 % (v/v), ajout aux 12 h
	e2	Concentration en méthanol : 0.01-0.3 % (v/v), ajout aux 12 h
	e3	Concentration en méthanol : 0.3-1.1 % (v/v), ajout aux 12 h
	e4	Concentration en méthanol : 0.3-1.1 % (v/v), ajout aux 12 h

Légende :

«E» : Symbole utilisé pour identifier la série d'expériences qui comprend plusieurs cultures en Erlenmeyers effectuées en parallèle. Les chiffres 1 à 3 associés à E correspondent à l'ordre chronologique des expériences.

«e» : Symbole utilisé pour identifier chaque culture en Erlenmeyer effectuée dans une série d'expériences E.

Toutes les étapes ont été effectuées aseptiquement avec du matériel stérile. Au début de chacune des expériences, deux boîtes de Pétri MD + H ont été inoculées avec la souche de *Pichia pastoris* C-20 (ou KM71) provenant de la banque de souche. Celles-ci ont été incubées à 30°C pendant 72 h. Plusieurs colonies provenant de ces ensemencements ont servi à inoculer des tubes de 50 mL contenant 10 mL de milieu BMGY. Ces derniers ont été incubés à 30°C pendant 16 h avec une agitation de 250 tpm. De chaque tube de BMGY, 8 mL ont été utilisés pour inoculer chaque Erlenmeyer de 500 mL contenant 150 mL de milieu BMGY. Les Erlenmeyers ont été incubés à 30°C et à 250 tpm pendant 72 h afin d'obtenir une consommation totale du glycérol par les levures et une production de biomasse. L'épuisement du glycérol a été vérifié par HPLC (voir échantillonnage, section 2.6). Suite à cette croissance cellulaire, le milieu de culture de chaque Erlenmeyer a été centrifugé pour une durée de 5 minutes, à 3500 tpm et à 4°C. Les cellules ont été récupérées et remises en suspension dans le milieu BMMY (100 mL) à raison de deux culots de culture de 150 mL de BMGY dans un Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de BMMY (concentration d'un facteur de 3). Cette phase d'induction (production de GFP) a été poursuivie pendant 4 à 6 jours dans les mêmes conditions d'incubation que pour la croissance cellulaire. Pendant cette période, du méthanol a été ajouté selon les fréquences et concentrations décrites au Tableau 2.1.

2.5 Déroulement des cultures en bioréacteur

Huit fermentations en bioréacteur de 20 L ont été effectuées. Le Tableau 2.2 décrit la stratégie d'alimentation en méthanol employée pour chacune des expériences en bioréacteur. Tous les autres paramètres de fermentation étaient les mêmes pour les 8 expériences.

Tableau 2.2 : Stratégies d'induction pour chaque fermentation en bioréacteur de 20 L

Fermentations	Stratégies d'induction par le méthanol
F1	Stratégie d'Invitrogen : ajout de méthanol aux 12 h Concentration entre 0.25 et 0.70 % (v/v)
F2	Concentration de méthanol contrôlée à 0.1 % (v/v)
F3	Concentration de méthanol contrôlée à 1 % (v/v)
F4	Ajout initial de 1 % (v/v) de méthanol
F5	Ajout initial de 1 % (v/v) de méthanol (duplicata F4)
F6	Ajout initial de 1 % (v/v) de méthanol (triplicata F4)
F7	Concentration de méthanol contrôlée à 0.5 % (v/v)
F8	Concentration de méthanol contrôlée à 0.1 % (v/v) (duplicata F2)

L'inoculum a été préparé de la même manière que pour les expériences en Erlenmeyers. Pour chaque expérience en bioréacteur, trois Erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de milieu BMGY ont été incubés pendant 24 h à 30°C et à 250 tpm. Le bioréacteur et les sondes utilisés ont été préparés et stérilisés selon les protocoles en vigueur à l'usine pilote, CNRC-IRB. Pour mesurer la concentration de méthanol dans le milieu de culture, une sonde Figaro composée d'un détecteur de vapeur organique recouvert d'une membrane de silicone perméable aux gaz a été utilisée et calibrée selon les paramètres présentés à l'Appendice C. Le contenu des Erlenmeyers a été transféré aseptiquement dans le bioréacteur contenant 14 L de milieu BMGY et 0.05 % (v/v) d'anti-mousse (Mazu 207 pur). L'acquisition de données et le contrôle des paramètres ont été effectués chaque minute à l'aide du système d'acquisition de données PCP («Process Control Partner»). Les paramètres suivants ont été utilisés pour la croissance cellulaire :

- ✧ Température : contrôlée à 30°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$)
- ✧ pH : contrôlé à 6 (± 0.2) à l'aide d'addition de H_3PO_4 2 M et/ou de NH_4OH 2 M
- ✧ Oxygène dissout : contrôlé à 20 % ou plus ($\pm 1\%$) par l'agitation et l'aération (100 % étant le maximum d'oxygène que l'on peut dissoudre dans le milieu à 30°C et à 1.05 bar)
- ✧ Agitation : contrôlée entre 500 à 1000 tpm selon la concentration en oxygène dissout
- ✧ Aération : contrôlée de 5 à 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ selon la concentration en oxygène dissout

La croissance cellulaire en mode cuvée sur glycérol a duré en moyenne 15 h (± 1 h) pour chaque fermentation. L'épuisement du glycérol dans le milieu a été observé par l'augmentation brutale de la concentration en oxygène dissout du milieu et par détermination par HPLC. Suite à la consommation totale du glycérol, l'induction a été amorcée par un ajout de méthanol selon l'une ou l'autre des stratégies décrites au Tableau 2.2. Les paramètres de fermentation qui ont été utilisés pour la phase d'induction étaient les mêmes que pour la phase de croissance cellulaire, sauf pour la concentration en oxygène dissout qui n'était plus contrôlée mais seulement mesurée.

La vitesse d'agitation a été fixée à 500 tpm et l'aération maintenue à $7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (0.5 v/v/min). La phase de production de la GFP a été poursuivie pendant une période de 60 h à 150 h, selon les fermentations. Les données suivantes ont été obtenues en continu grâce aux sondes et autres appareils de mesure utilisés avec le bioréacteur : température ($^{\circ}\text{C}$), pH, concentration d'oxygène dissout (% de saturation) et concentration en méthanol (% v/v). De plus, des analyseurs de gaz ont été utilisés afin de mesurer en continu la fraction molaire d'oxygène et de gaz carbonique dans les gaz de sortie du bioréacteur. La concentration molaire d' O_2 a été mesurée à l'aide d'une cellule paramagnétique alors que la concentration molaire de CO_2 a été mesurée par un transducteur infra-rouge. Les analyseurs étaient calibrés avant chaque expérience par Gilbert Piette (Usine Pilote, CNRC-IRB) à l'aide d'azote (100 %) pour faire le zéro ainsi que des mélanges de gaz suivants : air (O_2 20.95 %) et CO_2 (10 % CO_2 , 90 % O_2).

2.6 Échantillonnage

Des échantillons ont été prélevés à des fréquences variables (de 6 h à 12 h) lors des expériences en Erlenmeyers agités et en bioréacteur. Un exemple de la feuille de suivi utilisée pour compiler les résultats des analyses obtenus en cours de fermentation est présenté à l'Appendice B. Les analyses qui ont été effectuées sont décrites ci-dessous.

2.6.1 Évolution de la biomasse

L'évolution de la biomasse a été évaluée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une solution saline (0.85 %, p/v, de NaCl dans de l'eau distillée) a été utilisée comme référence. Des dilutions du milieu de culture ont été effectuées avec de l'eau saline afin d'obtenir une mesure de densité optique comprise entre 0.1 et 0.3. Suite à l'observation d'erreurs supérieures à 10 % pour la mesure de la densité optique lors des cultures en Erlenmeyers agités, il a été décidé de mesurer la densité optique de trois dilutions d'un même échantillon afin de réduire le

pourcentage d'erreur pour les cultures en bioréacteur. Un graphique de la densité optique mesurée en fonction de la dilution de l'échantillon original a été tracé à partir de ces trois mesures. L'équation de la droite obtenue était utilisée afin de mesurer la densité optique de l'échantillon non dilué. Un exemple de ce calcul est présenté à l'Appendice E. À la fin de chaque expérience, le poids sec de la culture a été évalué à l'aide d'une balance à poids sec. Pour ce faire, un échantillon du milieu de culture a été centrifugé pendant 3 à 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de table. Les cellules ont été lavées deux fois dans de l'eau saline (0.85 %, p/v) et remises en suspension dans un même volume d'eau saline que celui du liquide rejeté. Par la suite, une quantité de 2 g de la culture lavée a été déposée sur le pèse-matière de l'appareil qui mesurait le poids avant et après déshydratation de l'échantillon. Le poids du sel de la solution saline (0.85 % p/v) a été soustrait du poids sec total de l'échantillon mesuré.

2.6.2 Concentration en glycérol

La concentration en glycérol a été mesurée à la fin de la phase de croissance cellulaire pour toutes les fermentations. Lors de la fermentation F3, la concentration en glycérol a aussi été mesurée à chaque heure pendant la phase de croissance afin d'estimer la vitesse de consommation de cette source de carbone. Pour chaque analyse, un échantillon du milieu de culture a été centrifugé pendant 3 à 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de table. Le surnageant a ensuite été filtré à l'aide d'un filtre de porosité de 0.45 μm . De ce surnageant, 100 μL ont été injectés dans un HPLC équipé d'une colonne polymérique (0.78 cm par 30 cm, 8 μm). La phase mobile consistait en 0.464 mL d'acide sulfurique 0.0085 N dans 2 L d'eau MilliQ à un débit de 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le temps de rétention du glycérol était de 18.7 minutes. Les analyses au HPLC ont été effectuées par Michael Trani (CNRC-IRB).

2.6.3 Concentration en méthanol

Un chromatographe en phase gazeuse a été utilisé pour mesurer la concentration de méthanol lors de cultures en Erlenmeyers agités ainsi que pour calibrer et vérifier les

mesures obtenues à l'aide de la sonde à méthanol lors des cultures en bioréacteur. Un échantillon du milieu de culture était centrifugé pendant 3 à 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de table, puis le surnageant était filtré à l'aide d'une unité filtrante de porosité 0.45 μm . Cent μL de ce filtrat étaient mélangés à 100 μL d'une solution standard d'éthanol 1 % (v/v, dans eau MilliQ) (standard interne). Le chromatographe était muni d'une colonne Supelco de 6' x 0.125'. Le gaz porteur employé était l'hélium. Les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées :

- ✧ Température du four : 165°C
- ✧ Durée de l'analyse : 6 minutes
- ✧ Température du détecteur utilisé (A) : 250°C
- ✧ Température de l'injecteur utilisé (B) : 250°C

2.6.4 pH du milieu de culture

Le pH d'un échantillon du milieu de culture a été mesuré à l'aide d'un pH mètre afin de suivre son évolution lors des cultures en Erlenmeyers et pour confirmer la lecture de la sonde à pH lors des cultures en bioréacteur.

2.6.5 Observations microscopiques

Des observations microscopiques à 400X ont été effectuées à partir d'un échantillon du milieu de culture dilué 100 fois pour vérifier l'absence de contamination bactérienne ainsi que l'aspect des cellules. Pendant la phase d'induction, des observations au microscope à fluorescence à 200X ont aussi été effectuées pour vérifier la présence de fluorescence verte due à la GFP. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient de 450 à 490 nm et de plus de 520 nm, respectivement.

2.6.6 Mesure de la fluorescence

La fluorescence du milieu de culture¹ ainsi que celle du surnageant, après centrifugation de la culture pendant 3 à 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de table, ont été mesurées par fluorométrie (voir fluoromètre dans la liste des fournisseurs). Pour ce faire, quatre aliquots de 100 µL pour chaque échantillon ont été déposés sur une microplaque de 96 puits. La longueur d'onde d'excitation était de 485 nm et celle pour l'émission était de 520 nm. La sensibilité de l'appareil était réglée à trois et une seule lecture par plaque était effectuée.

2.7 Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE)

Pour chaque expérience en Erlenmeyers ou en bioréacteur, un gel SDS-PAGE a été réalisé afin de confirmer que la fluorescence mesurée au fluoromètre provenait bien de la GFP. Des échantillons prélevés pendant la fermentation ont été centrifugés et les surnageants conservés à -20°C. Chaque échantillon a été mélangé avec 15 µL d'une solution de RB («Running Buffer», Martin Lafrance, CNRC-IRB) et 10 µL d'une solution de SB («Sample Buffer», Martin Lafrance, CNRC-IRB) contenant 16 % de 2-mercaptoéthanol. Un échantillon d'un standard de protéines de faible poids moléculaire a aussi été mélangé avec la même quantité de la solution de SB + 2-mercaptoéthanol. Tous les échantillons ont été portés à ébullition pendant 5 minutes puis centrifugés à l'aide d'une centrifugeuse de table. L'ensemble d'électrophorèse de Bio-Rad a été utilisé pour maintenir le gel et permettre la migration des échantillons. Les échantillons ont été injectés dans un gel de 10-20 % d'acrylamide dans du Tris-HCl. La migration des échantillons s'est faite pendant 15 minutes à 70 V (gel de concentration) et pendant une heure à 140 V (gel de séparation). Le gel a été coloré à l'aide d'une solution de bleu de Commassie (Martin Lafrance, CNRC-IRB) et décoloré à l'aide d'une solution à base de méthanol et d'acide acétique glacial (Martin Lafrance, CNRC-IRB).

¹ La fluorescence du milieu de culture a été mesurée lors des fermentations en bioréacteur uniquement.

2.8 Courbe standard de GFP

Une courbe standard de GFP a été effectuée à deux reprises (janvier 2000 et juillet 2000) pendant la durée du projet pour démontrer la relation linéaire entre la fluorescence mesurée et la concentration de la GFP. Un échantillon de GFP d'une concentration initiale de 0.5 g.L^{-1} a été dilué cinq fois. La relation suivante a été obtenue :

$$[\text{GFP}] = 2.10^{-5} F$$

Où F est la fluorescence en unités arbitraires (U) et [GFP] est la concentration de GFP en g.L^{-1} .

Une baisse de la fluorescence de la GFP de l'ordre de 10 % a été observée lors de la réalisation de la seconde courbe standard. Nous avons ajusté en conséquence tous les résultats obtenus après cette date.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Toxicité du méthanol

Dans le cadre de ce projet, nous avons cherché à en savoir plus sur la tolérance de la souche C-20 vis-à-vis le méthanol par des expériences en milieu gélosé MM + H et en bouillon BMMY. Lors de l'expérience de toxicité sur milieu MM + H gélosé, des colonies levuriennes ont été observées sur toutes les plaques de gélose, jusqu'à une concentration de méthanol de 3.5 % (v/v). Les colonies qui ont poussé sur chaque gélose (concentrations de 0 % à 3.5 % (v/v) de méthanol) étaient trop nombreuses pour être comptées. Aucune différence notable n'a été observée d'un milieu gélosé à un autre au niveau de l'apparence macroscopique des colonies.

Les résultats ont démontré que la souche C-20 était capable de croissance en bouillon BMMY avec une concentration initiale en méthanol allant de 0.5 % (v/v) à 4 % (v/v), bien qu'elle soit de phénotype Mut^s. La croissance des cellules après 24 h et 48 h était toutefois différente selon les concentrations de méthanol dans le milieu de culture. La croissance était presque nulle (moins de 0.5 unité de densité optique après 48 h d'incubation) pour les cultures provenant des tubes de bouillon BMMY de concentration en méthanol de 6 % (v/v) et plus. On peut aussi observer à la Figure 3.1 une baisse graduelle de la croissance des cellules avec des concentrations initiales en méthanol allant de 1 à 4 % (v/v).

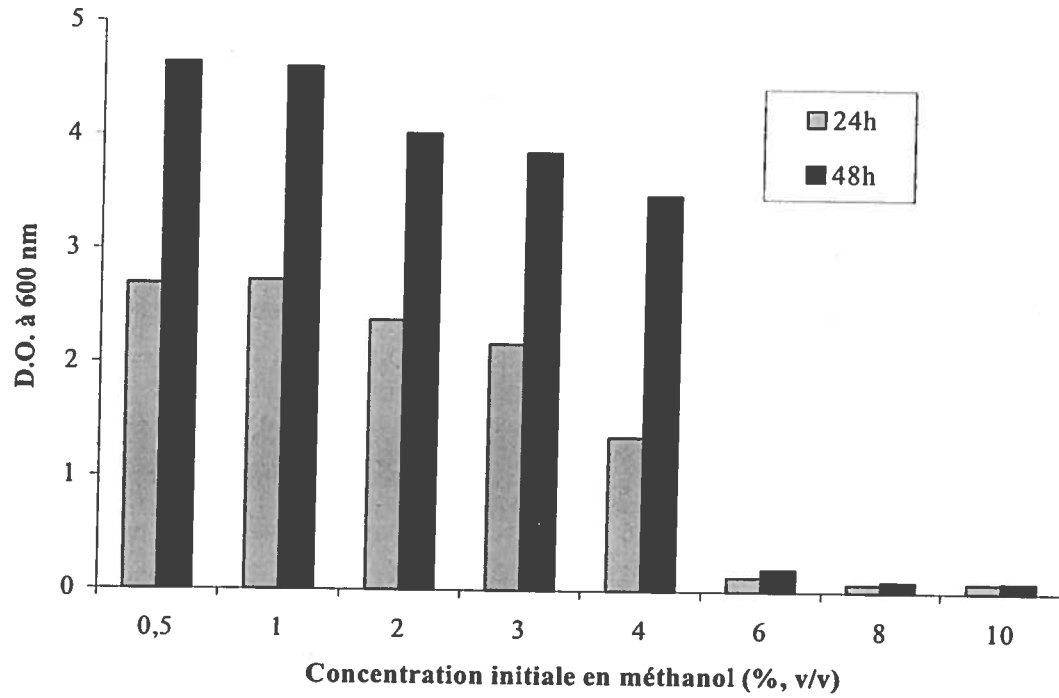


Figure 3.1 : Croissance cellulaire (DO) de la souche C-20 en tubes de milieu BMMY contenant diverses concentrations en méthanol après 24 h et 48 h d'incubation

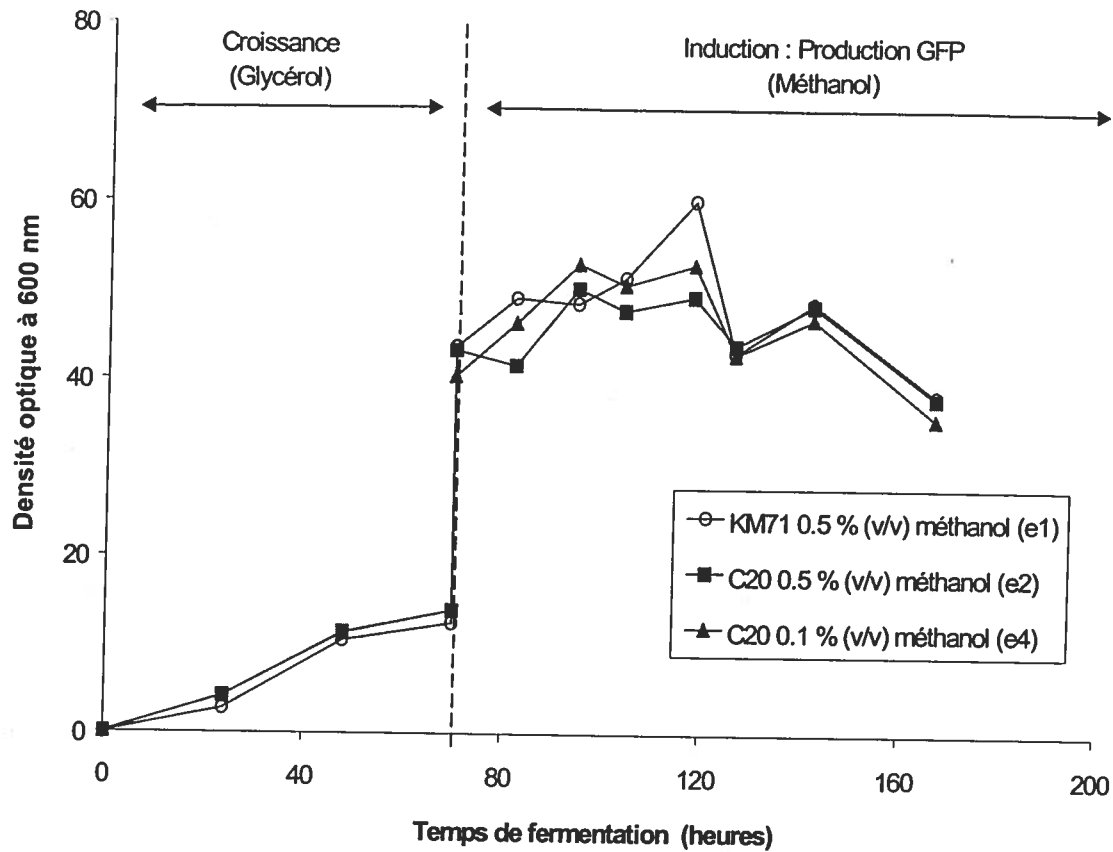
3.2 Fermentations en Erlenmeyers

Trois séries d'expériences en Erlenmeyers agités ont été effectuées. La stratégie d'induction utilisée pour chaque culture en Erlenmeyer est exposée à la section 2.4. du chapitre 2, Matériel et Méthodes (Tableau 2.1). En plus de permettre l'apprentissage des différentes techniques et l'utilisation des instruments de mesure nécessaires pour mener à bien les travaux, les expériences en Erlenmeyers avaient comme buts de :

- ✧ Confirmer la production de GFP en culture liquide par la souche C-20
- ✧ Confirmer la sécrétion de la GFP en culture liquide par cette même souche
- ✧ Vérifier si la stratégie d'alimentation en méthanol pouvait avoir un effet sur la production de GFP
- ✧ Vérifier si l'ajout de glycérol comme second substrat lors de l'induction pouvait avoir un effet sur la croissance et la production de GFP

3.2.1 Comportement de la culture

La fermentation s'effectuait en deux phases distinctes : d'abord une augmentation de la biomasse durant la croissance des cellules sur glycérol (phase 1), puis une production de GFP durant l'alimentation en méthanol, l'inducteur (phase 2). L'évolution de la biomasse était semblable pour toutes les fermentations en Erlenmeyers, sauf celles avec ajouts de glycérol (série E2) (voir section 3.2.4). La Figure 3.2 illustre l'évolution de la biomasse pour la souche KM71 (souche témoin, ne possédant pas le gène de la GFP) ainsi que pour 2 stratégies de culture avec la souche C-20. L'augmentation soudaine de la biomasse entre la phase de croissance et la phase d'induction est due à la concentration d'un facteur trois de la culture cellulaire. En effet, suite à la phase de croissance, les cellules provenant de deux Erlenmeyers contenant 150 mL de milieu BMGY ont été remises en suspension dans un Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu BMMY.



Note : Les courbes «C20 0.5 % (v/v) méthanol (e2)» et «C-20 0.1 % (v/v) méthanol (e4)» sont superposées sur ce graphique pour la période de croissance

Figure 3.2 : Évolution de la biomasse (DO) pour les souches C-20 (avec le gène de la GFP, cultures e2 et e4) et KM71 (sans le gène de la GFP, culture e1) lors de la série d'expériences E1

Bien que le milieu utilisé était initialement tamponné, on a pu observer une augmentation du pH (de 6 à 7) lors de l'induction (Figure 3.3). Cette augmentation a été observée pour toutes les cultures effectuées en Erlenmeyers agités. Le pH n'a été mesuré que pendant la phase d'induction. Le temps de fermentation donné en abscisse à la Figure 3.3 débute à 70 h (temps initial de l'induction).

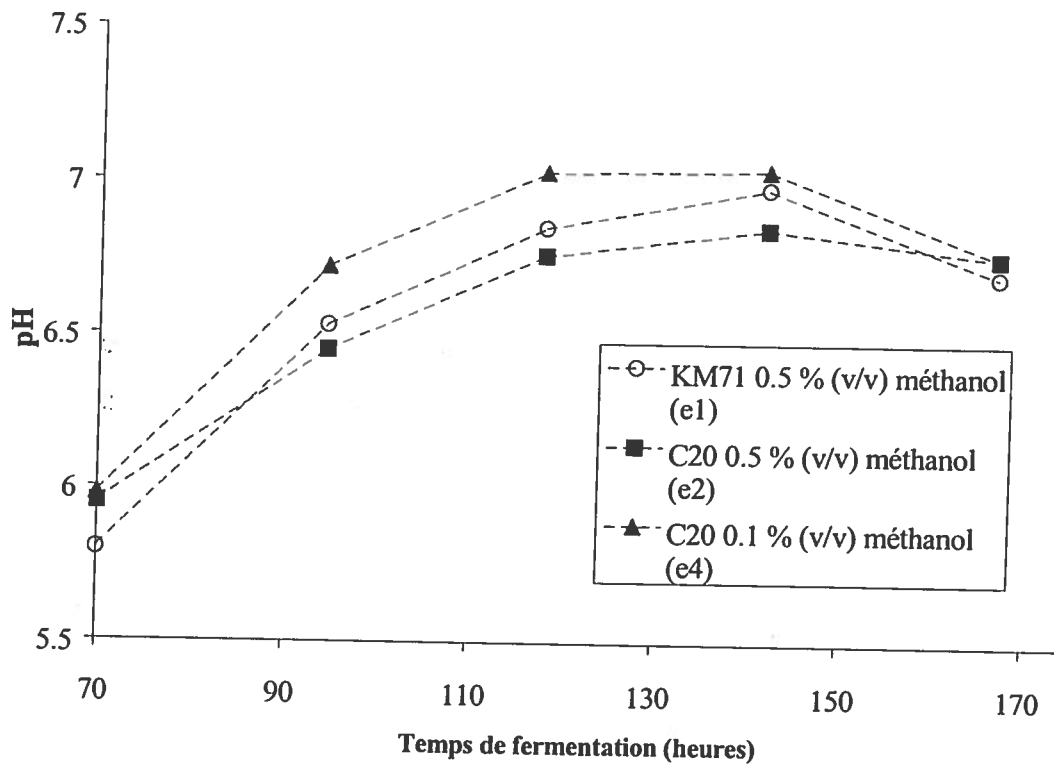


Figure 3.3 : Évolution du pH du milieu de culture pour les souches C-20 (avec le gène de la GFP, cultures e2 et e4) et KM71 (sans le gène de la GFP, culture e1) lors de la période d'induction de la série d'expériences E1

3.2.2 Production de GFP extracellulaire (séries E1 et E3)

Les fermentations en Erlenmeyers ont permis de confirmer que la GFP était bien produite dans notre système. En effet, nous avons observé une augmentation de la fluorescence du surnageant du milieu de culture suite à l'induction au méthanol pour toutes les fermentations employant la souche C-20. Grâce à la relation linéaire entre la fluorescence et la concentration de la GFP, nous pouvons exprimer les données de fluorescence mesurée en concentration de GFP (mg.L^{-1}). La Figure 3.4 présente la moyenne des résultats obtenus pour la concentration en GFP (mesurée par fluorescence) de duplicatas pour une même stratégie d'induction. Contrairement à la souche C-20, la fluorescence du surnageant du milieu de culture de la souche KM71 (utilisée comme contrôle négatif), n'a pas augmenté (Figure 3.4). Cette fluorescence (environ 320 unités) a été utilisée comme témoin et soustraite des autres résultats obtenus avec la souche C-20. L'échelle de temps de la Figure 3.4 débute à 70 h puisque c'est à ce moment que l'alimentation en méthanol a débuté.

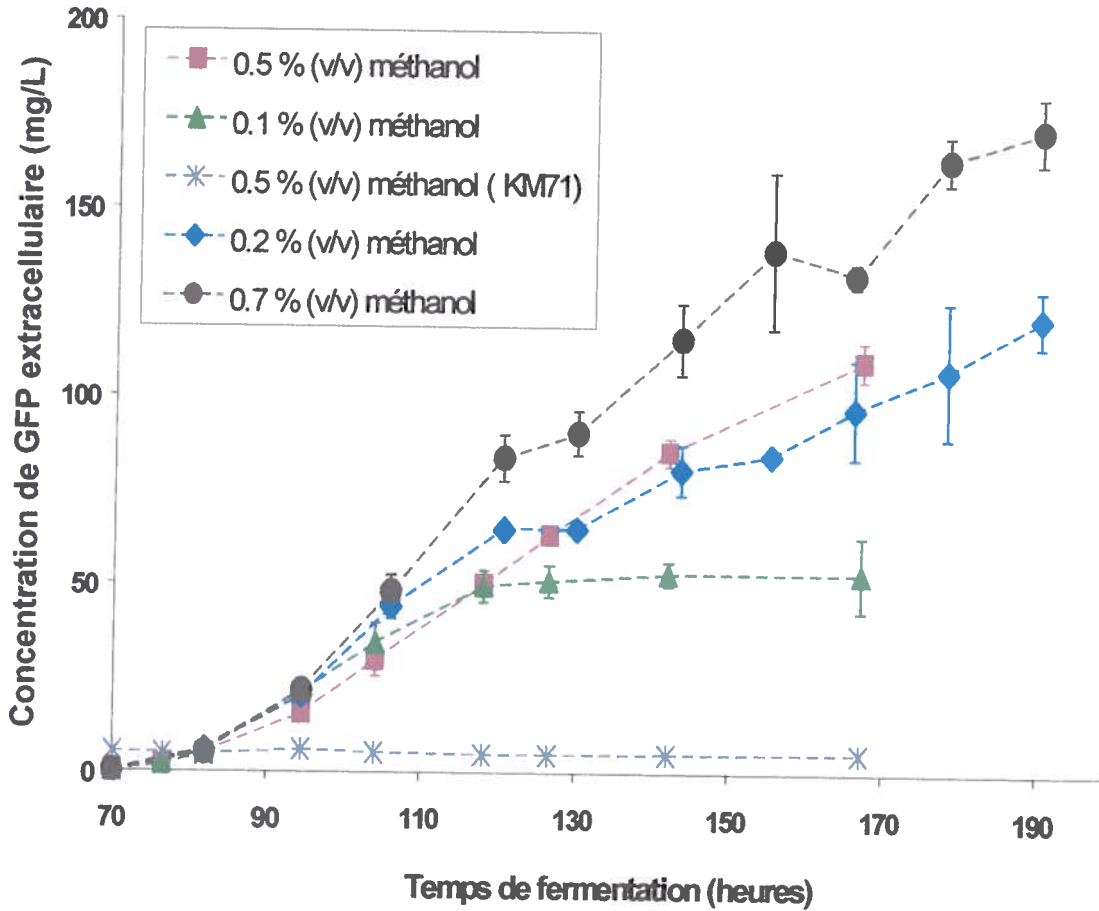


Figure 3.4 : Évolution de la concentration extracellulaire de GFP pour les souches KM71 et C-20 lors des séries d'expériences E1 et E3

Légende :

Temps de fermentation = 70 h : Début de l'induction

0.5 % (v/v) méthanol : Série E1, cultures e2 et e3

0.1 % (v/v) méthanol : Série E1, cultures e4, e5

0.5 % (v/v) méthanol (KM71) : Série E1, culture e1, souche *Pichia pastoris* sans le gène de la GFP

0.2 % (v/v) méthanol : Série E3, cultures e1, e2

0.7 % (v/v) méthanol : Série E3, cultures e3, e4

Barres d'erreur : Déviation standard entre les duplicatas.

Le gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) présenté à la Figure 3.5 confirme la présence de la GFP et la sécrétion de cette protéine dans le milieu extracellulaire. En effet, les bandes qui sont observées proviennent d'échantillons du surnageant de la culture de la souche C-20 prélevés lors de la série d'expériences E1. Grâce au standard de protéines de faible poids moléculaire, nous avons pu constater que la distance de migration de notre protéine correspondait à un poids moléculaire d'environ 27 kDa, ce qui est bien le poids moléculaire de la GFP (Albano *et al.*, 1998 et Cody *et al.*, 1992).

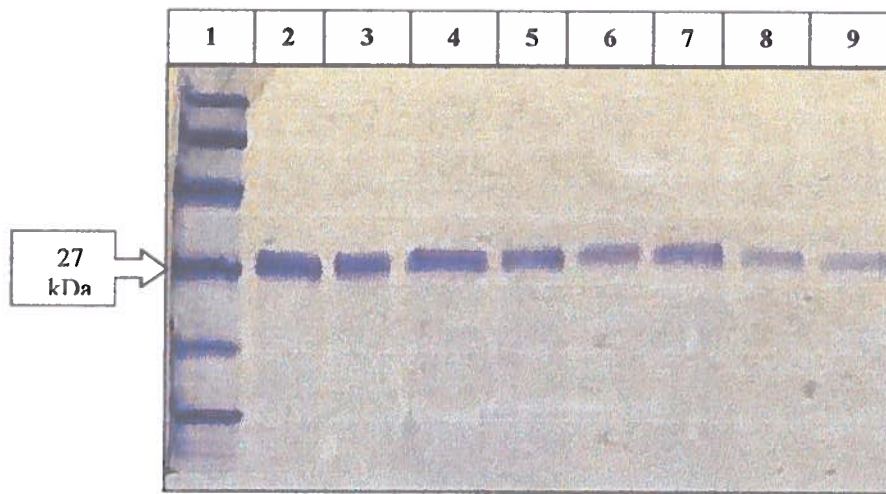


Figure 3.5 : Reproduction d'un gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) du surnageant de culture de la souche C-20 lors de la série d'expériences E1 (1 : Standard de protéines de faibles poids moléculaire, 2 : e2 t = 97 h, 3 : e3 t = 97 h, 4 : e4 t = 97 h, 5 : e5 t = 97 h, 6 : e2 t = 48 h, 7 : e3 t = 48 h, 8 : e4 t = 48 h, 9 : e5 t = 48 h)

3.2.3 Influence du méthanol (séries E1 et E3)

D'après les résultats de la Figure 3.4, on peut observer une variation de la cinétique de production de GFP selon la stratégie d'induction utilisée. Lors de la série d'expériences E1, nous avons alimenté les Erlenmeyers e2 et e3 d'après la stratégie d'induction suggérée par Invitrogen, soit un ajout de méthanol aux 12 h pour maintenir une concentration d'environ 0.5 % (v/v). Dans les faits, la concentration en méthanol a varié entre 0.15 et 0.65 % (v/v). La concentration de méthanol visée pour les Erlenmeyers e4 et e5 était cinq fois inférieure à la concentration visée pour les Erlenmeyers e2 et e3, soit de 0.1 % (v/v). Cette fois, la concentration de méthanol a fluctué entre 0 et 0.12 % (v/v). L'évolution de la concentration en méthanol mesurée par chromatographie en phase gazeuse pour la série d'expériences E1 est présentée à la Figure 3.6. L'échelle de temps de la Figure 3.6 débute à 70 h puisque c'est à ce moment de la fermentation que l'alimentation en méthanol a débuté.

Afin de confirmer l'effet de la stratégie d'induction sur la production de la GFP, nous avons répété les expériences de la série de cultures E1 lors de la série E3 en induisant cette fois deux cultures avec une concentration de 0.2 (0.01-0.3) % (v/v) en méthanol (Erlenmeyers e1 et e2), et deux autres avec une concentration de 0.7 (0.3-1.1) % (v/v) en méthanol (Erlenmeyers e3 et e4). L'évolution de la concentration en méthanol pour cette série d'expériences est présentée à la Figure 3.7. Ces concentrations ont aussi été mesurées par chromatographie en phase gazeuse. D'après la Figure 3.4, la production de GFP était généralement plus rapide et plus élevée lorsque la concentration moyenne en méthanol dans le milieu était aussi plus élevée. L'augmentation de la fréquence d'ajout du méthanol a aussi eu un effet positif sur la production de la GFP. Effectivement, pour les cultures e1 et e2 de la série E3, le méthanol a été ajouté plus fréquemment que lors des cultures e2 et e3 de la série E1. Bien que la concentration moyenne de méthanol visée était plus élevée lors des cultures e2 et e3 de la série d'expériences E1 (0.5 % (v/v) versus 0.2 % (v/v) lors des cultures e1 et e2 de la série d'expériences E3), le profil de production de GFP est pratiquement le même pour ces cultures.

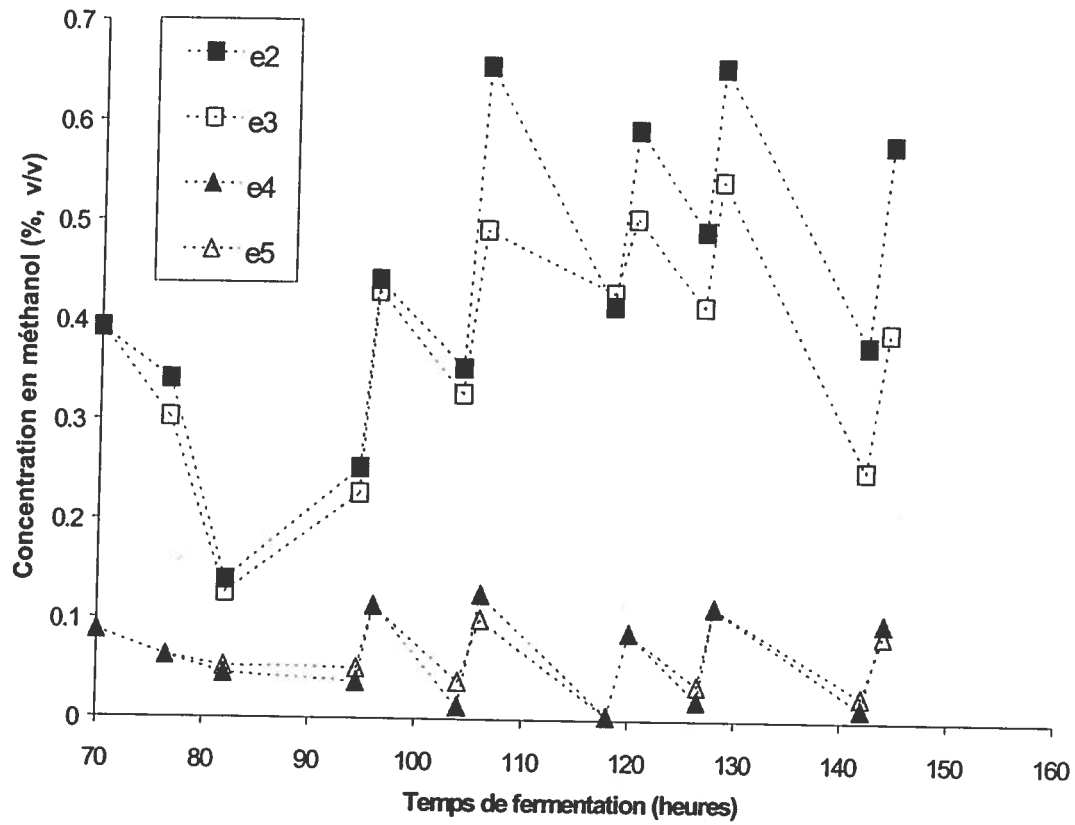


Figure 3.6 : Évolution de la concentration en méthanol des Erlenmeyers de la série d'expériences E1 (70 h = début de l'induction)

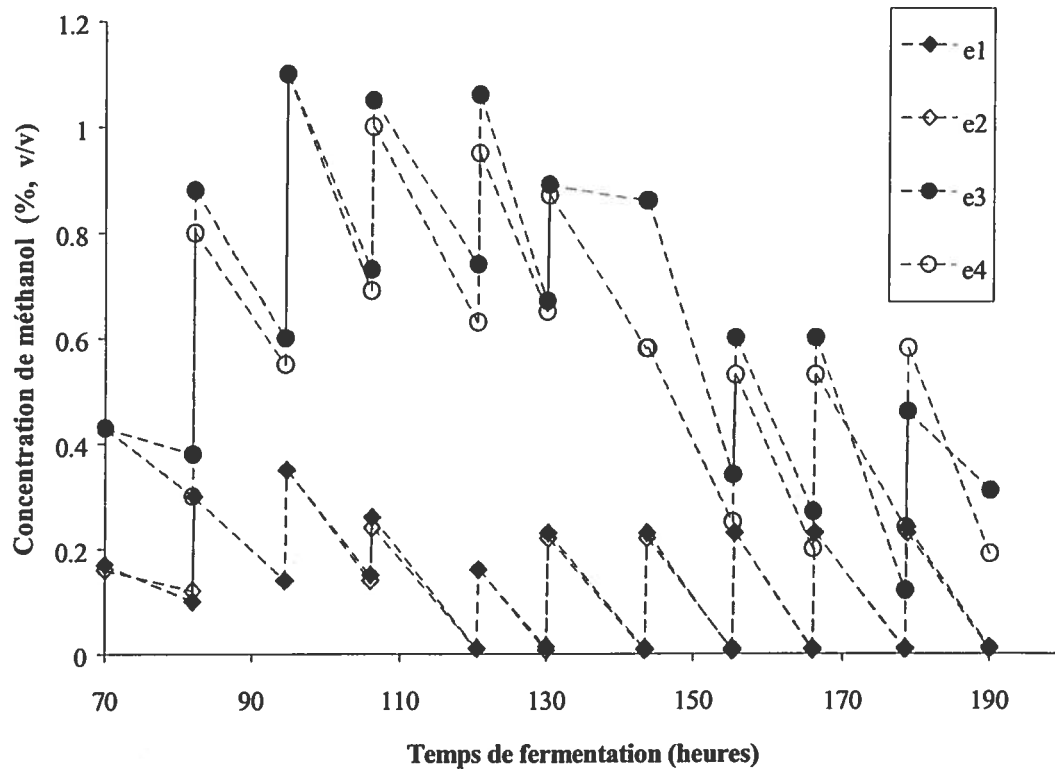


Figure 3.7 : Évolution de la concentration en méthanol des Erlenmeyers de la série d'expériences E3 (70 h = début de l'induction)

Le Tableau 3.1 présente les résultats de production de GFP obtenus lors des séries d'expériences E1 et E3. Les symboles utilisés dans ce tableau ont les significations suivantes : $Y_{p/s}$ est le rendement final (Y pour «Yield») en GFP extracellulaire obtenue (p pour produit, GFP en mg) sur le méthanol total ajouté (s pour substrat, méthanol en g) et la $[GFP_{extra}]_{max}$ est la concentration de GFP extracellulaire maximale obtenue ($mg.L^{-1}$). La $GFP_{spéc} max$ est la quantité de GFP extracellulaire maximale (mg) obtenue par quantité de biomasse finale obtenue (poids sec final, en g).

Tableau 3.1 : Quantités de GFP et rendements obtenus pour les cultures en Erlenmeyers lors des séries d'expériences E1 et E3

	E1				E3			
	e2	e3	e4	e5	e1	e2	e3	e4
Méthanol (% v/v)	0.15-0.65		0-0.12		0.01-0.3		0.3-1.1	
$Y_{p/s}$ ($mg.g^{-1}$)	8.2	6.4	13	11	8.7	7.9	7.7	7.2
$[GFP_{extra}]_{max}$ ($mg.L^{-1}$)	113	106	59	45	126	116	178	165
$GFP_{spéc} max$ ($mg.g^{-1}$)	4.1	5.4	3.4	1.8	2.4	2.6	3.5	2.7
Méthanol total (g)	1.4	1.6	0.5	0.4	1.5	1.5	2.3	2.3

Légende :

$Y_{p/s}$: ($mg.g^{-1}$) : Quantité finale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité totale de méthanol ajoutée (g)

$GFP_{extra} max$: Concentration maximale de GFP extracellulaire obtenue dans le milieu de culture ($mg.L^{-1}$)

$GFP_{spéc} max$: Quantité maximale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité de biomasse finale obtenue (g)

Méthanol total : Quantité totale de méthanol ajoutée (g)

3.2.4 Influence du glycérol (série E2)

Typiquement, la quantité de glycérol utilisée pour les cultures en Erlenmeyers contenant 150 mL de milieu BMGY était de 1.5 g, soit 10 g.L^{-1} . Pour la série d'expériences E2, nous avons testé l'effet de l'ajout de glycérol durant l'induction sur des cultures alimentées avec une faible concentration en méthanol (0.1 %, v/v). Nous avons ajouté à quatre reprises du glycérol à deux des Erlenmeyers (e3 et e4) afin de voir si la fluorescence (concentration de GFP) pouvait augmenter à nouveau suite à l'obtention d'un plateau de fluorescence. Les deux autres cultures en Erlenmeyers (e1 et e2) ont été utilisées comme témoin et alimentées avec la même quantité de méthanol que les cultures e3 et e4, soit 0.1 % (v/v), mais sans recevoir d'ajout de glycérol. Un premier ajout de 100 μL a été effectué dès que la fluorescence a semblé atteindre un plateau, soit après 125 h de fermentation (Figure 3.8). À trois autres reprises, 200 μL de glycérol ont été ajoutés à la culture des Erlenmeyers e3 et e4, soit après 142 h, 149 h et 165 h de fermentation. La fréquence d'ajout et la quantité de glycérol ont été décidées de manière arbitraire. Nous avons observé une augmentation de la biomasse (en moyenne, 8 unités de DO après le troisième ajout de glycérol) dans les échantillons provenant des Erlenmeyers alimentés en glycérol (Figure 3.9). Toutefois, après le troisième ajout de glycérol, les cellules des Erlenmeyers alimentés en glycérol (e3 et e4) ne semblaient plus utiliser le méthanol. Effectivement, entre 148 h et 155 h, la concentration en méthanol (mesurée par chromatographie en phase gazeuse, Figure 3.10) du milieu de culture des Erlenmeyers e3 et e4 (avec glycérol) a diminué, en moyenne, de 0.02 % (v/v) (1/5 de la concentration à $t = 148 \text{ h}$) alors que la concentration en méthanol du milieu de culture des Erlenmeyers e1 et e2 (sans glycérol) a diminué, en moyenne, de 0.1 % (v/v) (pratiquement 100 % de la concentration à $t = 148 \text{ h}$). L'échelle de temps des Figure 3.8 et 3.10 débute à 70 h puisque c'est à partir de ce moment que le méthanol a été ajouté aux cultures pour induire la production de GFP. Le Tableau 3.2 présente les résultats obtenus pour les cultures en Erlenmeyers de la série d'expériences E2 avec et sans ajouts de glycérol.

Tableau 3.2 : Quantités de GFP extracellulaire et rendements obtenus pour les cultures en Erlenmeyers lors de la série d'expériences E2

	Sans ajout de glycérol		Avec ajouts de glycérol	
	e1	e2	e3	e4
Y p/s (mg.g ⁻¹)	15	11	18	17
[GFP_{extra}] max (mg.L ⁻¹)	75	57	89	83
GFP_{spéc} max (mg.g ⁻¹)	2.35	1.87	2.31	2.12

Légende :

Y p/s (mg.g⁻¹) : Quantité finale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité totale de méthanol ajoutée (g)

[GFP_{extra}] max : Concentration maximale de GFP extracellulaire obtenue dans le milieu de culture (mg.L⁻¹)

GFP_{spéc} max : Quantité maximale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité de biomasse finale obtenue (g de poids sec)

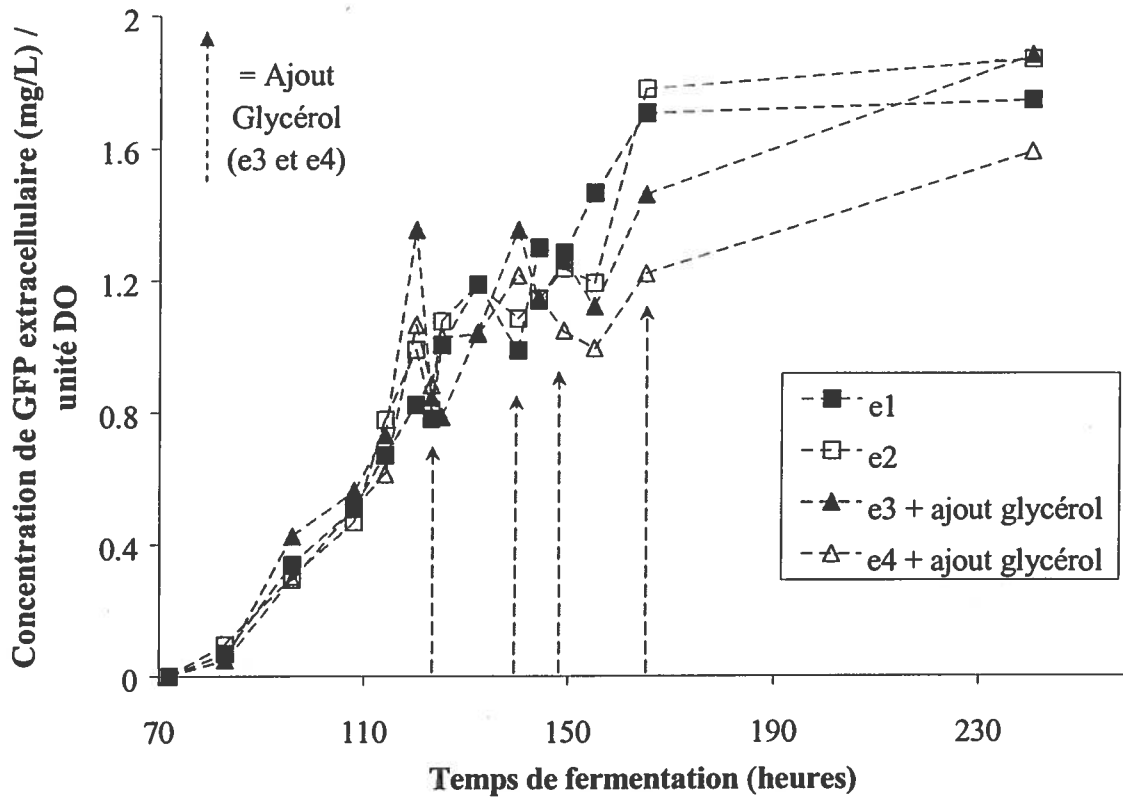


Figure 3.8 : Évolution de la concentration spécifique (par unité de DO) de GFP extracellulaire lors des expériences de la série E2 pendant la phase d'induction (70 h = début de l'induction)

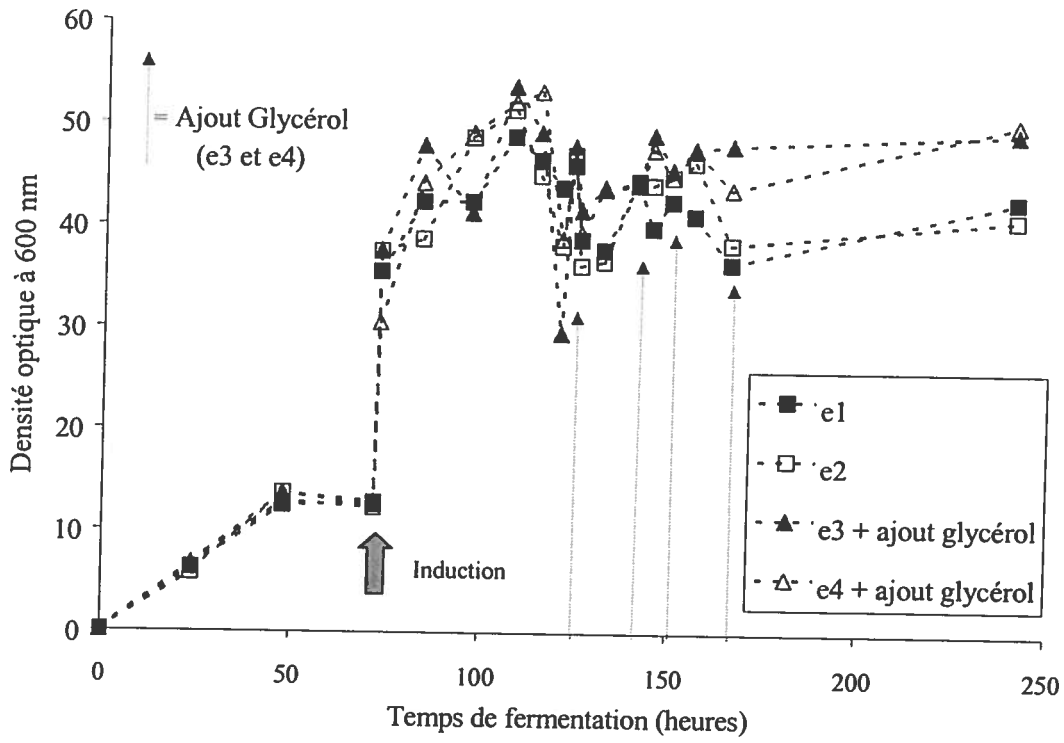


Figure 3.9 : Évolution de la biomasse (DO) lors de la série d'expériences E2
 (l'augmentation de la biomasse entre la phase de croissance et la phase d'induction est due à la concentration des cellules d'un facteur 3)

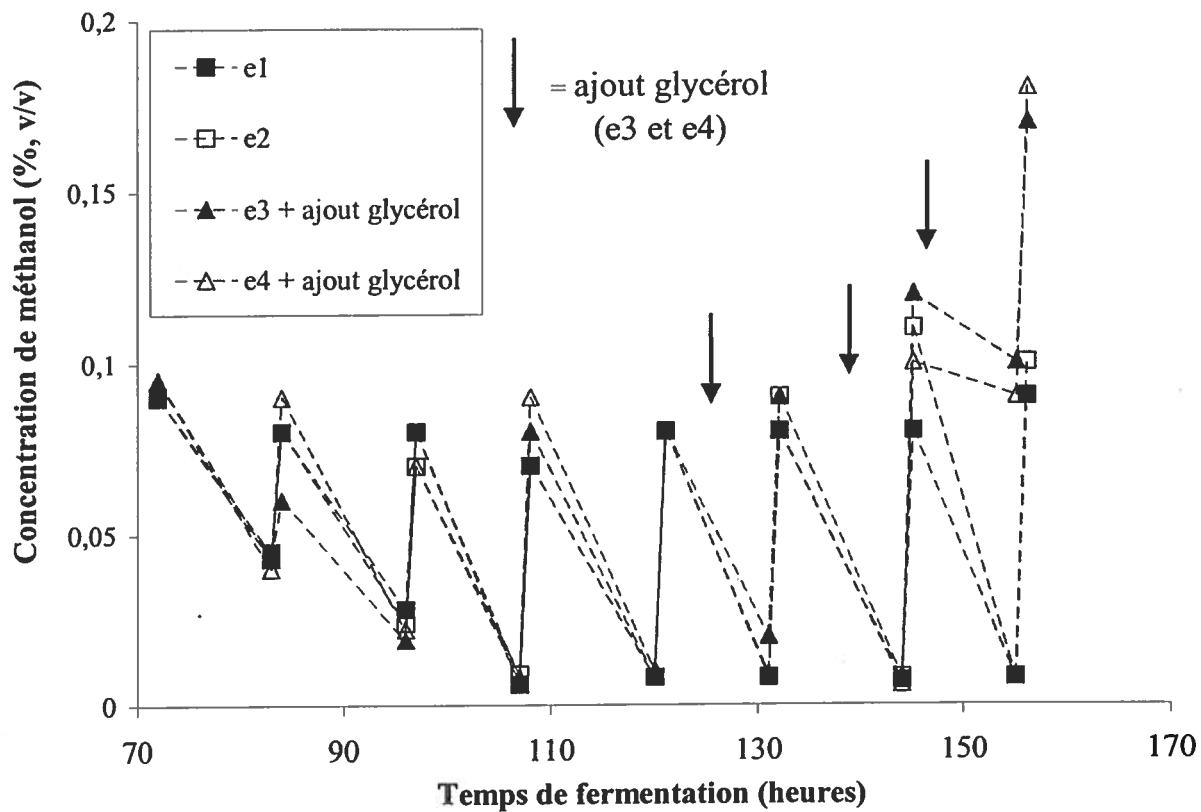


Figure 3.10 : Évolution de la concentration en méthanol lors de la série d'expériences E2 pendant la phase d'induction (70 h = début de l'induction)

3.3 Fermentations en bioréacteur

Cette section décrit les résultats obtenus pour les huit fermentations en bioréacteur de 20 L. Ces fermentations ont été identifiées F1 à F8, selon leur ordre chronologique. Malgré l'utilisation de différentes stratégies d'alimentation en méthanol, certains résultats étaient semblables pour les huit fermentations. Nous présenterons les résultats typiques pour les 8 fermentations dans la section 3.3.1, alors que les résultats nous permettant de comparer les différentes stratégies d'induction seront traités dans la section 3.3.2.

Afin de quantifier le degré d'incertitude sur les différentes analyses, nous avons effectué un test d'échantillonnage lors de la première fermentation en bioréacteur (F1). L'erreur sur toutes les mesures était inférieure à 3.5 %. Les résultats de ce test d'échantillonnage sont présentés à l'Appendice D.

Dès la première fermentation, nous avons été confrontés à un problème d'évaporation du méthanol influençant nos mesures de la consommation de méthanol. Nous avons décidé de ne pas considérer cet aspect pour les calculs des rendements dans le cadre de ce projet. Toutefois, des expériences ont été effectuées pour quantifier ce phénomène. Ces expériences démontrent que l'évaporation du méthanol en Erlenmeyers était négligeable dans les conditions utilisées pour ce projet. En effet, avec une concentration initiale de 0.5 % (v/v) de méthanol dans le milieu de culture, nous avons observé moins de 0.1 % (v/v), soit moins d'un cinquième de la concentration de départ, d'évaporation du méthanol après 100 h d'opération. Cependant, l'évaporation de cet alcool en bioréacteur avec les conditions typiquement utilisées pour ce projet était plus importante. Pour une concentration en méthanol de départ de 0.8 % (v/v), plus de la moitié du méthanol s'était évaporé après 60 h d'opération. Ces résultats sont présentés à l'Appendice F.

Dans le but de faire l'essai d'une alimentation utilisant une très faible concentration de méthanol, nous avons mis en place une stratégie de contrôle nous permettant de

garder une concentration fixe de cet alcool dans le milieu de culture. Ce système fut développé avec l'aide de Mario Béland (Ingénieur en contrôle de procédés, Usine Pilote, CNRC-IRB). Les paramètres de la stratégie de contrôle et du système utilisés sont énumérés à l'Appendice C.

3.3.1 Caractéristiques communes des huit fermentations

Afin de comparer uniquement l'influence de l'alimentation en méthanol sur la production de la GFP, nous avons gardé tous les autres paramètres de fermentation aussi constants que possible. Aucune contamination bactérienne n'a été observée lors de ces fermentations.

3.3.1.1 Cinétique de croissance

La vitesse de consommation du glycérol ainsi que l'augmentation de la biomasse durant la phase 1 (croissance sur glycérol) étaient presque identiques pour les huit fermentations. Comme exemple, la Figure 3.11 présente les résultats obtenus pour la fermentation F3. Nous avons eu des problèmes avec la sonde de méthanol lors de cette fermentation, c'est pourquoi la concentration en méthanol fluctue à la Figure 3.11. La concentration en méthanol mesurée par chromatographie en phase gazeuse pour cette fermentation est présentée à l'Appendice G. Nous avons mesuré le taux de croissance de la souche C-20 sur glycérol pour la fermentation F3. Puisque les conditions de la phase de croissance sur glycérol (phase 1) n'ont pas varié d'une fermentation à l'autre, ce taux de croissance devrait être le même pour les 7 autres fermentations.

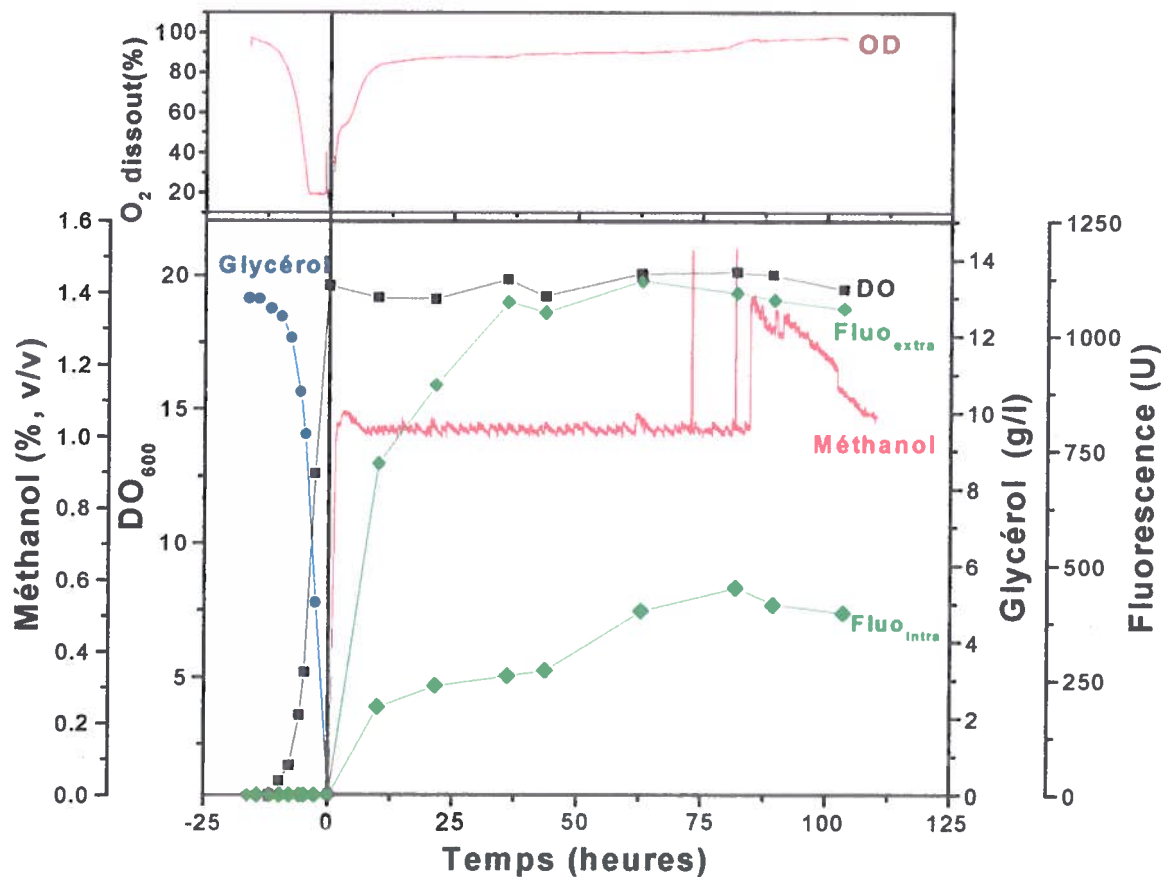


Figure 3.11 : Évolution de la concentration en glycérol (g.L^{-1}), de la biomasse (DO), de la concentration en méthanol (% v/v), de l'oxygène dissout (%) (100 % = environ 10 000 ppm) et de la fluorescence extracellulaire (U) et intracellulaire (U) pour la fermentation F3. L'induction débute au temps $t = 0$ h.

Afin de déterminer le taux de croissance maximal sur glycérol, nous avons fait une interpolation exponentielle des points en phase de croissance en excluant la phase de latence. Le taux de croissance qui a été obtenu est :

$$\mu = 0.28 \text{ h}^{-1}$$

Nous pouvons donc calculer le temps de dédoublement cellulaire (t_d) (ou temps de génération) sur glycérol par la formule suivante :

$$t_d = (\text{Ln } 2) / \mu = 2.45 \text{ h pour 1 dédoublement.}$$

3.3.1.2 Évolution de l'oxygène dissout et des gaz de sortie du fermenteur

Lors de la croissance sur glycérol, nous avons observé une baisse rapide de la fraction molaire en O_2 ainsi qu'une hausse de la fraction molaire en CO_2 dans les gaz de sortie du fermenteur (Figure 3.12). Ces résultats étant similaires pour les 8 fermentations, uniquement les données obtenues lors de la fermentation F3 sont présentées à la Figure 3.12. À partir du moment où le méthanol a été ajouté, la concentration d' O_2 a augmenté dans les gaz de sortie alors que la concentration de CO_2 a diminué. Nous avons observé des résultats semblables pour la concentration d'oxygène dissout dans le milieu de culture suivant l'ajout du méthanol (Figure 3.11).

La Figure 3.13 présente le pic d'oxygène dissout typiquement observé à la fin de la phase de croissance sur glycérol pour toutes les fermentations. Cette figure est un agrandissement de la période de croissance de la fermentation F5 au moment de l'apparition du pic d'oxygène en question (entre 14 h et 15 h post-inoculation). L'observation du pic d'oxygène dissout permet d'assumer que le glycérol a été entièrement consommé et que nous pouvons débiter l'alimentation en méthanol. La cinétique de consommation du glycérol étant similaire pour les 7 autres fermentations, le pic d' O_2 dissout est apparu au même moment que celui de la fermentation F5 pour les fermentations F1 à F8.

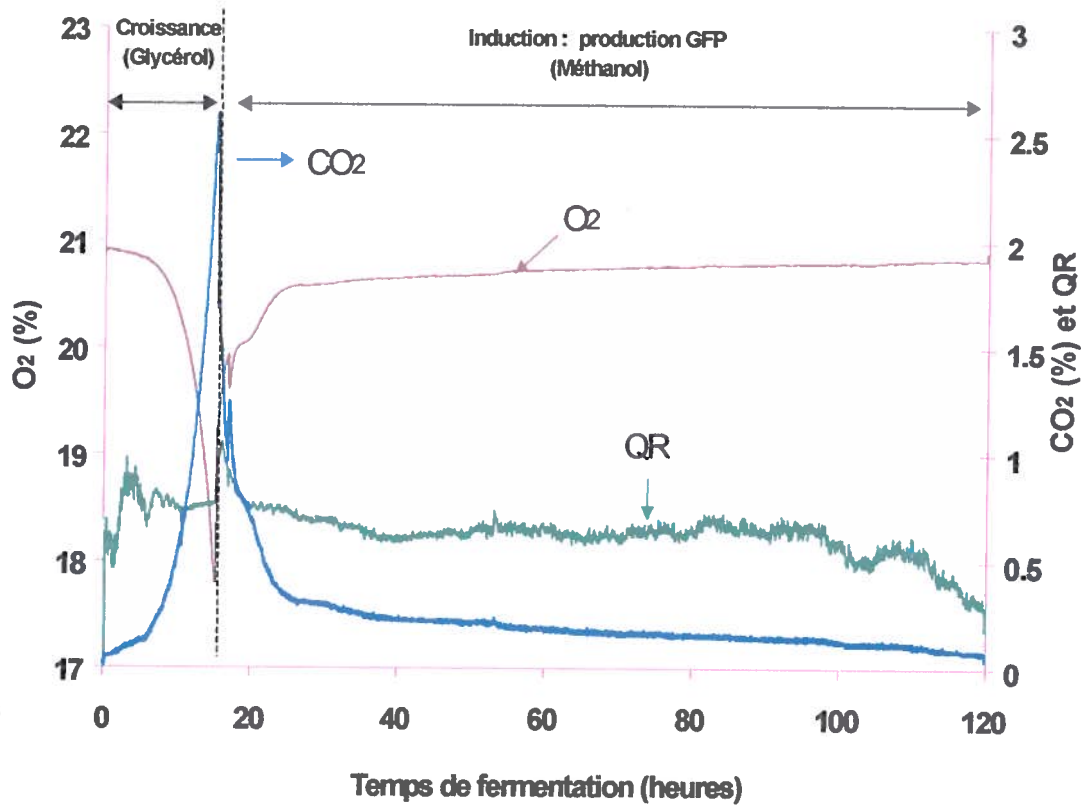


Figure 3.12 : Évolution des gaz de sortie (exprimés en % de fraction molaire d'O₂ et de CO₂) et du quotient respiratoire (QR = moles de CO₂ produites/moles d'O₂ consommées) pour la fermentation F3

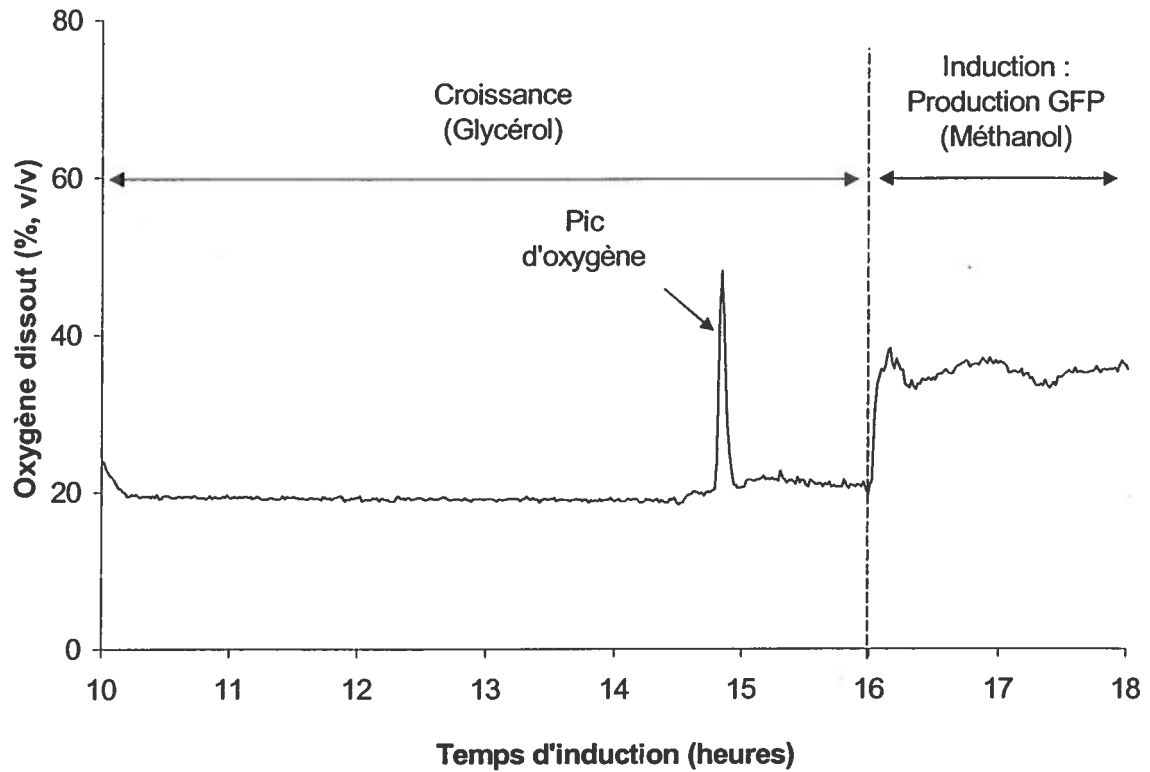


Figure 3.13 : Pic d'oxygène dissout indiquant l'épuisement en glycérol à la fin de la phase de croissance (fermentation F5, en exemple)

3.3.1.3 Comparaison Erlenmeyers-bioréacteur

La concentration maximale de GFP extracellulaire, $[GFP_{extra}]_{max}$, obtenue en Erlenmeyer était d'environ 178 mg.L^{-1} (culture e3 de la série d'expériences E3) alors qu'en bioréacteur, la concentration maximale obtenue était d'environ 19 mg.L^{-1} (Fermentation F1). Le Tableau 3.3 présente les rendements pour une même stratégie d'induction (concentration de méthanol visée d'environ 0.5 %, v/v, avec ajout aux 12 heures) en Erlenmeyers (culture e2 de la série E1) et en bioréacteur (Fermentation F1).

Tableau 3.3 : Quantités de GFP extracellulaire et rendements obtenus lors des cultures en Erlenmeyers et en bioréacteur.

	Erlenmeyers e2 (série E1)	Bioréacteur F1
$Y_{p/s}$ (mg.g^{-1})	8.2	0.83
$[GFP_{extra}]_{max}$ (mg.L^{-1})	113	19
$GFP_{spéc. max}$ (mg.g^{-1})	4.1	1.66

Légende :

$Y_{p/s}$: (mg.g^{-1}) : Quantité finale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité totale de méthanol ajoutée (g)

$[GFP_{extra}]_{max}$: Concentration maximale de GFP extracellulaire obtenue dans le milieu de culture (mg.L^{-1})

$GFP_{spéc. max}$: Quantité maximale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité de biomasse finale obtenue (g de poids sec)

3.3.1.4 Mesure de la sécrétion de la GFP

Lors des cultures en bioréacteur, nous nous sommes intéressés à la sécrétion de la GFP que nous n'avions pas mesurée lors des cultures en Erlenmeyers. Afin de mesurer rapidement la proportion de la GFP qui n'était pas sécrétée dans le surnageant, nous avons émis l'hypothèse suivante :

$$FT = FI + FE$$

Où : FT = Fluorescence totale de la culture (cellules + surnageant)

FI = Fluorescence intracellulaire (cellules)

FE = Fluorescence extracellulaire (surnageant)

Pour ce faire, lors de la première fermentation (F1), nous avons mesuré la fluorescence totale (FT), la fluorescence du surnageant (FE) ainsi que la fluorescence des cellules (FI) resuspendues dans une solution saline de même volume que le surnageant rejeté. Le Tableau 3.4 présente les résultats obtenus.

Tableau 3.4 : Mesure de la fluorescence totale (FT), de la fluorescence extracellulaire (FE) et de la fluorescence intracellulaire (FI) lors de la première fermentation en bioréacteur (F1)

Temps de fermentation	FT	FE	FT - FE	FI	Différence entre FT-FE et FI	Erreur (%)
22h49	739	522	217	193	24	± 6
65h15	1189	949	240	256	16	± 3
89h44	1500	1106	394	366	28	± 4
115h29	1684	1199	485	503	18	± 2
141h42	1939	1261	678	575	103	± 9

Les différences entre les mesures de fluorescence obtenues directement (FI) et celles calculées (FT - FE) ont varié entre ± 2 % et ± 9 %. Pour des raisons de simplicité, nous avons employé la méthode dite calculée (FI = FT-FE) pour mesurer la fluorescence intracellulaire lors des expériences subséquentes.

3.3.2 Comparaison entre différentes stratégies d'alimentation en méthanol

3.3.2.1 Production de GFP extracellulaire

Dans cette section, nous comparons selon plusieurs approches les résultats de production et de sécrétion de la GFP obtenus lors des huit fermentations. Chaque stratégie d'alimentation en méthanol a été effectuée au moins deux fois. Toutefois, les résultats de fluorescence n'étaient pas toujours identiques pour deux fermentations utilisant la même stratégie d'induction. Cet aspect sera discuté dans le prochain chapitre (Chapitre 4, Discussion). Les résultats sont présentés en terme de fluorescence extracellulaire de la culture, et non de fluorescence spécifique (par unité de DO), puisque la densité optique obtenue pour les 8 fermentations était à peu près la même (± 2 unités de DO). L'évolution de la concentration en méthanol pour les fermentations F1 à F8 est exposée à l'Appendice G.

La Figure 3.14 illustre l'évolution de la concentration en GFP extracellulaire obtenue pour les 8 fermentations effectuées. Selon cette figure, nous pouvons constater que l'évolution de la production de GFP dans le temps a varié en fonction de la stratégie d'alimentation en méthanol utilisée. Cette stratégie a eu un effet sur la quantité totale de GFP produite, mais aussi sur la vitesse de la production de GFP. En effet, à partir du moment où le méthanol a été ajouté (autour de 15 à 16 h, selon la fermentation), la concentration de GFP a augmenté plus rapidement pour les cultures utilisant une concentration initiale de méthanol de 1 % (v/v) que pour les cultures utilisant une concentration initiale de méthanol de 0.5 % (v/v) ou de 0.1 % (v/v). La concentration maximale de GFP obtenue dans le milieu de culture, $[GFP_{extra}]_{max}$, était similaire pour les fermentations utilisant une concentration initiale de méthanol de 1 % et de 0.5 % (v/v) (de 12 à 19 mg/L^{-1}), mais beaucoup plus faible pour la stratégie d'alimentation utilisant une concentration de méthanol contrôlée dans le milieu de culture à 0.1 % (v/v) (de 4.2 à 5.1 mg/L^{-1}).

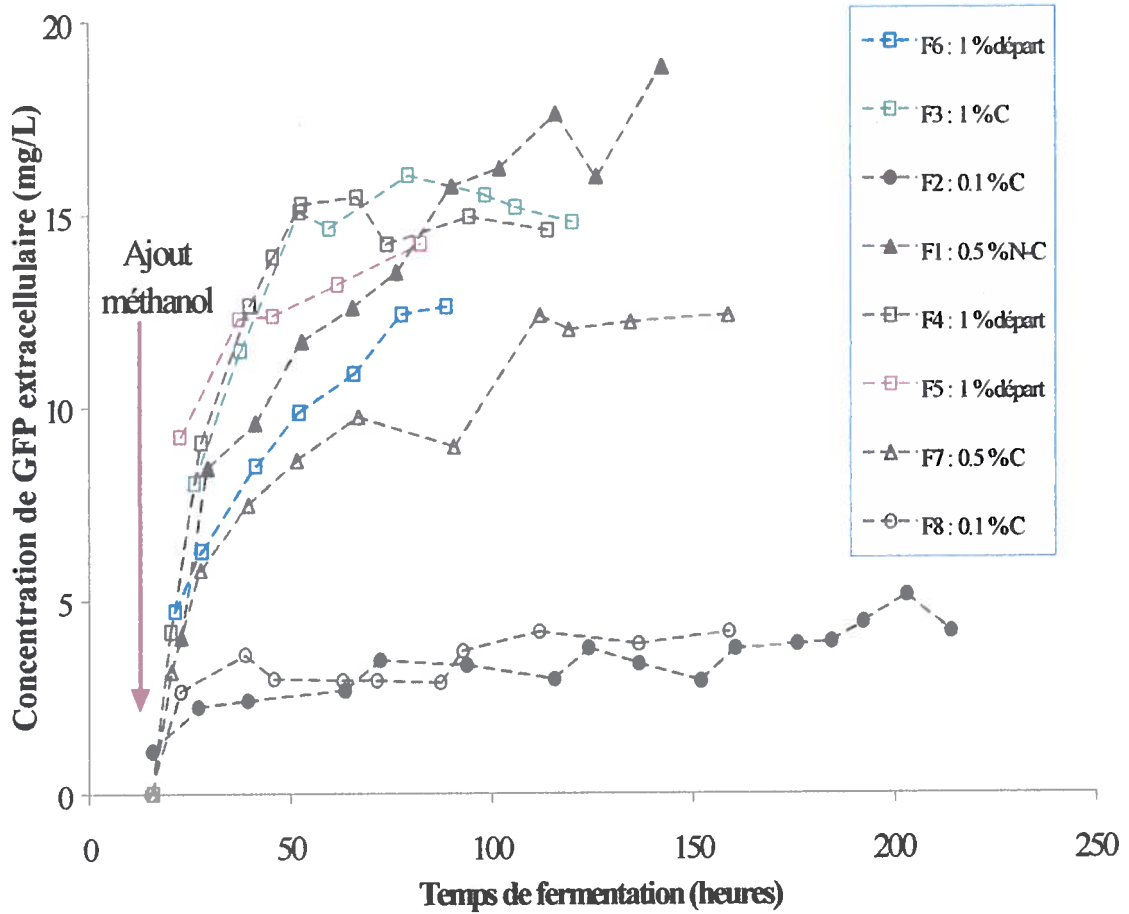


Figure 3.14 : Évolution de la concentration en GFP extracellulaire pour les 8 fermentations en bioréacteur de 20 L

Légende :

C : Concentration en méthanol contrôlée dans le milieu de culture (v/v)

N-C : Concentration en méthanol non contrôlée dans le milieu de culture (v/v)
(ajout deux fois par jour)

1 % départ : Concentration initiale de méthanol ajoutée de 1 % (v/v)

Pour comparer l'effet de la stratégie d'alimentation en méthanol, la quantité maximale de GFP extracellulaire obtenue ($GFP_{\text{extra max}}$), le nombre d'heures nécessaires pour obtenir cette quantité ainsi que la quantité de méthanol utilisée pour chaque fermentation sont présentés à la Figure 3.15. La quantité maximale de GFP extracellulaire a été obtenue lors de la première fermentation, c'est à dire lorsque nous avons ajouté du méthanol deux fois par jour pour obtenir une concentration moyenne de 0.5 % (v/v). Cependant, la plus courte durée pour obtenir une quantité maximale de GFP a été obtenue lors de la fermentation F4, soit en effectuant un seul ajout initial de méthanol à 1 % (v/v).

À partir de ces résultats bruts, nous avons effectué certains calculs afin de comparer les indicateurs nous permettant d'opter pour la stratégie d'alimentation qui répond le mieux à nos objectifs. Les indicateurs suivants sont présentés à la Figure 3.16 : le rendement maximal en GFP ($Y_{p/s}$) et la productivité volumétrique maximale ($P_{p/t}$). Les rendements les plus élevés ont été obtenus lors des fermentations F4, F5 et F6 (ajout unique de 1 %, v/v de méthanol) alors que les productivités les plus élevées ont été obtenues lors des fermentations pour lesquelles la concentration initiale de méthanol utilisée était de 1 % (v/v), soit F3, F4, F5 et F6 (concentration de méthanol contrôlée (F3) ou pas (F4, F5, F6)).

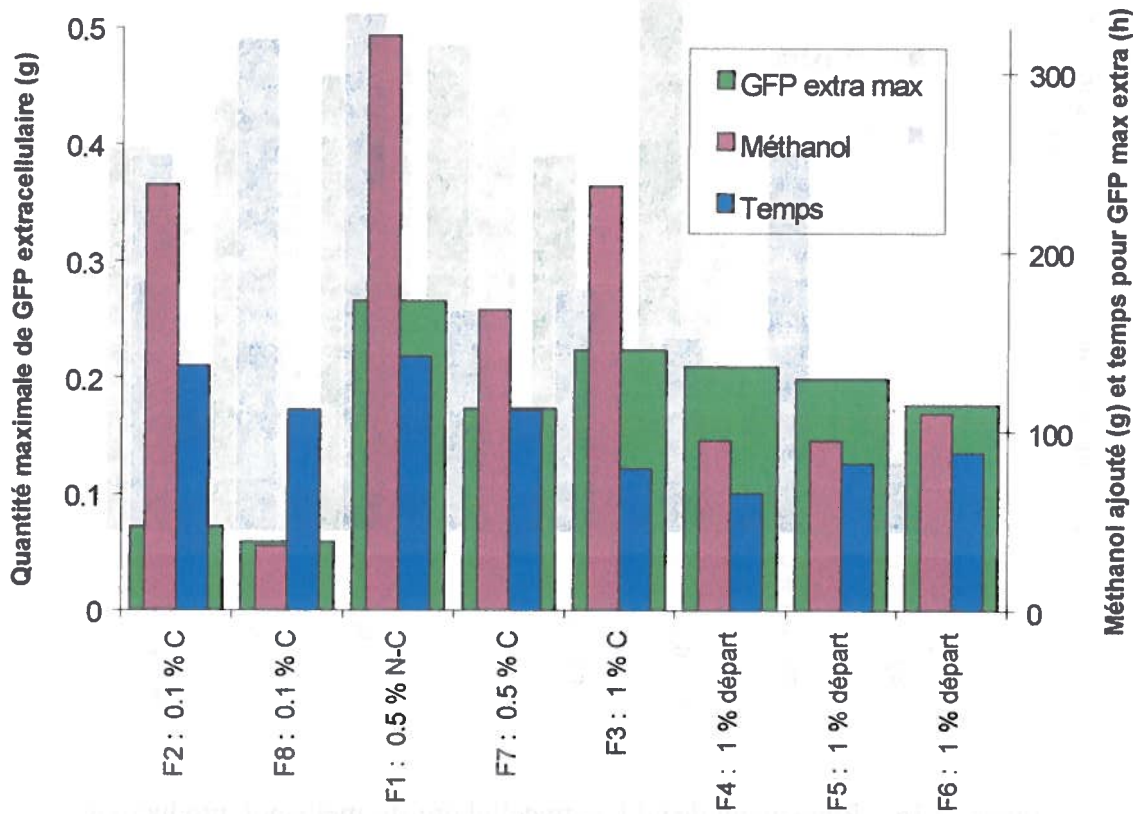


Figure 3.15 : Quantité maximale de GFP extracellulaire (g) obtenue, quantité de méthanol ajoutée (g) et temps requis pour l'obtention de la quantité maximale de GFP extracellulaire (h) selon la stratégie d'alimentation en méthanol employée (fermentations F1 à F8)

Légende :

C : Concentration en méthanol contrôlée dans le milieu de culture (v/v)

N-C : Concentration en méthanol non contrôlée dans le milieu de culture (v/v)

(ajout deux fois par jour)

1 % départ : Concentration initiale de méthanol ajoutée de 1 % (v/v)

GFP_{extra} max : Quantité maximale de GFP extracellulaire obtenue (g) pour une cuvée de 14 L

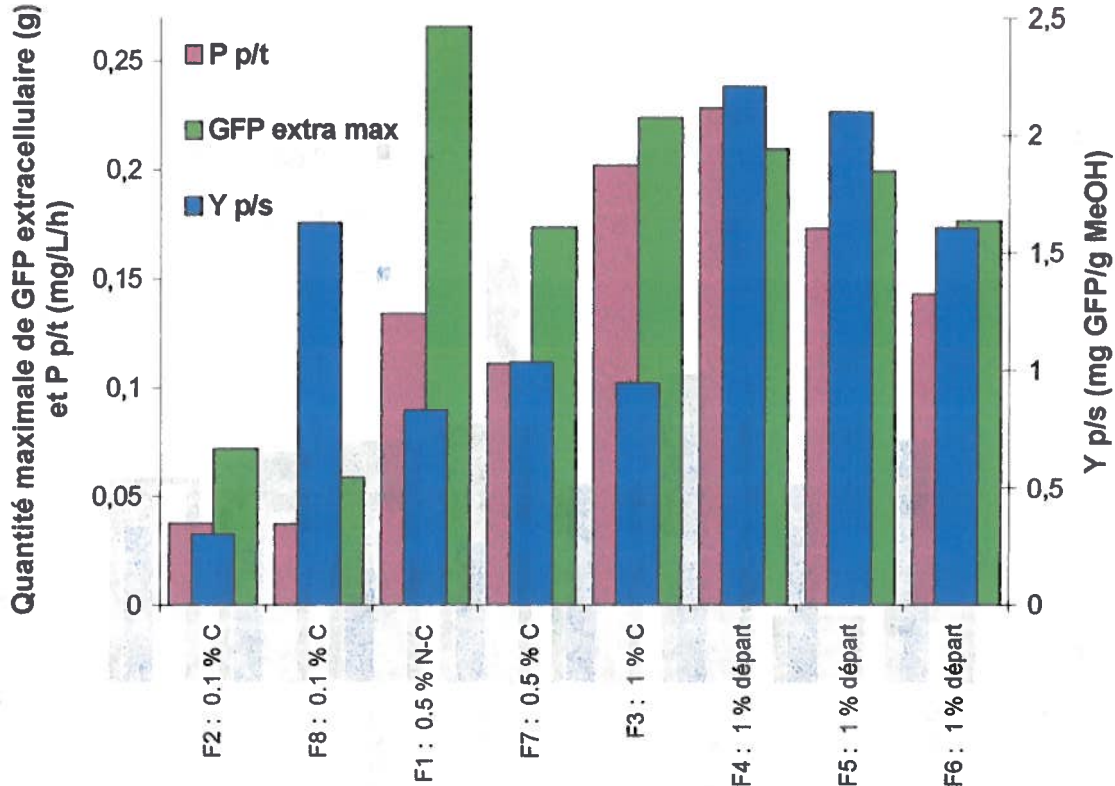


Figure 3.16 : Rendement de GFP extracellulaire sur méthanol, productivité volumétrique et quantité maximale de GFP (g) extracellulaire obtenue selon la stratégie d'alimentation en méthanol employée (fermentations F1 à F8)

Légende :

C : Concentration en méthanol contrôlée dans le milieu de culture (v/v)

N-C : Concentration en méthanol non contrôlée dans le milieu de culture (v/v)

1 % départ : Concentration initiale de méthanol ajoutée de 1 % (v/v)

Y p/s : ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) : Quantité finale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité totale de méthanol ajoutée (g)

GFP_{extra max} : Quantité maximale de GFP extracellulaire obtenue (g) pour une cuvée de 14 L

P p/t : Productivité (P) volumétrique où p (produit) est la quantité maximale de GFP obtenue ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) et t (temps) le temps de fermentation pour obtenir cette quantité (h)

3.3.2.2 Efficacité de sécrétion

Selon les stratégies d'alimentation en méthanol utilisées, nous avons obtenu différentes efficacités de sécrétion. Pour mesurer cette efficacité, la concentration de GFP extracellulaire (ou fluorescence du surnageant) a été divisée par la concentration de GFP totale (ou fluorescence du milieu de culture) x 100. La Figure 3.17 présente l'efficacité de sécrétion moyenne obtenue et la quantité totale de méthanol employée pour chaque fermentation. On peut constater que l'efficacité de sécrétion maximale, soit 73-77 %, a été obtenue lors de l'ajout initial de méthanol de 1 % (v/v) (F4, F5, F6).

Enfin, le Tableau 3.5 est un sommaire qui regroupe les principaux résultats obtenus pour les huit fermentations. Les résultats les plus élevés pour chaque indicateur ($Y_{p/s}$ et $P_{p/t}$) sont trouvés dans les zones ombragées.

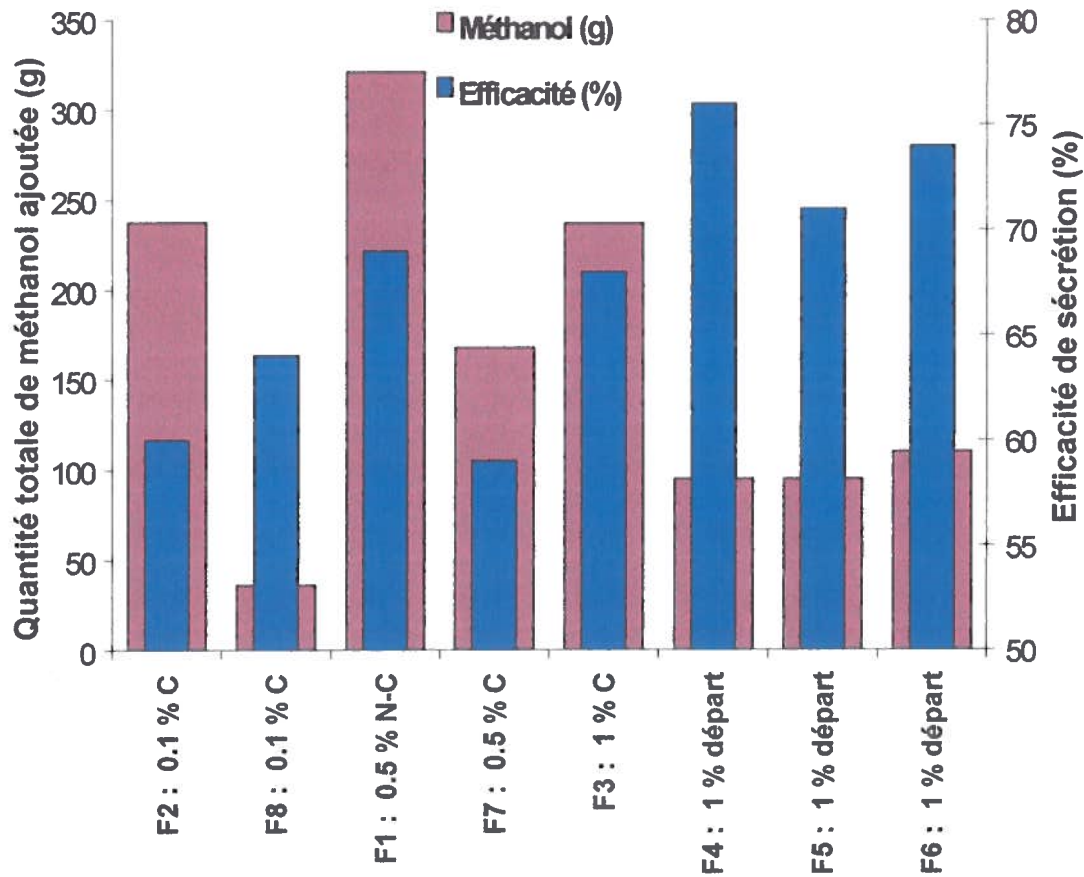


Figure 3.17 : Efficacité moyenne de sécrétion (%) pour les fermentations F1 à F8 et quantité totale de méthanol ajoutée (g)

Légende :

C : Concentration en méthanol contrôlée dans le milieu de culture (v/v)

N-C : Concentration en méthanol non contrôlée dans le milieu de culture (v/v)

1 % départ : Concentration initiale de méthanol ajoutée de 1 % (v/v)

Tableau 3.5 : Résumé des résultats obtenus pour les fermentations F1 à F8

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Stratégie d'induction	0.5 % N-C	0.1 % C	1 % C	Ajout initial 1 %	Ajout initial -1 %	Ajout initial 1 %	0.5 % C	0.1 % C
[GFP _{extra}] max (mg.L ⁻¹)	19	5.1	16	15	14	13	12	4.2
GFP _{spéc} max (mg.g ⁻¹)	1.66	0.45	1.52	1.45	1.18	0.98	1.11	0.34
Y p/s (mg.g ⁻¹)	0.83	0.3	0.95	2.2	2.1	1.6	1.0	1.6
P p/t (mg.L ⁻¹ .h)	0.13	0.038	0.2	0.23	0.17	0.14	0.11	0.037
Méthanol total ajouté (g)	321	237	237	95	95	110	168	36

Légende :

Y p/s : (mg.g⁻¹) : Quantité finale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité totale de méthanol ajoutée (g)

[GFP_{extra}] max : Concentration maximale de GFP extracellulaire obtenue dans le milieu de culture (mg.L⁻¹)

GFP_{spéc} max : Quantité maximale de GFP extracellulaire obtenue (mg) par quantité de biomasse finale obtenue (g de poids sec)

P p/t : Productivité volumétrique (P) où p (produit) est la concentration maximale de GFP extracellulaire obtenue dans le milieu de culture (mg.L⁻¹) et t (temps) le temps de fermentation pour obtenir cette quantité (h)

Méthanol total : Quantité totale de méthanol ajoutée (g)

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Toxicité du méthanol

Les micro-organismes ont une tolérance limitée vis-à-vis le méthanol même si celui-ci est un substrat carboné relativement commun (Camelbeeck *et al.*, 1992). Généralement, il a été assumé qu'il ne fallait pas dépasser des concentrations de l'ordre de 1 % (v/v) de méthanol dans le milieu pour la culture des souches de *Pichia pastoris* de phénotype Mut^s (McAleer et Rima, 2000). Les cultures en boîtes de Pétri n'ont pas permis, dans les conditions utilisées, de déterminer la concentration de méthanol inhibitrice pour la croissance de la souche C-20 en milieu gélosé. Nous pouvons seulement supposer que cette concentration est supérieure à 3.5 % (v/v) puisque des colonies ont pu être observées sur toutes les géloses inoculées. Il est aussi probable qu'une partie du méthanol présent dans le milieu gélosé se soit évaporée lors de l'incubation à 30°C. En effet, dans le protocole suggéré par Invitrogen (1999) pour la culture des souches de *Pichia pastoris* sur milieu gélosé MM + H, il est suggéré d'ajouter du méthanol à ce milieu une fois par jour pour compenser l'évaporation de ce dernier. Les concentrations de méthanol ont donc pu diminuer au cours du temps puisque nous n'avons pas ajouté de méthanol au milieu.

La biomasse de la souche C-20 a continué d'augmenter lors de la culture en milieu BMMY (Figure 3.1). À priori, cette observation est plutôt surprenante, car la biomasse des souches de *Pichia pastoris* de phénotype Mut^s, cultivées dans un milieu dont la source de carbone est le méthanol, demeure habituellement stable (voir résultats des cultures en Erlenmeyers et en bioréacteur, Chapitre 3, Résultats). Nous supposons qu'il restait du glycérol de l'inoculum utilisé (10 % en volume de milieu BMGY) qui a été consommé par les cellules pour produire cette augmentation de la biomasse. Il est aussi possible que le peptone et l'extrait de levure présents dans le milieu BMMY aient pu servir de source de carbone. Les résultats présentés à la Figure 3.1 démontrent une

inhibition de la croissance pour les cellules cultivées dans un milieu BMMY de concentration en méthanol de 6 % (v/v) et plus. Nous attribuons cette absence de croissance cellulaire à une toxicité causée par le méthanol. Toutefois, ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer que des concentrations en méthanol inférieures à 6 % (v/v) ne produiront pas d'inhibition de la croissance de la souche C-20 dans les autres types de culture. En effet, les conditions de cultures en Erlenmeyers et en bioréacteur permettent un meilleur transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide (agitation et/ou aération) que celui obtenu en tube de 50 mL. Si une concentration plus élevée d'oxygène dissout est disponible pour les cellules, il est probable qu'il y aura aussi formation d'une plus grande quantité de formaldéhyde et de peroxyde d'hydrogène, substances toxiques pour les cellules (Higgins et Cregg, 1998, Invitrogen, 1999). Bien que des concentrations aussi élevées que 5 % (v/v) soient fort probablement toxiques pour les levures en situation de fermentation, il semble que la concentration maximale de méthanol tolérée par les cellules soit supérieure à celle citée dans la littérature. En effet, selon la Figure 3.1, une concentration de 1 % (v/v) de méthanol ne semble pas affecter négativement la croissance cellulaire alors que certains chercheurs affirment que des concentrations supérieures à 0.5 % (v/v), quel que soit le type de culture utilisé, sont toxiques pour *Pichia pastoris* (Jimenez *et al.*, 1997).

4.2 Fermentations en Erlenmeyers

Les expériences en bioréacteur demandent généralement plus de temps, de personnel et d'équipement que les expériences en Erlenmeyers. Pour la recherche, si on considère les contraintes de coûts et de temps de production, il était préférable d'obtenir le maximum d'informations pour la croissance de notre souche et la production de la GFP à l'échelle de flacons Erlenmeyers de 500 mL pour pouvoir ensuite valider les meilleurs résultats en bioréacteur. Il est à noter que les duplicatas de chaque culture en Erlenmeyer ont été effectués en parallèle lors d'une même série d'expériences. Nous avons considéré ces cultures comme des répétitions bien que la préparation des milieux ainsi que la préparation de l'inoculum n'ont pas été effectuées indépendamment.

4.2.1 Comportement de la culture

Durant la phase d'induction, la stabilité du niveau de la biomasse (DO de 45 à 55) était probablement due à une division cellulaire très lente (Figure 3.2). Ceci confirme bien que la souche C-20 est de phénotype Mut^s et qu'elle ne pouvait pas oxyder le méthanol assez rapidement pour permettre une augmentation de la biomasse. En effet, même lorsque la biomasse a atteint de si hautes concentrations, la croissance cellulaire sur méthanol est encore possible pour les souches de *Pichia pastoris* de phénotype Mut^t, mais pas pour les souches de phénotype Mut^s (Higgins et Cregg, 1998). La biomasse a très peu augmenté (2 unités de DO) pendant les dernières 20 h précédant la phase d'induction (entre t = 50 h et t = 70 h, Figure 3.2). Il est probable que le glycérol a été totalement consommé 20 à 30 h avant le début de l'induction. Nous avons suivi le protocole suggéré par Invitrogen (1999) qui prévoyait un temps de consommation total du glycérol de 72 h dans les conditions de culture utilisées. Afin de diminuer le temps de fermentation, il serait avantageux de mesurer la concentration du glycérol dans le milieu de culture tout au long de la phase de croissance pour débiter l'induction tout de suite après l'épuisement de ce substrat.

Nous supposons que l'augmentation du pH observée en phase d'induction a peut-être été causée par l'utilisation d'une source de carbone autre que le méthanol, très probablement une source azotée (Figure 3.3). La conséquence de cette utilisation a été un relâchement d'ammoniac dans le milieu, résultant en une augmentation du pH. Ce phénomène a souvent été observé avec l'utilisation de milieux contenant des substances organiques azotées (communication personnelle, Denis Groleau).

Les informations obtenues grâce aux expériences en Erlenmeyers ont été utiles pour planifier les fermentations en bioréacteur. En effet, nous avons pu déterminer que l'apport d'oxygène (aération) serait moins important lors de la phase d'induction sur méthanol (croissance cellulaire faible ou nulle) que lors de la phase de croissance sur glycérol. De plus, le contrôle du pH par un ajout d'acide (H₃PO₄) en phase d'induction

a été prévu pour maintenir le pH dans une zone optimale pour la production de protéines.

4.2.2 Influence du méthanol

La Figure 3.4 confirme notre hypothèse selon laquelle la stratégie d'alimentation en méthanol a un effet sur la production de GFP. Bien que Wagner *et al.* (1997) affirment que le promoteur de l'alcool oxydase est complètement réprimé à des concentrations inférieures à 0.2 % (v/v) de méthanol, nous avons obtenu une production de GFP à des concentrations aussi faibles que 0.1 % (v/v) et moins de méthanol. Le gel d'électrophorèse (Figure 3.5) ne permet pas de quantifier la production de GFP afin de discerner la stratégie permettant la meilleure production finale de GFP parmi ces deux stratégies : induction avec une concentration en méthanol de 0.5 % (v/v) (colonnes 2 et 3) ou induction avec une concentration en méthanol de 0.1 % (v/v) (colonnes 4 et 5). Toutefois, l'observation du gel d'électrophorèse permet de constater qu'il n'y a pas beaucoup de protéines endogènes (autres que la GFP) qui ont été sécrétées dans le milieu de culture, et ce malgré l'utilisation d'un milieu riche, puisque la bande qui a migré à 27 kDa est la seule évidente par coloration au bleu de Comassie. La sécrétion d'une protéine chez *Pichia pastoris* est donc un avantage intéressant pour la purification.

Katakura *et al.* (1998) ont aussi observé une augmentation de la production de la protéine d'intérêt chez *Pichia pastoris* lorsque des concentrations en méthanol supérieures à celles suggérées par Invitrogen sont utilisées. Leurs travaux furent toutefois effectués à l'aide d'une souche de phénotype Mut⁺. Dans leur cas, le méthanol est utilisé pour la croissance cellulaire en plus de la production de la protéine hétérologue. L'hypothèse qu'ils ont émise pour cette augmentation est qu'une plus grande concentration de méthanol inhibe la croissance cellulaire, faisant en sorte que le méthanol est surtout utilisé pour la production de la protéine hétérologue d'intérêt. Malheureusement, cette hypothèse ne peut pas s'appliquer à nos résultats car la

croissance cellulaire n'entre pas en compétition avec la production de la GFP pour l'utilisation du méthanol, puisque nous avons utilisé une souche de phénotype Mut⁵.

D'après les résultats présentés au Tableau 3.1, le rendement $Y_{p/s}$ était plus élevé dans le cas des fermentations utilisant une très faible concentration en méthanol (0-0.12 % (v/v), cultures e4 et e5, série E1) que pour les autres cultures. Bien que cette stratégie n'a pas permis la production d'une très grande quantité de GFP (45 et 59 mg.L⁻¹), le peu de méthanol (substrat, 0.4 à 0.5 g) utilisé pour la production explique ces rendements plus élevés. La production de GFP n'était donc pas directement proportionnelle à la quantité de méthanol ajoutée, sinon les rendements sur méthanol ($Y_{p/s}$) seraient les mêmes, peu importe la quantité de méthanol ajoutée.

4.2.3 Influence du glycérol

Suite à l'obtention des résultats de la série d'expériences E1 indiquant un arrêt de l'augmentation de la fluorescence après environ 55 h de fermentation pour les Erlenmeyers e4 et e5 (induits avec 0.1 %, v/v, de méthanol) (Figure 3.4), l'hypothèse d'un manque de substrat capable de fournir l'énergie nécessaire à la production de GFP et à la maintenance cellulaire fut envisagée. Pour tenter de pourvoir aux besoins énergétiques des cellules, la stratégie d'alimentation mixte (méthanol + glycérol) a été essayée.

Bien que le glycérol ait eu un effet positif sur l'augmentation de la biomasse, la fluorescence spécifique des cultures alimentées en glycérol n'a pas augmenté par rapport aux cultures non alimentées en glycérol (Figure 3.8). Ceci peut être expliqué par l'arrêt de la consommation du méthanol après le troisième ajout de glycérol (Figure 3.10). Ce phénomène de répression catabolique signifie que le gène AOX n'était pas induit de façon optimale lorsqu'une source de carbone préférentielle au méthanol était disponible (Alberts *et al.*, 1993). Toutefois, puisque les cultures alimentées en glycérol ont cessé de consommer le méthanol uniquement après le troisième ajout de glycérol, nous pouvons supposer que la quantité de glycérol ajoutée les deux premières fois n'était pas suffisante, ou alors que la cellule a eu besoin d'une

période de temps pour synthétiser de nouveau les enzymes nécessaires à l'oxydation du glycérol. D'autres chercheurs ont également observé une répression du gène de l'alcool oxydase par le glycérol (Thorpe, d'Anjou et Daugulis, 1999, Chiruvolu, Cregg et Meagher, 1997, Sreekrishna *et al.*, 1997). Pour obtenir plus de GFP dans notre système, il serait préférable d'augmenter d'abord la biomasse par une cuvée alimentée en glycérol, puis de procéder à l'induction en utilisant uniquement du méthanol. Une alternative suggérée est d'utiliser le sorbitol comme source de carbone pour l'alimentation mixte. Des études de la production d'autres protéines hétérologues chez *Pichia pastoris* démontrent que ce substrat est moins inhibiteur que le glycérol (Thorpe, d'Anjou et Daugulis, 1999, Sreekrishna *et al.*, 1997).

L'intérêt de l'essai d'une alimentation mixte méthanol/glycérol était d'augmenter la source d'énergie disponible pour les cellules pour éventuellement diminuer la quantité totale de méthanol utilisée pour le procédé. D'après ces résultats, qui ne démontrent ni d'effet positif sur la production spécifique de GFP ni un moyen de diminuer la quantité de méthanol utilisée pour l'induction, nous n'avons pas cherché à reproduire ce type d'alimentation mixte en bioréacteur. Cependant, la quantité et les temps tardifs d'ajout de glycérol ont été décidés de manière arbitraire et n'étaient probablement pas optimaux pour avoir un effet positif sur la production de la GFP. De ce fait, les expériences effectuées pour ce projet ne permettent pas de conclure sur l'efficacité de l'alimentation mixte par rapport à l'alimentation effectuée uniquement avec le méthanol pour la production de la GFP chez *Pichia pastoris*.

4.3 Fermentations en bioréacteur

4.3.1 Cinétique de croissance

Lors de la cuvée en glycérol, les cellules consommaient cette source de carbone par oxydation, ce qui s'illustre par une diminution des concentrations en glycérol et en oxygène dissout présentés à la Figure 3.11. Nous avons obtenu un temps de dédoublement de 2.45 h, ce qui correspond approximativement aux résultats publiés

(3.5 à 4 h selon Camelbeeck *et al.*, 1992 et 1 à 3 h selon Fernandez et Hoeffler, 1999) pour la croissance de *Pichia pastoris* sur glycérol. Les profils des gaz de sortie du fermenteur ainsi que de l'oxygène dissout, présentés aux Figures 3.11 et 3.12, permettaient aussi d'avoir de l'information sur le métabolisme cellulaire. Ces méthodes d'analyses en continu sont très utiles pour suivre la respiration des levures (Romanos, Scorer et Clare, 1992). Selon Neeleman, van den End et van Boxtel (2000), les taux de consommation d'O₂ et de production de CO₂ sont des indicateurs directs de l'activité métabolique des micro-organismes.

Le «QR» ou quotient respiratoire se définit comme suit (Pomerleau, 1990) :

$$\text{QR} = \frac{\text{Moles de CO}_2 \text{ produites}}{\text{Moles d'O}_2 \text{ consommées}}$$

La réaction d'oxydation du glycérol est illustrée par l'équation suivante (Hohmann et Mager, 1997) :



Le quotient respiratoire auquel on pouvait s'attendre si l'oxydation du glycérol était complète est d'environ 0.86. Or, le glycérol n'était pas complètement oxydé puisqu'une partie du carbone était utilisé par la levure pour les constituants cellulaire (augmentation de la biomasse). Cette respiration incomplète est la raison pour laquelle le QR observé pendant la phase de croissance n'était pas toujours de 0.86 (Figure 3.12). Après épuisement du glycérol dans le milieu, une augmentation brutale de l'oxygène dissout dans le milieu de culture (Figure 3.13) et de la concentration d'oxygène dans les gaz de sortie du fermenteur a été observée (Figure 3.12). L'oxygène n'était plus utilisé pour oxyder le glycérol. À la suite de cette augmentation, le contrôleur d'oxygène, fixé à 20 % d'oxygène dissout, a diminué brusquement les conditions d'aération et d'agitation. Ce phénomène s'est traduit par un pic d'oxygène dissout que nous avons utilisé comme indicateur pour débiter l'induction (Figure 3.13). Les variations du QR observées au début de la phase d'induction étaient une indication du changement de métabolisme des cellules (Neeleman, van den End et van Boxtel, 2000).

Lors de la phase d'induction, la réaction d'oxydation du méthanol prévoit l'utilisation de 1.5 moles d'O₂ pour oxyder une mole de méthanol en une mole de CO₂, soit un QR d'environ 0.67 (Sakai, Tani et Kato, 1999). L'équation suivante illustre cette réaction :



La moyenne de la valeur de QR obtenue pendant la phase d'induction entre $t = 23$ h et $t = 100$ h, soit pendant que le QR était stable, est de 0.65. Cela signifie que le méthanol consommé par oxydation était presque totalement transformé en CO₂. Ce résultat était prévisible puisque la biomasse a très peu augmenté pendant la phase d'induction. La différence observée entre le QR théorique (0.67) et le QR moyen obtenu pendant nos expériences (0.65) peut être attribuée à l'utilisation du carbone pour la production de GFP (voir métabolisme du méthanol, Figure 1.2, Chapitre 1, Revue de littérature). La tendance vers la baisse du QR en fin d'induction ($t = 100$ h à $t = 120$ h) a probablement été causée par une augmentation de la mortalité cellulaire. À ce moment, le mécanisme de respiration des cellules était au ralenti : les cellules consommaient moins de méthanol et produisaient ainsi moins de CO₂. Cette diminution correspondait environ au temps d'arrêt de la production de GFP, qui peut être observée à la Figure 3.14 (Fermentation F3). La baisse du quotient respiratoire pourrait donc être utilisée comme indicateur du moment de récolte de la culture. Dans le cadre de ce projet, nous n'avons pas cherché à analyser plus profondément les résultats obtenus par respirométrie, ce sujet étant très peu documenté pour le micro-organisme que nous avons utilisé. Toutefois, cet outil pourrait s'avérer intéressant dans l'optique d'une étude d'optimisation du temps de récolte des protéines hétérologues.

4.3.2 Comparaison Erlenmeyers et bioréacteur

Bien que les paramètres (pH, température, oxygène dissout, agitation) étaient mieux contrôlés en bioréacteurs qu'en Erlenmeyers, la production de GFP n'a pas été supérieure, comme on peut l'observer au Tableau 3.3. La quantité maximale de GFP spécifique qui a été obtenue est environ 2.5 fois supérieure en Erlenmeyers qu'en

bioréacteur, alors que le rendement $Y_{p/s}$ était dix fois plus important en Erlenmeyers qu'en bioréacteur. Notons toutefois que nous n'avons pas cherché à optimiser la production de la GFP dans un système comme dans l'autre autrement qu'en variant les stratégies d'alimentation en méthanol. En effet, avec la levure *Pichia pastoris*, les concentrations en protéines hétérologues provenant d'invertébrés obtenues à ce jour varient entre 0.2 mg.L^{-1} et 2000 mg.L^{-1} (Cereghino et Cregg, 2000). En Erlenmeyers, la plus haute concentration en GFP extracellulaire qui a été obtenue est de 178 mg.L^{-1} (Tableau 3.1), alors qu'en bioréacteur, nous avons obtenu des concentrations en GFP variant de 4.2 à 19 mg.L^{-1} (Tableau 3.5). Nous avons aussi observé une meilleure production pour des cultures en Erlenmeyers qu'en bioréacteur lors d'autres recherches effectuées dans le groupe de technologie microbienne et enzymatique (CNRC-IRB) avec une souche qui produit la GFP non sécrétée (Pérard, 2000). Les hypothèses suivantes peuvent expliquer en partie cet écart entre les productions des deux systèmes (Erlenmeyers et bioréacteur) :

- ✧ En Erlenmeyers, les cellules étaient remises en suspension dans du milieu frais afin de débiter l'induction, ce qui pourrait annuler ou réduire l'effet d'une limitation nutritionnelle ou d'une accumulation de substances toxiques suite à la croissance exponentielle sur glycérol.
- ✧ Le stress imposé aux cellules était beaucoup plus important en bioréacteur qu'en Erlenmeyers (l'agitation à l'aide de pales cause un stress pour la croissance de certains micro-organismes, aération supplémentaire).
- ✧ L'évaporation du méthanol était plus importante en bioréacteur qu'en Erlenmeyers (voir Appendice F), ce qui diminuait le rendement $Y_{p/s}$. En effet, une partie du méthanol (s) ajouté à la culture s'est évaporée plutôt que d'être utilisée pour induire le promoteur du gène AOX1 et ainsi produire la GFP (p).

Ecamilia-Trevino *et al.* (2000) ont aussi obtenu une production de leur protéine recombinante (hormone de croissance) supérieure en Erlenmeyers qu'en fermenteur. Lors de l'analyse par gel SDS-PAGE, un nombre plus important de bandes était présent dans les échantillons provenant de la culture en bioréacteur qu'en Erlenmeyers. Selon

cette observation, Ecamilla-Trevino (2000) et ses collaborateurs affirment qu'une lyse cellulaire importante pourrait être à l'origine d'une moins bonne production en fermenteur (probablement due au relargage de protéases lors de la lyse cellulaire qui digèrent l'hormone de croissance). Cependant, dans nos expériences, nous n'avons pas observé plus de bandes sur les gels de SDS-PAGE en fermenteur qu'en Erlenmeyers. Un gel d'électrophorèse effectué à partir d'échantillons du surnageant d'une culture en fermenteur est présenté à l'Appendice H. La GFP est considérée comme une protéine très stable qui est difficilement inactivée par les protéases (Andersen *et al.*, 1998). De plus, la souche de *Pichia pastoris* utilisée pour ces travaux (C-20, dérivée de la souche mère KM71) est déficiente en protéases (Cereghino et Cregg, 2000). De ce fait, nous croyons plutôt qu'une limitation nutritionnelle ou une toxicité pourrait expliquer les résultats inférieurs obtenus en bioréacteur. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une production de GFP en Erlenmeyer en ajoutant le méthanol au milieu BMGY épuisé en glycérol sans suspendre les cellules à nouveau dans du milieu frais BMMY. Pour cette expérience, la concentration maximale de GFP spécifique obtenue était trois fois inférieure à la concentration maximale de GFP obtenue pour la culture en Erlenmeyers en utilisant le protocole habituel (remise en suspension des cellules dans un milieu frais), et ce, en utilisant la même concentration de méthanol. Cette observation tend à supporter notre hypothèse de limitation nutritionnelle ou de toxicité.

4.3.3 Comparaison entre les stratégies d'alimentation en méthanol

L'utilisation d'une très faible concentration de méthanol s'est avérée efficace lors d'une recherche antérieure effectuée par le groupe de technologie microbienne et enzymatique du CNRC-IRB (Bourque, Pomerleau et Groleau, 1995) pour la production de PHB (Poly- β -hydroxybutyrate) par la bactérie *Methylobacterium extorquens*. Dans ce cas précis, une alimentation en méthanol à une vitesse égale à la consommation de la culture a permis de conserver une concentration en méthanol inférieure à 0.01 g.L^{-1} dans le milieu de culture. Cette stratégie d'alimentation était optimale pour la production de PHB dans *M. extorquens*. Une stratégie d'alimentation semblable a aussi été proposée pour la production de protéines hétérologues chez *Pichia pastoris*. En effet, Cregg

(dans le livre de Fernandez et Hoeffler, 1999) affirme qu'une culture alimentée à un taux de méthanol limitant pour la croissance cellulaire de *Pichia pastoris* produit de trois à cinq fois plus de protéines qu'une culture où le méthanol est en excès. Dans le cadre de ce projet, puisque la croissance était très faible avec notre souche de phénotype Mut^s, nous pouvons considérer que la concentration en méthanol qui était présente dans le milieu était toujours en excès. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une stratégie utilisant une très faible concentration de méthanol dans le milieu de culture pourrait être efficace pour la production de GFP chez *Pichia pastoris*.

Le peu de GFP produite à faible concentration de méthanol dans le milieu de culture (0.1 %, v/v) par rapport aux autres stratégies d'alimentation testées suggère que cette stratégie d'alimentation n'était pas optimale pour la production de GFP chez la souche C-20 de *Pichia pastoris*. En effet, la stratégie utilisée lors des fermentations F2 et F8 est celle qui a produit la plus faible quantité de GFP extracellulaire (4.2 à 5.1 mg.L⁻¹) (Figure 3.14, Tableau 3.5). Nous croyons que la faible concentration en méthanol qui était présente dans le milieu de culture (environ 0.1 %, v/v) ne permettait pas une induction optimale du promoteur du gène AOX1. Le méthanol pouvant être utilisé par la cellule pour la production des protéines ainsi que pour la régénération de son ATP était alors insuffisant. La différence au niveau du rendement Y_{p/s} pour les fermentations F2 et F8 est due au fait que la quantité totale de méthanol utilisée lors de la fermentation F2 est plus importante que lors de la fermentation F8.

Pour toutes les autres fermentations, mises à part F2 et F8, la concentration de GFP dans le milieu de culture a augmenté rapidement puis a atteint un plateau entre 60 et 110 h de fermentation, selon la stratégie d'alimentation en méthanol utilisée (Figure 3.14). D'après Cregg (dans le livre de Fernandez et Hoeffler, 1999), le simple fait de produire de grandes quantités de protéines hétérologues menace la survie des cellules. En plus d'exiger une dépense d'énergie supplémentaire pour la production d'une protéine complètement inutile pour la cellule, la production extracellulaire de grandes quantités de protéines hétérologues peut être responsable d'une accumulation de protéines non repliées dans le réticulum endoplasmique (Hampton, 2000). Un

ralentissement n'a pas été observé pour les cultures en Erlenmeyers qui ont été alimentées avec des concentrations en méthanol supérieures à 0.2 % (v/v) (Figure 3.4). Rappelons que ces cultures étaient transférées dans un milieu frais BMMY avant l'induction. Cette observation suggère que l'utilisation d'un milieu frais avant l'induction a prolongé le temps de production de la GFP. Cette stratégie n'est pas facilement réalisable à grande échelle, c'est pourquoi nous ne l'avons pas utilisée en bioréacteur.

Bien que les profils d'augmentation de la GFP extracellulaire au cours du temps étaient semblables pour les fermentations F1 et F7, nous avons observé une différence importante entre ces deux fermentations en terme de quantité de GFP obtenue. La différence entre les deux fermentations était la stratégie d'alimentation en méthanol oscillant entre 0.25 % et 0.7 % (v/v) pour F1 et stable à 0.5 % (v/v) pour F7. Les graphiques de l'évolution de la concentration du méthanol sont présentés à l'Appendice G. Puisque les résultats des cultures en Erlenmeyers ont démontré une production de GFP extracellulaire plus élevée pour des cultures dans lesquelles le méthanol a été ajouté à des fréquences plus rapprochées (Figure 3.4), nous nous attendions à obtenir aussi une production de GFP extracellulaire plus élevée en bioréacteur lorsque la concentration en méthanol était maintenue constante dans le milieu de culture (fermentation F7). De plus, Guarna *et al.* (1997) ont obtenu une production de protéines hétérologues chez *Pichia pastoris* augmentée d'un facteur de cinq en contrôlant le méthanol dans le milieu de culture par rapport au protocole d'Invitrogen qui suggère d'ajouter du méthanol deux fois par jour (Invitrogen 1999). Ces chercheurs affirment que la fréquence d'ajout du méthanol suggérée par Invitrogen est trop espacée, ce qui entraînerait des périodes pendant lesquelles la concentration en méthanol est trop faible.

Étant donné que nos résultats ont démontré une production de GFP finale plus élevée (19 mg.L^{-1}) lors de la culture en bioréacteur avec un ajout de méthanol aux 12 h (F1) qu'avec une concentration de méthanol contrôlée (F7, 12 mg.L^{-1}), nous ne pouvons pas conclure sur l'efficacité d'une stratégie de contrôle du méthanol à une concentration

constante dans le milieu de culture par rapport à un ajout périodique de méthanol. Un duplicata de chacune de ces expériences en bioréacteur (concentration en méthanol contrôlée ou non) devra être effectué pour vérifier si l'ajout ponctuel de méthanol permet vraiment d'obtenir de plus grandes quantités de GFP.

Lors des quatre fermentations effectuées avec une concentration initiale en méthanol de 1 % (v/v) (F3, F4, F5, F6), nous avons atteint une concentration maximale de GFP extracellulaire environ 50 h plus tôt que lors des fermentations utilisant une concentration de 0.5 % (v/v) en méthanol (F1 et F7) (Figure 3.14). Puisque le méthanol active le promoteur du gène AOX1, la stratégie d'alimentation utilisant une concentration de 0.5 % (v/v) de méthanol n'était peut être pas optimale pour saturer le promoteur alors que la stratégie utilisant 1 % a pu l'être. Selon la voie métabolique du méthanol (Figure 1.2, Chapitre 1, Revue de littérature), on constate qu'une augmentation de la production de l'enzyme alcool oxydase permet d'augmenter la disponibilité du carbone pour les constituants cellulaires ainsi que la quantité de NADH pour générer de l'énergie. De plus, la production plus rapide de l'enzyme alcool oxydase ainsi que de la GFP a probablement accéléré l'effet limitant la production de GFP (stress, limitation nutritionnelle, toxicité). Ceci pourrait expliquer l'apparition plus rapide du plateau de fluorescence (à un temps de fermentation d'environ 60 h pour les fermentations F3, F4, F5 et F6 versus 115 h pour F1 et F7, Figure 3.14). Une seconde hypothèse pour ce ralentissement prématuré de la production de GFP lors des fermentations F3, F4, F5 et F6 est qu'une concentration de départ en méthanol de 1 % (v/v) était toxique en bioréacteur pour les cellules. Cette hypothèse est appuyée par les publications suivantes : Fernandez et Hoeffler, 1999, McAleer et Rima, 2000 et Higgins et Cregg, 1998. Toutefois, d'après le résultat des expériences de toxicité du méthanol, nous croyons que l'hypothèse de stress ou de limitation nutritionnelle est plus plausible dans notre cas.

McAleer et Rima (2000) affirment que le succès de l'induction dépend de l'obtention d'un équilibre entre la sur-expression, qui résulte en une accumulation d'ARNt (selon eux le taux de transcription serait alors supérieur au taux de traduction) qui bloque la

synthèse des protéines, et la sous-expression, qui résulte en une insuffisance d'ARNt pour la traduction. Ces chercheurs ont fait l'essai de deux stratégies d'alimentation contrôlée en méthanol, une à 1 % (v/v) et une à 2.5 % (v/v). Ils ont obtenus de meilleurs résultats avec 1 % alors que l'alimentation à 2.5 % (v/v) s'est révélée toxique pour les cellules.

4.3.4 Efficacité de sécrétion

La mesure de la fluorescence intracellulaire par calcul de la différence entre la fluorescence totale (FT) et la fluorescence extracellulaire (FE) a considérablement diminué le temps d'analyse. La corrélation entre la fluorescence intracellulaire mesurée (FI) et celle calculée (FT-FE) démontre que la fluorescence totale mesurée représentait bien la somme de la concentration de GFP intra- et extracellulaire.

Bien que la GFP intracellulaire ait augmenté légèrement au cours du temps pour toutes les fermentations en bioréacteur effectuées, cette augmentation a varié selon la stratégie d'induction utilisée. L'hypothèse qui nous semble la plus probable pour expliquer l'augmentation de la fluorescence intracellulaire est un manque d'énergie nécessaire à la sécrétion. Le méthanol étant une source de carbone oxydée trop lentement par la cellule pour régénérer son ATP (puisque qu'une faible quantité de l'enzyme alcool oxydase est présente), nous supposons que celle-ci n'a plus l'énergie nécessaire à la sécrétion (Kayser *et al.*, 2000).

Cette hypothèse est renforcée par la diminution de la sécrétion observée lors des fermentations au cours desquelles la concentration de méthanol est maintenue à 0.1 % (v/v) (Figure 3.17). Nous croyons que la concentration de méthanol présente dans le milieu de culture était insuffisante pour permettre à la cellule d'avoir assez d'énergie pour la sécrétion de la GFP.

À la Figure 3.17, nous observons que les fermentations au cours desquelles la concentration de méthanol au départ était de 1 % (v/v) (F3, F4, F5 et F6), ont montré une

meilleure efficacité de sécrétion que les autres fermentations. Nous pouvons supposer que la concentration initiale de méthanol ajoutée à la culture a eu un plus grand effet sur la sécrétion que la quantité totale de méthanol ajoutée pendant le procédé. D'autres chercheurs ont aussi observé une augmentation du taux de sécrétion d'une lipase chez *Pichia pastoris* lors de l'augmentation de la vitesse d'alimentation en méthanol (Jahic *et al.*, 2000). L'hypothèse qu'une augmentation de la lyse cellulaire causée par l'utilisation d'une concentration de 1 % (v/v) de méthanol (possiblement toxique) ait pu être à l'origine d'une fausse augmentation de l'efficacité de sécrétion a été suggérée. Toutefois, nous avons rejeté cette hypothèse puisque nous n'avons pas observé de bandes supplémentaires sur les gels de SDS-PAGE effectués avec les échantillons provenant de ces fermentations.

4.3.5 Choix d'une stratégie d'induction

Afin de choisir une stratégie d'induction préférentielle en bioréacteur, nous devons considérer les contraintes de sécurité et de productivité fixées au départ. Selon les résultats présentés à la Figure 3.15, la stratégie pour laquelle nous avons obtenu la quantité totale de GFP extracellulaire, $\text{GFP}_{\text{extra max}}$, la plus élevée en bioréacteur (0.27 g) est celle où nous avons ajouté du méthanol de façon ponctuelle pour obtenir une concentration d'environ 0.5 % (v/v) (F1). Toutefois, puisque nous avons obtenu une quantité maximale de GFP inférieure (0.17 g) pour la fermentation effectuée avec une concentration contrôlée de méthanol à 0.5 % (v/v) (Figure 3.15, F7), nous ne pouvons pas affirmer que la stratégie d'alimentation visant une concentration de 0.5 % (v/v) (contrôlée ou non) dans le milieu de culture était la meilleure en terme de $\text{GFP}_{\text{extra max}}$ obtenue.

En terme de rendement $Y_{p/s}$, les meilleurs résultats ont été obtenus lors des fermentations F4, F5, F6 et F8 (Tableau 3.5 et Figure 3.16). L'ajout initial d'approximativement 1 % (v/v) de méthanol (100 g total ajouté en moyenne) réduisait d'un facteur d'environ 2.5 la quantité totale de méthanol utilisée pour le procédé par rapport aux stratégies d'induction visant une concentrations d'environ 0.5 % (v/v) (244

g total ajouté en moyenne) (Figure 3.15). Dans le cadre de ce projet, le rendement n'était pas considéré en terme de coût, puisque le méthanol est une source de carbone très bon marché (Sakai, Tani et Kato, 1999) mais en terme de sécurité (Fernandez et Hoeffler, 1999).

Nous avons aussi calculé la productivité volumétrique maximale obtenue pour chaque fermentation (Tableau 3.5, Figure 3.16). Comme prédit par les profils de fluorescence (Figure 3.14), les fermentations F3, F4, F5 et F6 ont permis d'obtenir les productivités les plus élevées (Figure 3.16). En effet, la GFP était produite plus rapidement lorsque la concentration initiale de l'inducteur était de 1 % (v/v).

D'après les résultats obtenus, nous suggérons d'ajouter 1 % (v/v) de méthanol après la phase de croissance cellulaire et de récolter les cellules après environ 60 h de fermentation. Cette stratégie possède les avantages suivants par rapport aux deux autres stratégies à l'essai dans le cadre de nos travaux :

✧ Meilleur rendement Y p/s :

L'optimisation du rendement de GFP sur méthanol était très important pour les contraintes de sécurité de notre projet afin de diminuer la quantité de méthanol utilisé pendant le procédé sans diminuer la quantité de GFP obtenue.

✧ Meilleure productivité volumétrique

La productivité demeure aussi un indicateur important tant au niveau économique qu'au niveau sécurité. Effectivement, en diminuant le temps de fermentation, des économies peuvent être effectuées au niveau des appareils utilisés et du personnel employé. En diminuant le temps durant lequel le personnel est exposé au méthanol, substance inflammable et explosive, le risque d'accident est aussi diminué.

✧ Meilleur taux de sécrétion

La sécrétion d'une protéine d'intérêt chez *Pichia pastoris* est un avantage majeur puisque la purification de cette dernière en est ainsi facilitée. En obtenant des taux de sécrétion plus élevés, la quantité totale de protéines que nous pouvons recueillir plus facilement est aussi plus élevée. L'augmentation du taux de sécrétion représente donc un avantage économique additionnel.

✧ Diminution des manipulations avec le méthanol

L'ajout du méthanol en une seule étape augmente considérablement l'aspect sécuritaire du procédé. Le pompage du méthanol est l'étape du procédé qui présente le plus grand danger d'explosion. En limitant ce pompage à 10 minutes (temps moyen de pompage lors de nos travaux) au début de la phase d'induction, plutôt que pendant 4 jours (temps moyen de la phase d'induction), la période de temps pendant laquelle le risque d'explosion est maximal est diminuée d'un facteur d'environ 500. Lorsque le méthanol est dissout dans le milieu de culture, la concentration de méthanol contenue dans la partie gazeuse du bioréacteur n'est pas assez élevée pour représenter un danger d'inflammabilité ou d'explosion (limite minimale d'explosivité de 6 %, voir Tableau 1.7, Chapitre 1, Revue de littérature).

✧ Élimination du besoin pour des systèmes sophistiqués de mesure et de contrôle du méthanol

Dans le cadre de ce projet, un système de contrôle du méthanol a été développé. Bien que ce système ait permis de mesurer et de contrôler la concentration du méthanol dans le milieu de culture pour certaines fermentations en bioréacteur (F2, F7), la réponse de la sonde qui mesurait le méthanol avait tendance à varier avec le temps (voir fermentation F3, Appendice G). L'évaporation du méthanol dans le tube d'alimentation ne permettait pas un contrôle précis. De plus, l'achat, la mise en place et la calibration

de ce système augmentent le coût et la durée du procédé. Enfin, dans un contexte de production en mode cGMP («current Good Manufacturing Practices», ou bonnes pratiques de fabrication), un procédé plus simple sera plus facilement reproductible afin de rencontrer les exigences des autorités réglementaires. Pour ces raisons, la stratégie d'ajout unique du méthanol permet une économie d'argent et facilite la reproductibilité du procédé de par sa simplicité.

CONCLUSION

L'objectif majeur de ce projet de maîtrise était d'étudier l'effet de différentes stratégies d'alimentation en méthanol pour la production extracellulaire de la GFP par la souche C-20 de *Pichia pastoris*. À partir de cette étude, une stratégie d'induction économique et surtout sécuritaire face à l'utilisation du méthanol devait être suggérée.

La toxicité du méthanol vis-à-vis la souche C-20 a été testée en milieu gélosé MM + H (Invitrogen) et en tubes de milieu BMMY (Invitrogen). D'après ces expériences, nous avons observé que la souche C-20 peut croître jusqu'à une concentration en méthanol de 3.5 % (v/v) en milieu gélosé et jusqu'à 4 % (v/v) en milieu liquide BMMY. Ces concentrations en méthanol sont plus élevées que celles généralement considérées comme toxiques pour ce type de souche, selon la littérature scientifique.

Plusieurs stratégies d'induction ont été expérimentées en Erlenmeyers agités (concentration en méthanol de 0.1 à 0.7 %, v/v). Les cultures qui ont été alimentées avec une concentration de méthanol plus élevée et à des fréquences plus rapprochées ont produit une plus grande quantité de GFP. L'alimentation mixte glycérol/méthanol n'a pas permis d'augmenter la production spécifique de GFP par la souche C-20 de *Pichia pastoris* avec les paramètres utilisés pour ces recherches.

Différentes stratégies d'alimentation en méthanol ont été étudiées pour des cultures de la souche C-20 à l'aide de huit fermentations en bioréacteur de 20 L. Le contrôle des paramètres ainsi que l'acquisition de données en temps réel (pH, température, oxygène dissout, gaz de sortie du fermenteur, concentration en méthanol) ont permis une analyse plus complète de l'effet du méthanol sur la culture. Des concentrations en méthanol (contrôlées ou non dans le milieu de culture) variant entre 0.1 % (v/v) et 1 % (v/v) ont été expérimentées. Parmi ces stratégies d'alimentation, l'ajout unique d'une concentration de 1 % (v/v) de méthanol dans le milieu de culture pour induire le promoteur de l'alcool oxydase a permis d'obtenir un rendement ($Y_{p/s}$) de GFP

extracellulaire (mg) sur substrat ajouté (méthanol, en g) et une productivité volumétrique (mg de GFP extracellulaire par L de culture par heure) maximales.

Cette stratégie d'alimentation présente de nombreux attraits pour la production à grande échelle de protéines recombinantes par *Pichia pastoris*. En effet, un ajout unique du méthanol augmente l'aspect sécuritaire par la diminution des manipulations du méthanol et du temps de pompage de ce dernier. De plus, le procédé d'induction est grandement simplifié par l'élimination du besoin pour des systèmes de mesure et de contrôle du méthanol. Dans une optique de production industrielle à grande échelle, des essais en fermenteur de 150 L et/ou 1500 L devront être effectués à l'Usine Pilote (CNRC-IRB) afin de valider la production de GFP par *Pichia pastoris* à l'aide de cette stratégie. Enfin, il reste maintenant à voir si les informations recueillies sur la GFP comme protéine modèle sont applicables à la production de protéines d'intérêt commercial et/ou thérapeutique par la levure *Pichia pastoris*.

APPENDICE A

Liste des protocoles du CNRC-IRB utilisés

Les protocoles énumérés ci-dessous ont servi d'exemples pour l'élaboration des protocoles utilisés dans ce projet. Ils sont disponibles dans le groupe de technologie microbienne et enzymatique, Secteur des bioprocédés, CNRC-IRB.

A.1 Protocoles de fermentation

- ✧ Protocole pour la production de la GFP par la souche de *Pichia pastoris* C-20 (établi par Sandrine Favre et Laurent Borel, 1999).
- ✧ Protocole pour la production de TGF- β type II par *Pichia pastoris* (établi par Martin Lafrance, 1998).
- ✧ Protocole pour la production de nitrilase par *Pichia pastoris* (établi par Teffanie Lefrançois, 1999).
- ✧ Protocole de stérilisation et de préparation du bioréacteur Chemap 20 L et des sondes pour un contrat client («Plant SOP» ou «Standard Operation Procedures», Usine Pilote, disque G).
- ✧ Procédures de décontamination et de nettoyage du bioréacteur Chemap 20 L et des sondes («Plant SOP» ou «Standard Operation Procedures», Usine Pilote, disque G)

A.2 Protocoles pour l'utilisation des appareils

- ✧ Protocole pour l'utilisation du chromatographe en phase gazeuse (établi par Jean-François Jetté, 1999).
- ✧ Protocole pour l'utilisation du système BIO-RAD (gel d'électrophorèse) (établi par Martin Lafrance, 1997).
- ✧ Protocole pour l'utilisation du fluoromètre (établi par Anke Kayser, 1999)

APPENDICE B

Feuilles de suivi

B.1 Feuille de suivi des fermentations en Erlenmeyers agités

Tableau A.1 : Feuille de suivi des fermentations en Erlenmeyers

Age	No Erlen	Souche	Date et heure	pH	DO	Fluorescence	[MeOH] ou [Glyc.]	Volume Erlen	Vol. MeOH ou Glyc ajouté/ [MeOH] ou [Glyc.] après ajout	Initiales Réf. Notes
	1									
	2									
	3									
	4									
	1									
	2									
	3									
	4									
	1									
	2									
	3									
	4									

APPENDICE C

Paramètres du système de contrôle du méthanol

Tableau A.4 : Paramètres de la stratégie et du système de contrôle du méthanol

Paramètres	Valeur
Pompe utilisée	Master Flex 3, tête 7013-20
Débit pompe	0.093 mL.seconde ⁻¹
Débit	5.6 mL.minute ⁻¹
Limite inférieure, concentration de méthanol	Variable
Limite supérieure, concentration de méthanol	Variable
Temps d'ajout	30 secondes
Volume ajouté	2.8 mL
Temps d'ajout	90 secondes

APPENDICE D

Reproductibilité des résultats

Pour un même échantillon, les analyses suivantes ont été effectuées 5 fois : densité optique à 600 nm, fluorescence du surnageant et concentration en méthanol. Le pourcentage d'erreur représente la valeur absolue de l'écart par rapport à la moyenne.

Les résultats sont présentés à la Figure A.1

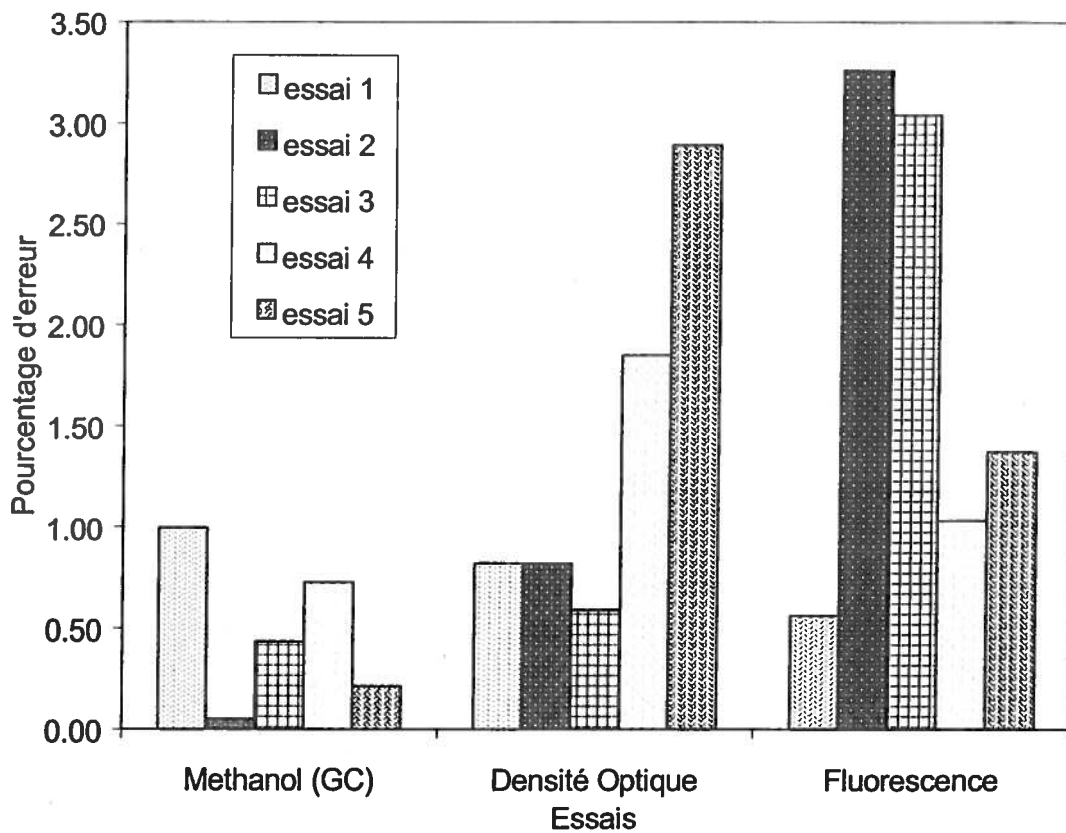


Figure A.1 : Reproductibilité de la mesure de la densité optique, de la fluorescence du surnageant et de la concentration en méthanol pour 5 essais différents (GC : chromatographie en phase gazeuse)

APPENDICE E

Mesure de la densité optique

Le développement d'une nouvelle méthode d'analyse de la densité optique a permis de diminuer l'erreur de mesure observée lors des cultures en Erlenmeyers.

Il faut effectuer 3 dilutions pour obtenir des mesures de densité optique comprises entre 0.1 et 0.5. À partir de ces mesures, nous traçons le graphique de la valeur mesurée en fonction de la dilution (Figure A.2). La DO est ensuite calculée à partir de l'équation obtenue de l'interpolation linéaire.

Tableau A.5 : Mesure de DO à 600 nm pour plusieurs dilutions d'un échantillon de la fermentation F7

Temps : 134 h	
Dilutions	DO
1/50	0.4512
1/100	0.2354
1/200	0.1196
1	22.0427

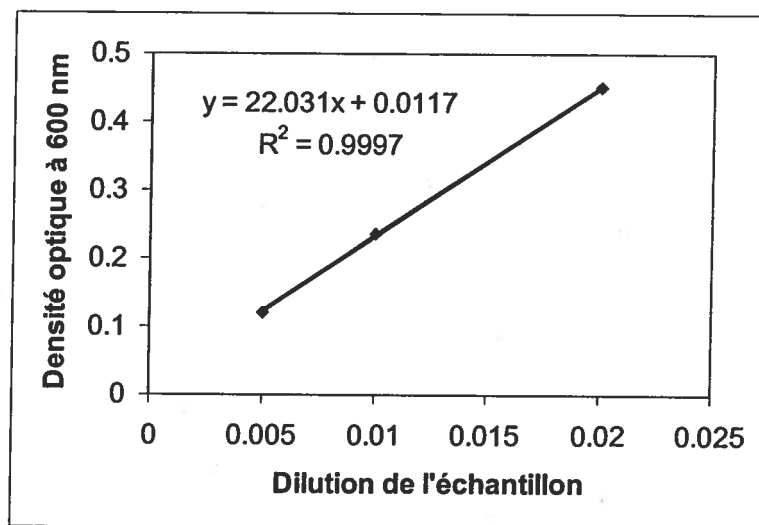


Figure A.2 : Exemple de calcul de densité optique : à partir de l'équation de l'interpolation linéaire, nous prenons $x = 1$, y est la DO calculée

APPENDICE F

Évaporation du méthanol

Des expériences abiotiques ont permis de déterminer l'évaporation du méthanol selon les conditions de culture en Erlenmeyers (deux concentrations en méthanol différentes) et en bioréacteur. Les conditions utilisées étaient les mêmes que celles utilisées pour les fermentations effectuées au cours de ce projet. La concentration de méthanol est mesurée au GC. La Figure A.3 présente les résultats obtenus.

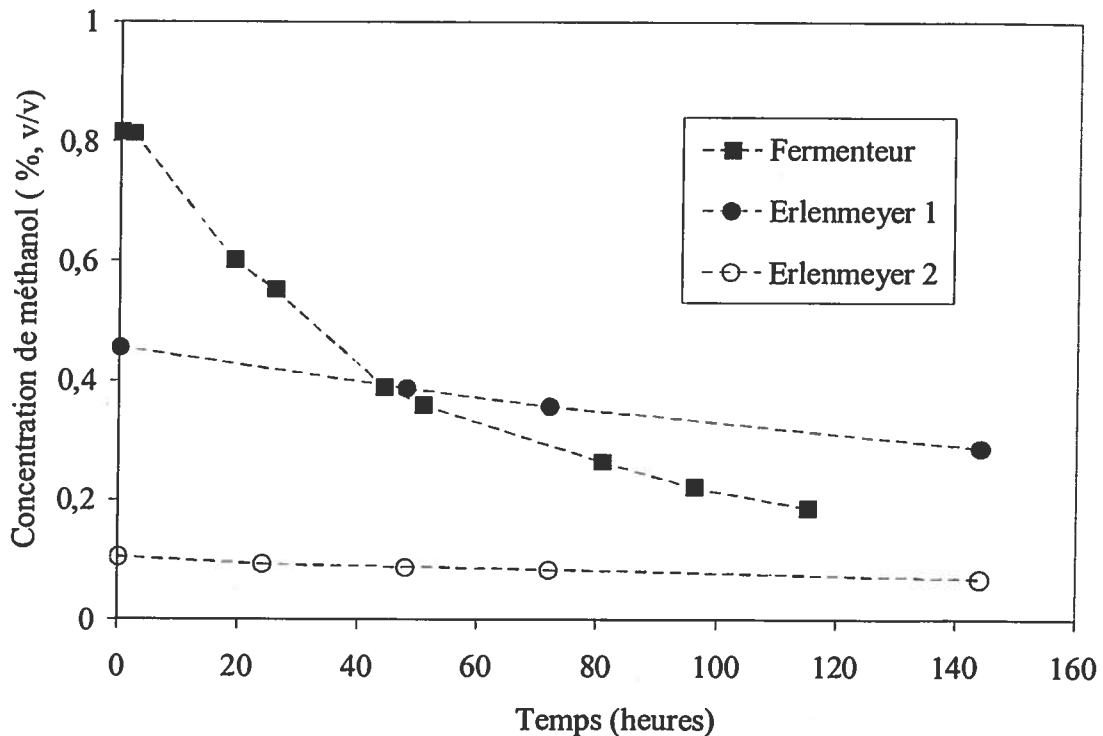


Figure A.3 : Évaporation du méthanol en Erlenmeyers et en bioréacteur de 20 L

Ces résultats permettent de faire les affirmations suivantes :

- ✧ Le méthanol s'évapore plus rapidement en bioréacteur qu'en Erlenmeyer. L'aération et l'agitation doivent être la cause de cette plus grande évaporation.
- ✧ Le méthanol s'évapore plus rapidement lorsque sa concentration dans le liquide est plus élevée (Erlenmeyer 1 versus Erlenmeyer 2).

APPENDICE G :

Évolution de la concentration en méthanol (% v/v) pour les fermentations en bioréacteur

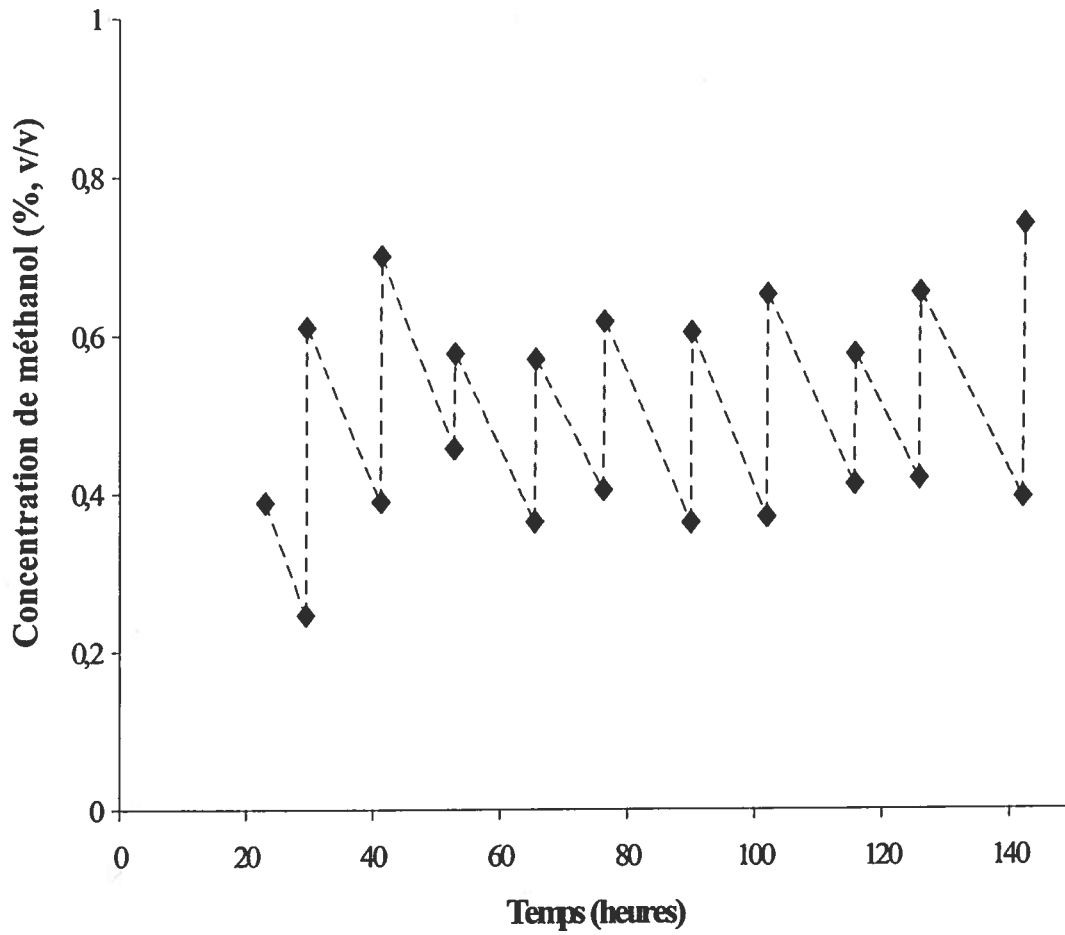


Figure A.4 : Évolution de la concentration en méthanol mesurée au GC lors de la fermentation F1

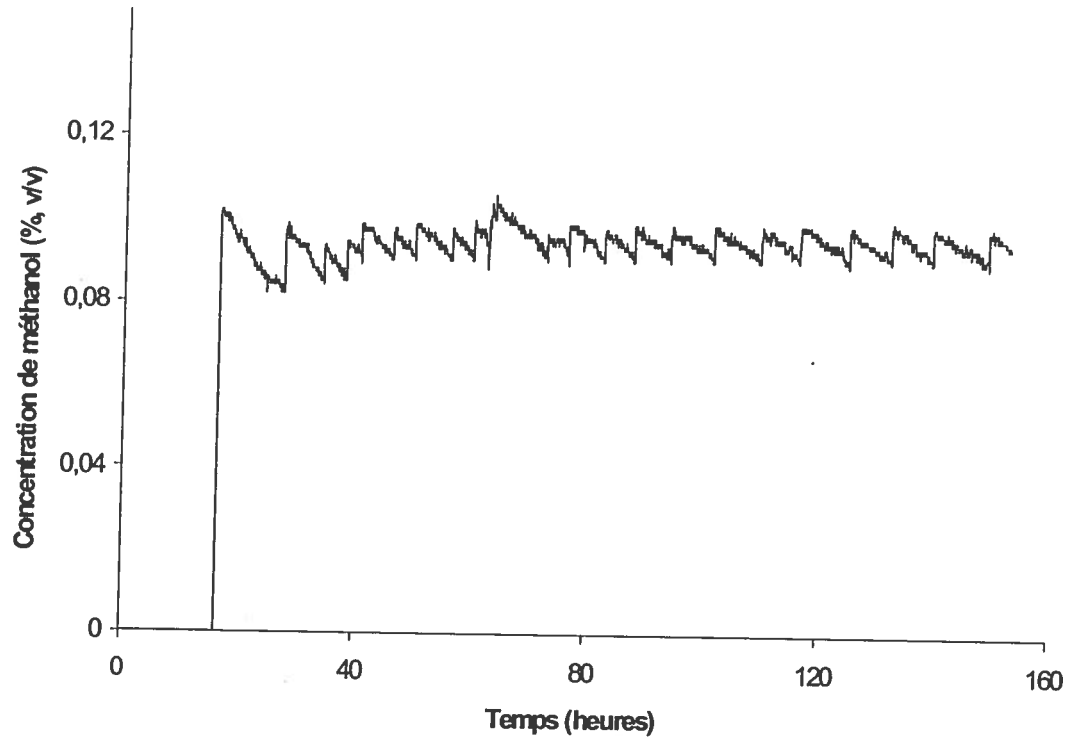


Figure A.5 : Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F2

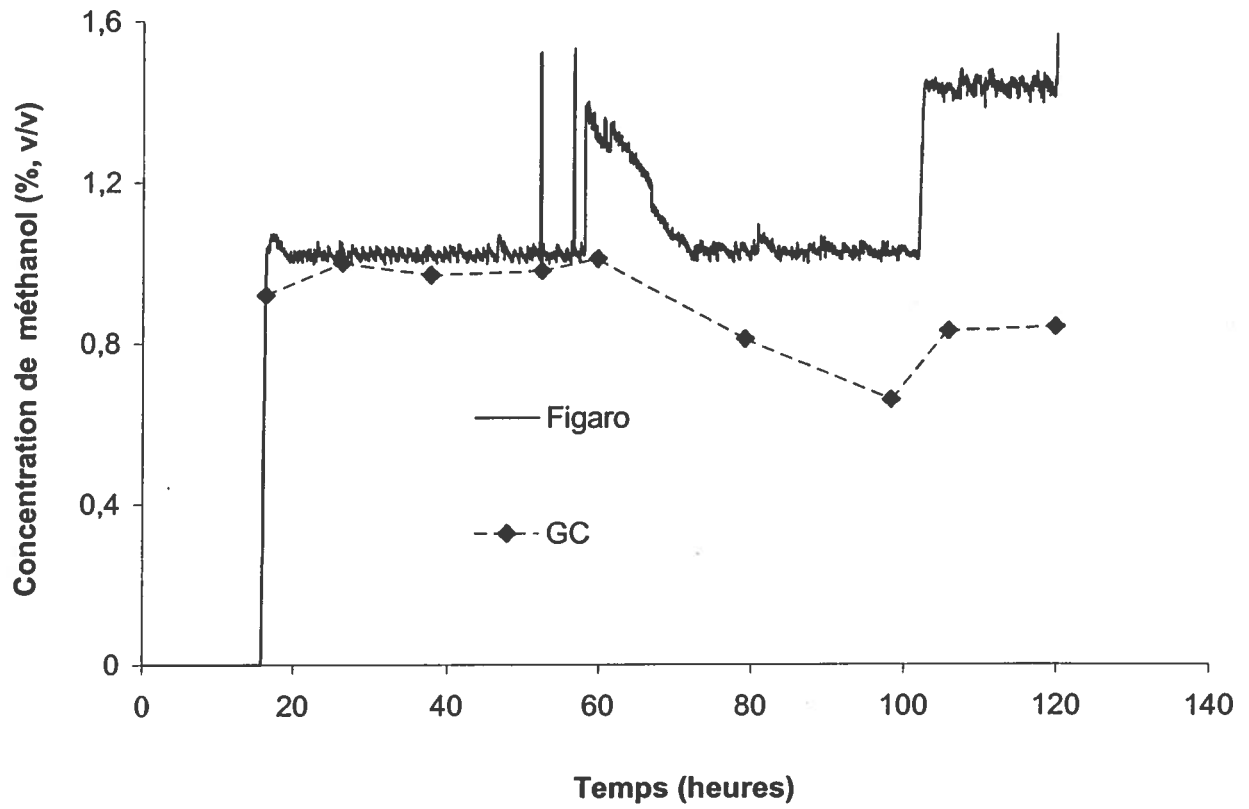


Figure A.6 : Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro et par GC lors de la fermentation F3

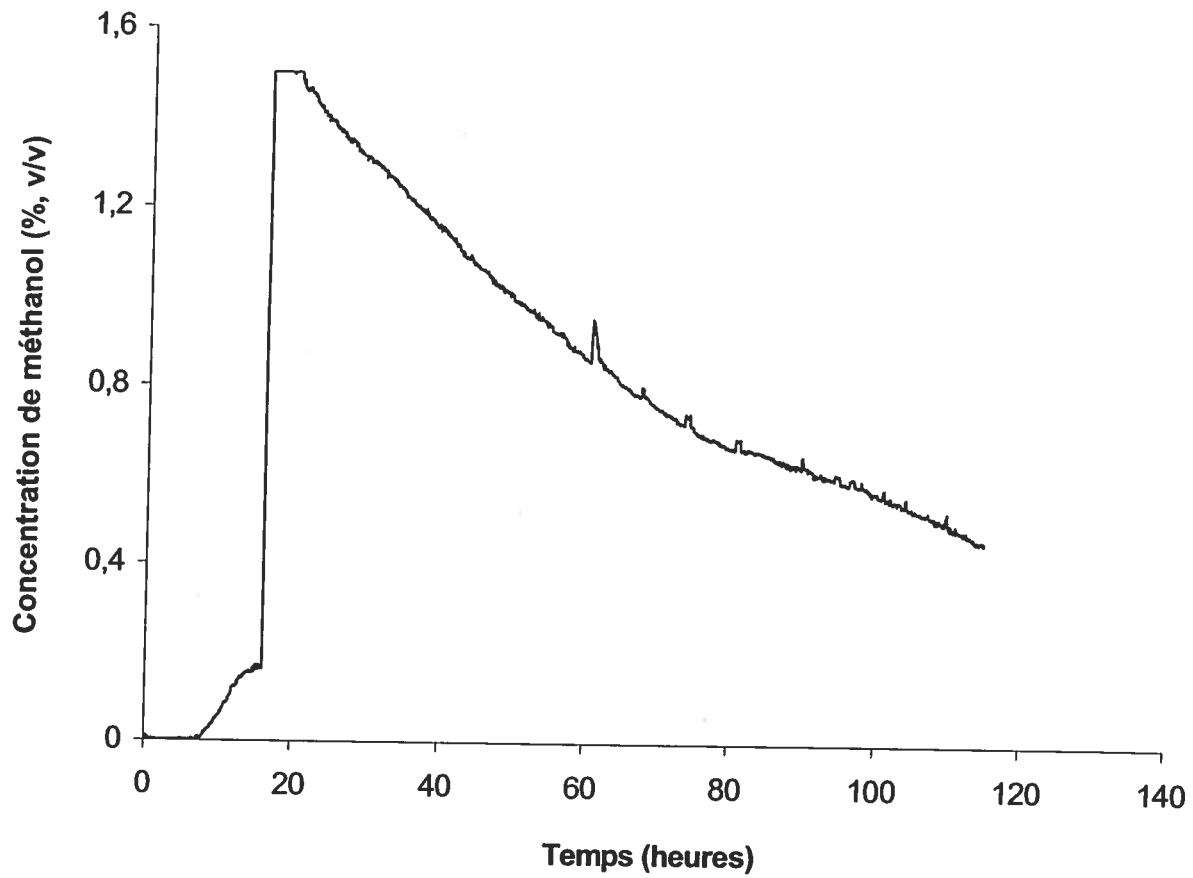


Figure A.7 : Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F4

Note : La concentration en méthanol de départ mesurée au GC était de 1 % (v/v)

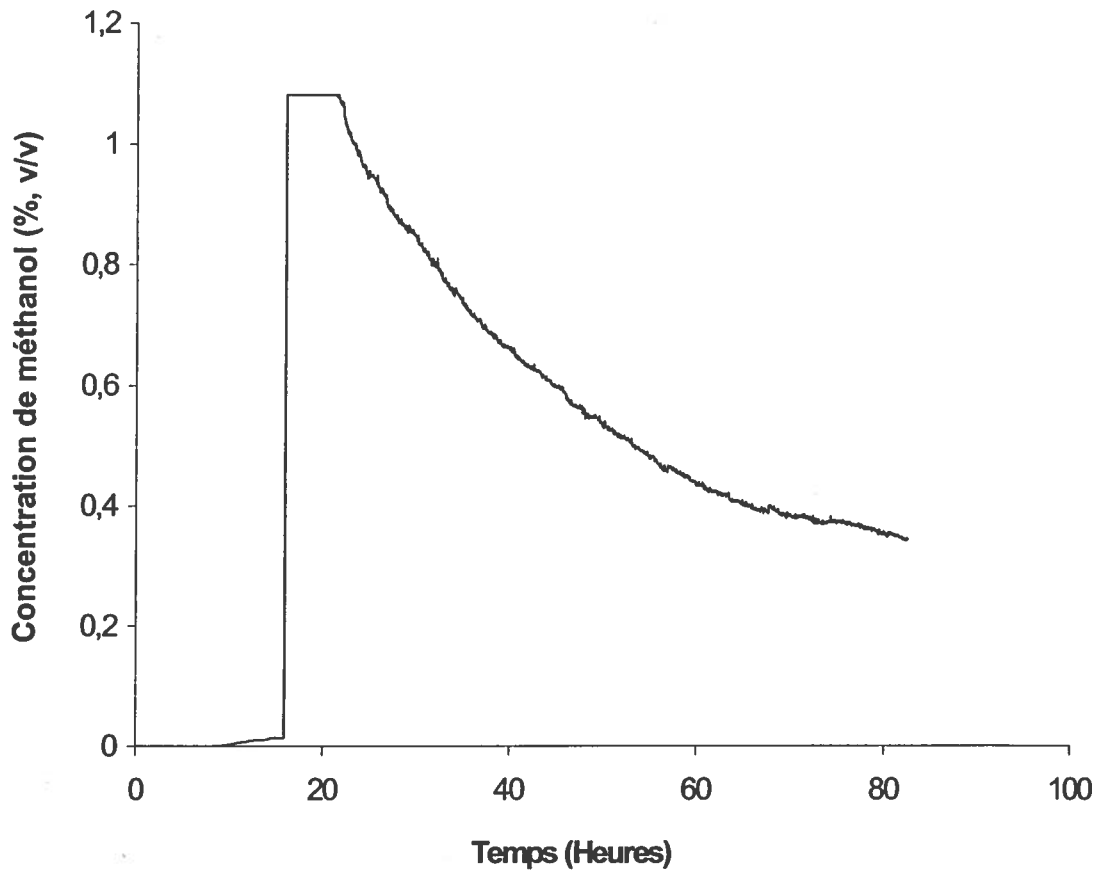


Figure A.8 : Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F5

Note : La concentration en méthanol de départ mesurée au GC était de 1 % (v/v)

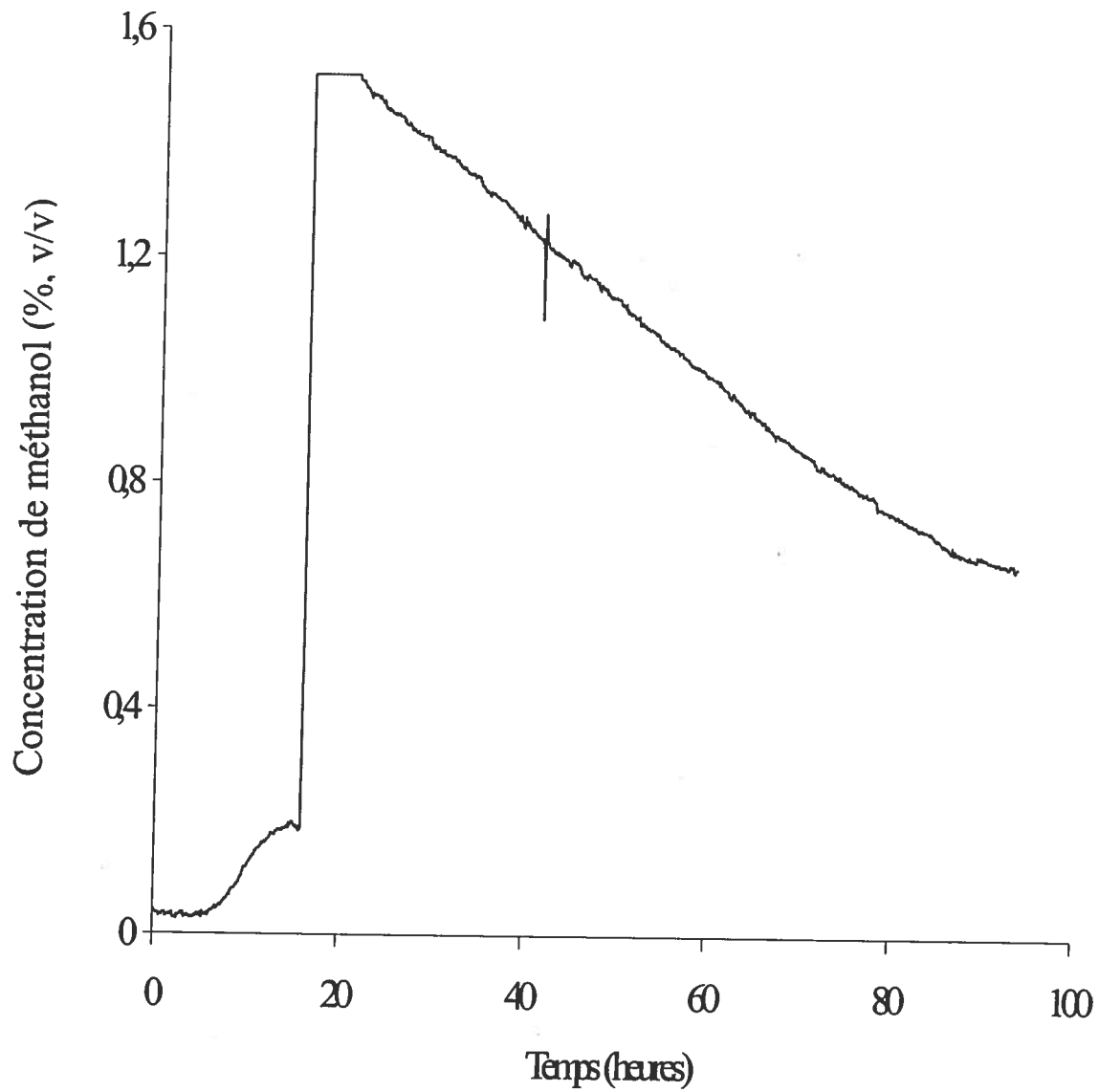


Figure A.9 : Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F6

Note : La concentration en méthanol de départ mesurée au GC était de 1 % (v/v)

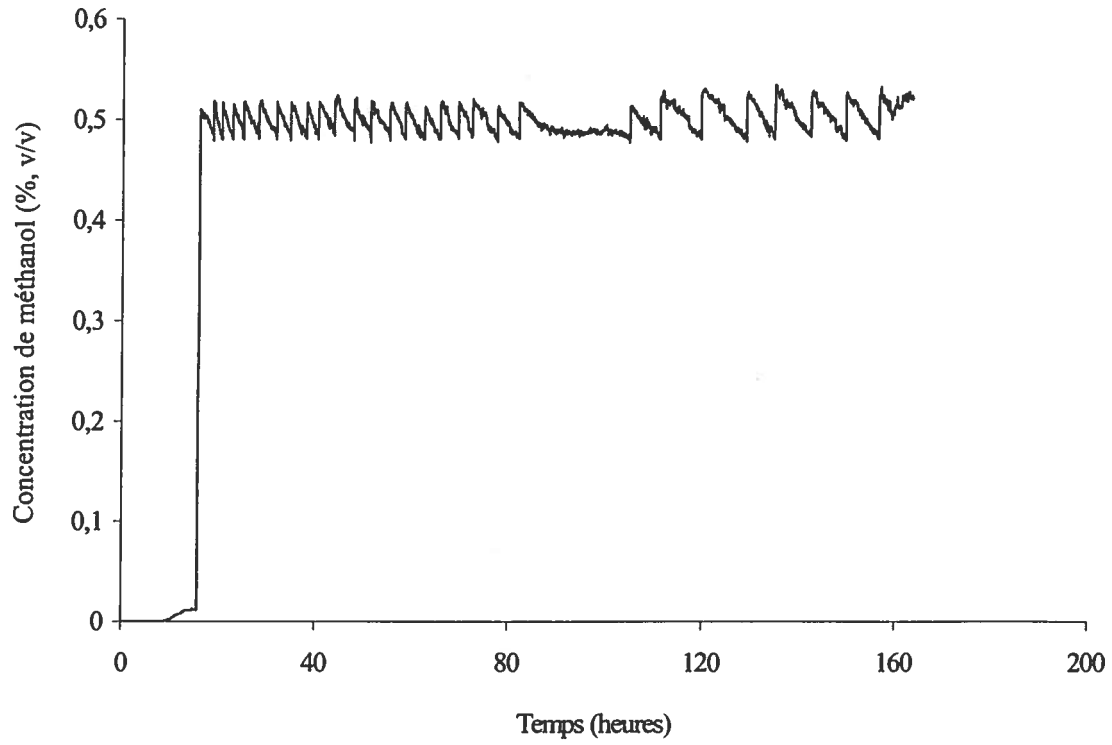


Figure A.10 : Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F7

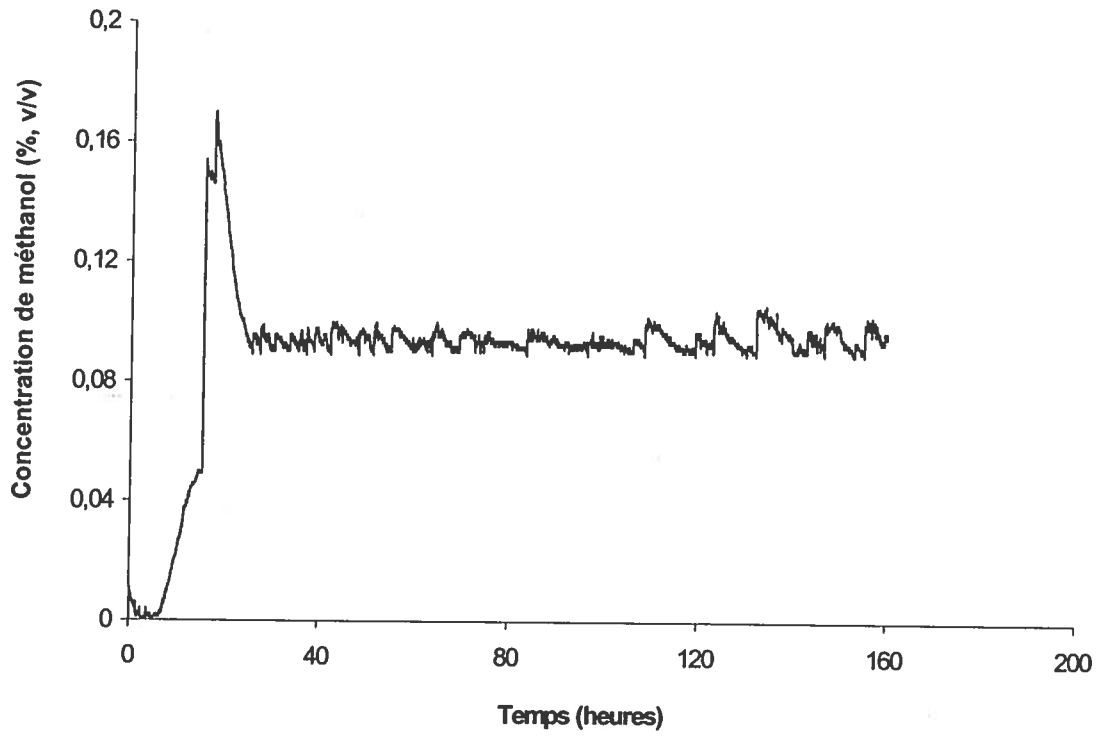


Figure A.11 : Évolution de la concentration en méthanol mesurée par la sonde Figaro lors de la fermentation F8

APPENDICE H**Gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Fermentation F8)**

Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des échantillons du surnageant de la culture en bioréacteur (F8)

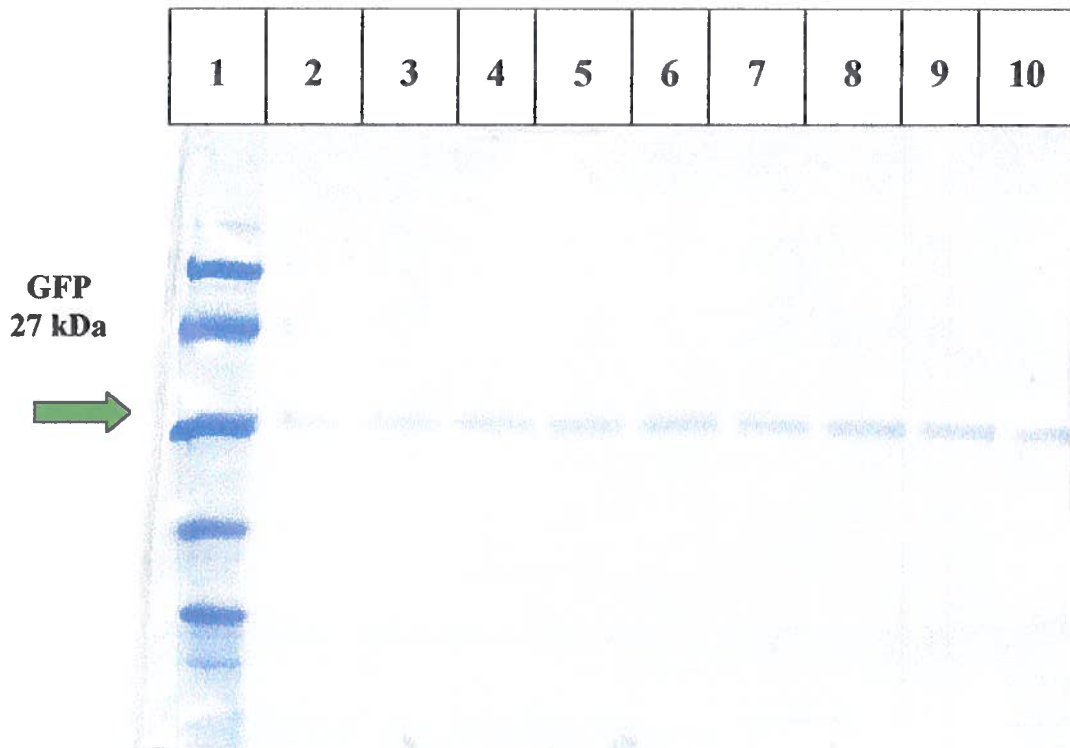


Figure A.12 : Reproduction d'un gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) du surnageant de culture de la souche C-20 lors de la fermentation F8 (1 : Standard de protéines de faibles poids moléculaire de Pharmacia, 2 : t = 20.34 h, 3 : t = 39.4 h, 4 : t = 51.5 h, 5 : t = 66.5 h, 6 : t = 90.5 h, 7 : t = 111.5 h, 8 : t = 119 h, 9 : t = 158 h)

LISTE DES RÉFÉRENCES

- ALBANO, C. R., L. Randers-Eichhorn, W. E. Bentley et G. Rao. 1998. «Green Fluorescent Protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production». Biotechnology Progress, vol. 14, p. 351-354.
- ALBERTS, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson. 1993. Biologie moléculaire de la cellule. Paris : Flammarion Médecine-Sciences.
- ANDERSEN, J.B., C. Sernberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov et S. Molin. 1998. «New unstable variants of Green Fluorescence Protein for studies of transient gene expression in bacteria». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, no. 6, p. 2240-2246.
- ARNOLD, W. N. 1981. Yeast cell envelopes : biochemistry, biophysics and ultrastructure. Florida : Boca Raton, p. 50-61.
- BIOPHARM. 1999. The Biopharm guide to fermentation and cell culture. Cleveland : Advanstar Communications.
- BOURQUE, D., Y. Pomerleau et D. Groleau. 1995. «High cell density production of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens* : Production of high molecular mass PHB». Microbiology and Biotechnology, vol. 44, p. 367-376.
- BROCK, T. D., et J. L. Madigan. 1996. Biology of micro-organisms. Englewood Cliffs : Prentice Hall.
- BRUIN, E.C., F. A. Wolf et N. C. M. Laane. 2000. «Expression and Secretion of human $\alpha 1$ (I) procollagen fragment by *Hansenula polymorpha* as compared to *Pichia pastoris*». Enzyme and Microbial Technology, vol. 26, p. 640-644.
- CAMELBEECK, J.-P., D. M. Comerbach, P. Coquette, Y. Dugardin, J. Johnson, V. Nalken, M. Orval, J. O. Pêtre et P. Roelants. 1992. «On-Line analysis and feedback control of methanol concentration in methylotrophic yeast fermentations». IFAC Modeling and Control of Biotechnical Processes. Colorado, p. 199-201.
- CENTRE CANADIEN D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ AU TRAVAIL. 2000. «Fiche du méthanol no FTSS 503689». Adresse HTTP : <http://cisti.CISTI55@ccinfoewb.cco>.
- CEREGHINO, J. L., et J. M. Cregg. 1999. «Applications of yeast in biotechnology : protein production and genetic analysis». Current Opinion in Biotechnology, vol. 10, p. 422-427.
- CEREGHINO, J. L., et J. M. Cregg. 2000. «Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*». FEMS Microbiology Reviews, vol. 24, p. 45-66.

- CHALFIE, M., Y. Tu, G. Eukirchen, W. W. Ward et D. C. Prasher. 1994. «Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression». Science, vol. 263, no. 5148, p.802-805.
- CHAUHAN, A. K., D., Arora et N. Khanna. 1999. «A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*». Process Biochemistry, vol. 34, p. 139-145.
- CHIRUVOLU, V., J. M. Cregg et M. M. Meagher. 1997. «Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentation». Enzyme and Microbial Technology, vol. 21, p. 277-283.
- CODY, C. W., D. C. Prasher, S. M. Westler, F. G. Prendergrast et W. W. Ward. 1992. «Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* Green Fluorescent Protein». Biochemistry, vol. 32, p.802-805.
- CREGG, J. M., et D. R. Higgins. 1995. «Production of foreign protein in the yeast *Pichia pastoris*». Canadian Journal of Botany, vol. 73, p. 5891-5897.
- CREGG, J. M., K. R. Madden, K.J. Barringer, G.P. Thill et C.A. Stillman. 1989. «Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*». Molecular and Cellular Biology, vol. 9, p.1316-1323.
- CREGG, J. M., T. S. Vedvick, et W. C. Raschke. 1993. «Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*». Biotechnology, vol. 11, p. 905-910.
- DABROWSKI, S., A. Brillowska et J. Kur. 1999. «Use of the Green Fluorescent Protein variant (YFP) to monitor MetArg human pro-insulin production in *Escherichia coli*». Protein Expression and Purification, vol. 16, p.315-323.
- DALE, C., A. Allen et S. Fogerty. 1999. «*Pichia pastoris* : A eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals». Biopharm, novembre, p. 36-42.
- ECAMILLA-TREVINO, L. L., J. M. Viader-Salvado, H. A. Barrera-Saldana et M. Guerrero-Olazarán. 2000. «Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*». Biotechnology Letters, vol. 22, p. 109-114.
- FABER, K. N., W. Harber, A. Gert et M. Veenhuis. 1995. «Review : Methylophilic yeast as factories for the production of foreign proteins». Yeast, vol. 11, p. 1331-1344.
- FERNANDEZ, J. M., et J. P. Hoeffler. 1999. Gene expression systems : Using nature for the art of expression. San Diego : Academic Press.
- GUARNA, M. M., G. J. Lensnicki, B. M. Tam, J. Robinson, C. Z. Radziminski, D. Hasenwinkle, A. Boratsom, E. Jervis, R. T. A. MacGillivray, R. F. B. Turner et D. G.

Kilburn. 1997. «On-line monitoring and control of methanol in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*». Biotechnology and Bioengineering, vol. 56, p. 279-284.

HAMPTON, Y. R. 2000. «ER stress response : Getting the UPR hand on misfolded proteins». Current Biology, vol. 10, p. 518-521.

HIGGINS, D. R. et J. M. Cregg. 1998. *Pichia* Protocols. Methods in Molecular BiologyTM. Totowa : Humana Press Inc.

HOHMANN, S. et W. H. Mager. 1997. Yeast Stress Response. Austin : Chapman et Hall.

HUMPHREY, A. 1998. «Shake flask to fermentor : What have we learned?». Biotechnology progress, vol. 14, p. 3-7.

INAN, M., V. Chirovolu, K. M. Eskridge, G. P. Vlasuk, K. Dickerson, S. Brown et M. M Meagher. 1999. «Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*». Enzyme and Microbial Technology, vol. 28, p. 362-369.

INVITROGEN, Carlsbad, California, USA. 1999. «EasySelectTM *Pichia* expression kit, Catalogue no.K1740-01». Adresse Internet : www.invitrogen.com

JAHIC, M., J. Mulder, M. Martinelle, K. Hult et S.-O. Enfors. 2000. «Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein». In Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells, Comparative View on Host Physiology : event 103 from European Federation of Biotechnology (Semmering, Autriche 5 au 8 octobre 2000).

JARA, P., J. J. Allais et J. Braratti. 1983. «Isolation and characterization of a methanol utilizing yeast with high cell yield». European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 17, p. 19-23.

JETTÉ, J.F., D. Bourque, L. Laramée, M. Pacheco-Oliver, R. Larocque, D. Tessier, C. Miguez et D. Groleau. 1999. «Rapid screening method for selecting high GFP secretion potential in recombinant yeast». In American Society for Microbiology, 99th General Meeting (Chicago, Illinois 30 mai au 3 juin).

JIMENEZ, R. E., K. Sanchez, H. Roca et J. M. Delgado. 1997. «Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase». Biotechnology Techniques, vol. 11, no. 7, p. 461-466.

KALISH, J. E., G.-A. Keller, J. C. Morrell, S. J. Mihalik, B. Smith, J. M. Cregg et S. J. Gould. 1996. «Characterization of a novel component of the peroxisomal protein import apparatus using fluorescent peroxisomal proteins». EMBO Journal, vol. 15, no. 13, p. 3275-3285.

- KATAKURA, Y., W. Zhang, G. Zhuang, T., Omasa, M. Kishimoto, Y. Goto et K.- I. Suga. 1998. «Effect of methanol concentration on the production of human b2-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris* : A simple system for the control of methanol concentration Using a semiconductor gas sensor». Journal of Fermentation Bioengineering, vol. 86, issue 5, p. 482-487.
- KAYSER, A., C. Desautels, D. Bourque, P. Lock et Denis Groleau. 2000. «Production of secreted Green Fluorescent Protein with *Pichia pastoris*». In Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells, Comparative View on Host Physiology : event 103 from European Federation of Biotechnology (Semmering, Autriche, 5 au 8 octobre 2000) affiche 22.
- KLEIN, C., F. Lamotte-Guéry, F. Gautier, G. Moulin, H. Boze, P. Joudrier et M. F. Gautier. 1998. «High-level secretion of a wheat lipid transfer protein in *Pichia pastoris*». Protein Expression and Purification, vol. 13, p. 73-82.
- MAEDA, Y., R. Kuroki, H. Suzukim, H. Reilander. 1999. «High-level secretion of biologically active recombinant human macrophage inflammatory protein 1a by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*». Protein Expression and Purification, vol. 18, p. 56-63.
- McALEER, B. et B. Rima. 2000. «Cloning and secreted expression of the extracellular domain of the mumps virus fusion protein in *Pichia pastoris*». Virus Genes, vol. 20, no. 2, p. 127-133.
- MELICHAR, H., I. Bosch, G. M. Molnar, L. Huang et A. B. Pardee. 2000. «Green Fluorescent Protein as a quantitative reporter of relative promoter activity in *E. coli*». Biotechniques, vol. 28, p. 82-89.
- MISTELI, T., et D. Spector. 1997. «Applications of the Green Fluorescent Protein in cell biology and biotechnology». Nature Biotechnology, vol. 15, p. 961-964.
- MONTESINO, R., R. Garcia, O. Quintero et J. A. Cremata. 1998. «Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*». Protein Expression and Purification, vol. 14, p. 197-207.
- MUSLIN, E. H., A. M. Kanikula, S. E. Clarck et C. A. Henson. 2000. «Overexpression, purification an characterization of a barley α -glucosidase secreted by *Pichia pastoris*». Protein Expression and Purification, vol. 18, p. 20-26.
- NEELEMAN, R., E. J. van den End et A. J. B. van Boxtel. 2000. «Estimation of the respiration quotient in a bicarbonate buffered batch cell cultivation». Journal of Biotechnology, vol. 80, p. 85-95.

- NIDENTHAL, R. K., L. Riles, M. Johnston et J. H. Hegemann. 1996. «Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast». Yeast, vol. 12, p. 773-786.
- PERARD, A.L. 2000. «Étude de la GFP (Green Fluorescent Protein) dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* comme un outil de diagnostic du procédé de fermentation». Mémoire de maîtrise, Montréal, École Polytechnique.
- POMERLEAU, Yves. 1990. «Modélisation et commande d'un procédé Fed-Batch de culture de levures à pain». Mémoire de doctorat, Montréal, École Polytechnique.
- POPPENBORG, L., K. Friehs et E. Flaschel. 1997. «The Green Fluorescent Protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring». Journal of Biotechnology, vol. 58, p. 79-88.
- PRESCOTT, Harley et Klein. 1995. Microbiologie. Bruxelles : De Boeck Université.
- QUANTUM BIOTECHNOLOGIES INC. 1997. Autofluorescence Proteins. AFP's™ Applications Manual.
- ROMANOS, M. 1995. «Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression». Current Opinion in Biotechnology, vol. 6, p. 527-533.
- ROMANOS, M., A. C. Scorer et J. J. Clare. 1992. «Foreign gene expression in yeast : a review». Virus Genes, vol. 20, no. 2, p. 127-133.
- SAKAI, Y., Y. Tani et N. Kato. 1999. «Biotechnological application of cellular fonctions of the methylotrophic yeast». Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic, vol. 6, p. 527-533.
- SHIMOMURA, O. 1981. «Resistivity to denaturation of the apoprotein of aequorin and reconstitution of the luminescent photoprotein from the partially denatured apoprotein». Biochemical Journal, vol. 119, p. 825-828.
- SIEGEL, R. S. et R.A. Brierley. 1989. «Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicule for recombinant protein production». Biotechnology and Bioengineering, vol. 34, p. 403-404.
- SIEDENBERG, D., S. Mestric, M. Ganzlin, M. Schmidt, P. J. Punt, H. Van Den, A. M. J. Cees et U. Rinas. 1999. «GlaA promoter controlled production of a mutant Green Fluorescent Protein (S65T) by recombinant *Aspergillus niger* during growth on defined medium in batch and fed-batch cultures». Biotechnology Progress, vol. 25, p. 43-50.
- SREEKRISHNA, K., R. B. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J.-T. Tsay, P. L. Smith, J. D. Wiershke, A. Subramaniam et L. A. Birkenberger. 1997. «Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*». Gene, vol. 190, p. 55-62.

- STANBURY, P. F., et A. Whitaker. 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon Press, p. 91-107.
- TAGGE, E., B. Harris, C. Burbage, P. Hall, J. Veseley, M. Willingham et A. Frankfel. 1997. «Synthesis of Green Fluorescent Protein-ricin and monitoring of it's intracellular trafficking». Bioconjugate Chemistry, vol. 8, p. 743-750.
- THORPE, E.D., M. C. d'Anjou et A. J. Daugulis. 1999. «Sorbitol as a non-repressing carbon for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*». Biotechnology Letters, vol. 21, p. 669-672.
- TSIEN, R. Y. 1998. «The Green Fluorescent Protein». Annual reviews Biochemistry, vol. 67, p. 509-544.
- TSIEN, R. Y. et A. Miyawaki. 1998. «Seeing the machinery of live cells». Science, vol. 280, p. 1954-1955.
- VAN DAM-MIERAS, M. C. E., W. H. de Jeu, J. de Vries, B. R. Currell, J. W. James, C. K. Leach et R. A. Patmore. 1992. In vitro cultivation of micro-organisms. Oxford : Butterworth-Hinemann Ltd.
- WARD, O. P. 1992. Fermentation Biotechnology. Chichester : Wiley Biotechnology Series.
- WAGNER, L. W., N. H. Matheson, R. F. Heisey et K. Schneider. 1997. «Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed-batch fermentation of *Pichia pastoris*». Biotechnology Techniques, vol. 11, no. 11, p. 191-195.
- WEGNER, G. J. 1990. «Emerging application of the methylotrophic yeasts». FEMS Microbiology Reviews, vol. 87, p. 279-284.
- WERTEN, M. W. T., T. J. Van Den Bosh, R. D. Wind, H. Mooibroeck et F. A. Wolf. 1999. «High-level secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*». Yeast, vol. 15, p. 1087-1096.
- WOOD, M. et E. Komives. 1999. «Production of large quantities of isotopically labeled protein in *Pichia pastoris* by fermentation». Journal of Biomolecular NMR, vol. 13, p. 149-159.
- YANG, F., L. G. Moss et G. N. Phillips. 1996. «The molecular structure of Green Fluorescent Protein». Nature Biotechnology, vol. 14, p.1246-1251.

YANG, T.-T., P. Sinai, G. Green, P. A. Kitts, Y.-T. Chen, L. Lybarger, P. Chervenak, G. H. Patterson, D. W. Pitson et S. R. Kain. 1998. «Improved fluorescent and dual color detection with enhanced blue and green variants of the Green Fluorescent Protein». Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 14, p. 8212-8216.

YINLIANG, C., J. Cino, G. Hart, D. Freedman et C. White. 1997. «High protein expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by a fed-batch process». Process Biochemistry, vol. 32, no. 2, p. 107-111.

ZABRISKIE, D. W., W. B. Armiger, D. H. Phillips et P. A. Albano. 1982. «Traders guide to fermentation media formulation». Document corporatif de Traders Protein.

