

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 579 994

(21) N° d'enregistrement national :

86 04683

(51) Int Cl⁴ : C 12 N 13/00, 11/00; C 12 P 7/02.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A

(22) Date de dépôt : 2 avril 1986.

(30) Priorité : IL, 3 avril 1985, n° 74792.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 41 du 10 octobre 1986.

(60) Références à d'autres documents nationaux appartenants :

(71) Demandeur(s) : Société dite : YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LTD. — IL.

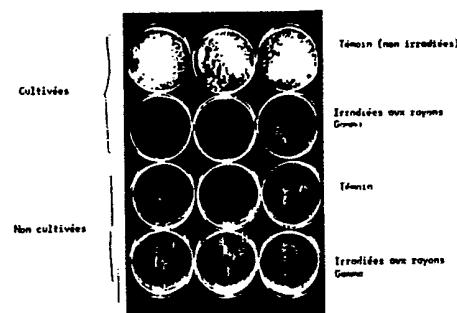
(72) Inventeur(s) : Esra Galun et Dvora Aviv.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Armand Kohn.

(54) Procédé pour la production de cellules dont la division a été arrêtée.

(57) Procédé pour la bioconversion de composés chimiques spécifiques, au moyen de cellules à division arrêtée. Ces cellules peuvent être en suspension, ou piégées dans une matrice appropriée, ou fixées à un substrat. L'arrêt de la division des cellules est effectué par irradiation réglée de manière à arrêter sensiblement la division des cellules, sans affaiblir toutefois à un degré notable la capacité de bioconversion de ces cellules. Les cellules utilisées peuvent être des cellules végétales, des levures, des bactéries ou tout autre type de cellule appropriée à la bioconversion désirée.



La présente invention se rapporte à un procédé pour la bioconversion de certains composés chimiques précurseurs en produits désirés, au moyen de cellules dont la division a été arrêtée.

5 La division des cellules est arrêtée par irradiation de ces cellules au moyen de rayons X, de rayons gamma ou d'un autre rayonnement capable d'arrêter sensiblement la division des cellules. On choisit la dose de rayonnement de manière à arrêter la division des cellules,

10 10 la capacité des cellules à effectuer des bioconversions n'étant toutefois pas sensiblement affaiblie . Cela est contraire aux prévisions de la technique puisqu'on admet généralement que, lorsque l'arrêt de la division des cellules est obtenu par un rayonnement électromagnétique, il

15 15 en résulte également une diminution importante ou même une disparition de la capacité des cellules à engendrer des bioconversions.

On peut utiliser une grande variété de cellules, cellules de plantes, bactéries, cellules de levures, celles provenant de mammifères, etc. On peut utiliser les cellules en suspension ou bien elles peuvent être emprisonnées dans une matrice appropriée ou fixées à un support approprié. Elles peuvent être emprisonnées dans des grains de polymère. On a établi que le procédé de l'invention convient pour des conversions au stade industriel. Les cellules à division arrêtée peuvent être utilisées pendant de longues durées, dans des procédés par lots ou des procédés de conversion continue.

La production de composés organiques par des 30 cellules vivantes est aussi ancienne que l'histoire humaine. On peut donner comme exemple la fermentation du sucre en éthanol et la préparation de pain levé. Plus particulièrement, on utilise beaucoup des cellules de plante cultivées in vitro pour la production de composés organiques de valeur, tels que des parfums, des produits pharmaceutiques

et des essences (voir par exemple Staba, E.J. Devel. Micro. 4, 192-198 (1963); Kurz et al., Adv. Appl. Microbiol. 25 209-240 (1979)). La production de tels composés par des cellules cultivées peut être effectuée suivant deux techniques principales : sans introduction d'un précurseur spécifique, et avec addition aux cellules cultivées de précurseurs spécifiques qui sont biotransformés en produits de valeur (Reinhard et al., Adv. Biochem. Eng. 16, 50-83 (1980) ; Shargool, P.D., Appl. Biochem. Biotech. 7 (1982)).

L'utilisation industrielle de cellules de plante et d'autres cellules par l'une ou l'autre des techniques ci-dessus a été générée par plusieurs difficultés, notamment :

- (1) les cellules en suspension libre sont inférieures aux cellules immobilisées, dans les biotechnologies avancées (Brodelius et al., Adv. Appl. Micro. 28, 1-26 (1982) ;
- (2) les cellules cultivées à division normale nécessitent, parmi d'autres composants du milieu, une alimentation constante en composés organiques coûteux pour maintenir l'activité métabolique intervenant dans la division des cellules, ce qui accroît les coûts de production ;
- (3) lorsque des cellules cultivées in vitro avec division sont immobilisées dans des polymères (par exemple des grains d'alginate), les cellules tendent à se libérer progressivement du piégeage, ce qui engendre un mélange de cellules immobilisées et de cellules en suspension libre ; un tel mélange nuit à l'application biotechnologique efficace de ces cellules pour la production de composé organique.

Un procédé capable de conserver la capacité des cellules cultivées à produire et/ou transformer un composé organique spécifique, mais qui empêche la division des cellules, éviterait les difficultés précitées. L'arrêt de la division des cellules par addition d'inhibiteurs métaboliques et/ou par manque d'alimentation en certains composants du milieu est indésirable pour plusieurs raisons (introduction de composés toxiques dans le système, changements mé-

taboliques importants, etc.).

L'arrêt de la division des cellules par irradiation, par exemple au moyen de rayons X, rayons gamma et autres rayonnements électromagnétiques et de particules, 5 est un phénomène bien connu pour les cellules végétales, animales et microbiennes (Lea, D. E. Action of Radiation on Living Cells (2ème Edition), University Press, Cambridge, (1955)). On n'a pas utilisé jusqu'à présent de cellules de plantes, animaux ou microorganismes dont la division 10 a été arrêtée par irradiation, dans le cas de la biotechnologie industrielle de biotransformation et de production de composés organiques. La présente invention procure un procédé simple et d'application générale pour arrêter la division des cellules tout en conservant l'aptitude de 15 ces cellules à la biotransformation et à la production de composés organiques spécifiques.

Conformément à l'invention, on obtient un procédé pour la transformation à l'échelle industrielle de composés chimiques, au moyen de cellules à division arrêtée. 20

Les cellules sont avantageusement traitées par des rayons X ou des rayons gamma de façon à arrêter la division des cellules sans affaiblir leur capacité à effectuer des bioconversions.

25 Contrairement à ce qui était admis jusqu'à présent, l'arrêt de la division des cellules par de tels moyens ne réduit pas nécessairement sensiblement les capacités de bioconversion de ces cellules traitées.

L'invention est applicable à une grande variété 30 de cellules, par exemple cellules de plantes, cellules de levures, cellules de bactéries, cellules de vertébrés, etc. Le rayonnement utilisé pour arrêter la division de ces cellules peut être de divers types, par exemple rayonnement électromagnétique, irradiation par des particules, etc. Les rayonnements préférés sont les rayons gamma 35

et les rayons X de différentes longueurs d'onde et intensités. Dans ce qui suit, l'invention est illustrée avec référence à des cellules de plante, de levure, de bactéries et de mammifère. Il est entendu que c'est seulement à titre d'illustration et que l'invention s'applique à une grande variété d'autres cellules.

Des cellules, obtenues par des moyens connus (Reinert et al. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, p. 803, Springer Verlag, Berlin, (1977)) à partir d'un extrait de plante de Mentha sp., Nicotiana sp., d'autres plantes ou d'autres organismes, sont suspendues dans un milieu liquide, tel que B5 (Gamburg et al., *Exp. Cell Res.* 50, 151, (1968)) ou un autre milieu nutritif analogue approprié au type de cellule donné. On conserve les cellules ainsi cultivées et on les développe dans des cultures à secouage ou par tout autre moyen permettant d'apporter des conditions de croissance pour ces cellules de plante. On dilue périodiquement les cellules par apport de milieu nutritif, au moyen de techniques usuelles qui sont largement décrites dans la littérature correspondante (par exemple, Reinert et Bajaj, *ibid* (1977) ; Shargool, *ibid.* (1982)). Pour l'utilisation dans la production de composés biochimiques spécifiques (par exemple Staba, *ibid.* (1963)) ou pour la biotransformation d'un précurseur spécifique en un produit spécifique (Reinhard et Alfermann, *ibid.* (1980)) par la procédure habituellement utilisée, on transfère les cellules dans un milieu de production ou un milieu de transformation, respectivement. Ce dernier contient le précurseur pour la biotransformation. Pour la transformation de (-) menthone en (+) néomenthol par Mentha ligne 193, en suspension libre, on ajoute 20 à 80 mg/l de menthone au milieu de transformation constitué de composants B5 de Gamborg et on conserve les cellules en culture à secouage, à des températures comprises entre 23 et 27°C (Aviv et al., *Planta Medica*, 42, 236-243 (1981)). Les techniques de bio-

transformation peuvent être appliquées de façon analogue à d'autres cellules, d'origine végétale (Reinhard et Alfermann, *ibid.* (1980)) ou provenant d'autres organismes, ainsi que pour la production directe de substances biochimiques. Conformément au procédé de la présente invention, on expose les cellules (avant utilisation pour la biotransformation ou la production) à une irradiation, à une dose qui arrête pratiquement la division des cellules. La dose respective pour les cellules Mentha et Nicotiana est 5 de 50 krad mais d'autres doses peuvent s'appliquer pour des cultures de cellules spécifiques. Le rayonnement gamma est fourni par une source de cobalt⁶⁰, par exemple une machine Cobalt 60, G.B. 150A, Atomic Energy of Canada, et l'irradiation aux rayons X est fournie par une machine 10 de Roentgen émettant des rayons X. La première source est préférable car elle demande beaucoup moins de temps. Après 15 l'irradiation, on lave les cellules une première fois dans le milieu de culture approprié et on les maintient en culture à secouage pendant plusieurs heures (habituellement, 18 à 24 h) avant de les relaver et de les exposer ensuite 20 au précurseur pour biotransformation ou pour production suivant des techniques connues (par exemple Shargool, *ibid* (1982)). On laisse ensuite incuber les cellules irradiées, pendant le processus de biotransformation ou de production, 25 sous la forme de cellules en suspension libre ou de cellules piégées et immobilisées par des techniques connues (par exemple Brodelius et Mosbach, *ibid.* (1982) ; Galun et al., *Planta Medica* 49, 9-13 (1983)). On utilise généralement une technologie de culture par cuvée ou par secouage, mais le 30 procédé de la présente invention peut également être appliqué à des cellules dans des réacteurs à colonne ou des réacteurs à flux continu.

Dans la technologie de culture par cuvée, on peut séparer le milieu des cellules après incubation et on lave 35 les cellules et on les maintient pendant 6 heures ou plus

dans un milieu nutritif ; on effectue ensuite un cycle de production supplémentaire et on peut répéter cette procédure plusieurs fois avec ou sans détérioration limitée de la capacité de biotransformation et/ou de production des 5 cellules irradiées. Dans les incubations uniques, multiples ou continues, on sépare le milieu liquide des cellules par l'un des procédés habituels (généralement par centrifugation) et on extrait le produit du milieu liquide.

Les exemples spécifiques ci-après montrent que 10 les cellules dont la division a été arrêtée conservent leur aptitude à engendrer des conversions biochimiques. Ces exemples sont illustratifs et non limitatifs.

EXEMPLE 1

Pour vérifier la capacité de cellules Mentha, 15 dont la division de cellule a été arrêtée, à transformer la (-) menthone en (+) néomenthol, on procède à l'expérience ci-après. On conserve des cellules Mentha souche 193 en culture par secouage sur un milieu B₅ modifié (Aviv et al., ibid.(1981)) et on les transfère chaque semaine sur un mi- 20 lieu neuf. On constitue ainsi les cultures de base. Toutes les opérations jusqu'à l'extraction des produits sont exécutées dans des conditions axéniques. Pour l'irradiation par les rayons gamma, on prélève les cellules de la culture de base, on les lave une fois dans B₅, on les remet en sus- 25 pension dans B₅ jusqu'à une densité de 50% en volume et on les transfère dans des flacons Erlenmeyer de 500 ml. On expose les flacons à une dose de 50 krad de rayons gamma, au moyen d'une machine Cobalt 60, G.B. 150A Atomic Energy Canada, à la vitesse de 3 krad par minute, et on remet en- 30 suite en suspension dans le milieu B₅. Pour évaluer l'effet d'arrêt de division produit par l'irradiation, on étale des échantillons de 1 ml de cellules irradiées, dans des cuvettes de Pétri en matière plastique de 9 cm, sur un milieu B₅ solidifié (à 1,0% d'agar). En parallèle, on appli- 35 que de la même façon des cellules non irradiées (témoin non

irradié). On fait ensuite incuber les plaques (dans l'obscurité) à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ou bien on les transfère au froid ($2-4^\circ\text{C}$) comme témoins non cultivés. Après 12 jours, on évalue la croissance des cellules sur plaque. Chacun des quatre groupes de traitement (irradié et cultivé, non irradié et cultivé, irradié et stocké au froid, non irradié et stocké au froid) comprend quatre plaques. Sur les quatre traitements, seules les cellules non irradiées et cultivées se sont divisées et ont rempli la surface des plaques (figure 1), ce qui démontre l'efficacité du rayonnement gamma pour arrêter la division des cellules.

Pour l'évaluation de la capacité de transformation de cellules Mentha à division arrêtée, les cellules irradiées respectives, obtenues par le procédé décrit plus haut en détail, sont transférées dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml et mises en suspension dans 100 ml (volume total) de milieu liquide B₅ à une densité de 30% en volume, et on ajoute 20 l d'une solution de menthone dans l'éthanol à 100 mg/ml. En parallèle (témoin), on met en suspension des cellules non irradiées, avec du menthone, de la même manière. Les suspensions sont ensuite maintenues sur un dispositif à secouage tournant (120 t/mn) à $25 \pm 2^\circ\text{C}$. On extrait périodiquement des échantillons et on détermine leur composition en monoterpène par la méthode usuelle de chromatographie gaz-liquide (Aviv et al., ibid. (1981), Galun et al., ibid. (1983)). Les cinétiques de la conversion de menthone en néomenthol, illustrées sur la figure 2, démontrent clairement que les cellules Mentha, irradiées aux rayons gamma (dans lesquelles la division de cellule a été arrêtée comme le montre la figure 1), ont conservé leur capacité de conversion.

EXEMPLE 2

Pour vérifier si la capacité de biotransformation est ou non conservée dans des cellules à division arrêtée qui sont immobilisées, on procède à l'expérience ci-après.

On utilise la même base de cellules Mentha que dans l'exemple 1. La conversion de menthone en néomenthol sert à démontrer la capacité de biotransformation. Le système de transformation à cellules en suspension libre, irradiées ou non aux rayons gamma, est le même que dans l'exemple 1 mais on ajoute 5 mg de menthone à chaque flacon.

La procédure d'immobilisation est conforme à la spécification donnée par Galun et al. ibid. (1983), avec certaines modifications comme suit. On cultive une base de Mentha souche 193, jusqu'à une densité de 30% en volume tassé.

On filtre ensuite les cellules sur un filtre "Nalgi" de 0,45 µm, on les lave une fois avec du milieu B₅ sur le même filtre et on utilise 15 g de cellules, séchées par filtrage, pour l'immobilisation avec le polymère. On met en suspension 1,5 g d'un hydrazide de polyacrylamide linéaire (PAAH) dans 50 ml d'eau, on stérilise à chaud et on refroidit à 20°C. La suspension stérile refroidie de PAAH est ensuite mélangée, sur de la glace, avec les cellules séchées par filtrage et on ajoute une quantité stoechiométrique (soit 4 ml d'une solution à 5%) de glyoxal, sous agitation vigoureuse, de manière à réticuler le PAAH et à provoquer le piégeage des cellules. On laisse durcir le gel pendant 15 minutes, on le découpe en cubes de 0,3 cm³ environ et on laisse à nouveau durcir. Le gel est ensuite chassé à travers une seringue usuelle (sans l'aiguille) de manière à former des grains qui sont lavés une fois dans du milieu B₅ puis mis en suspension dans un volume total de 100 ml dans un Erlenmeyer de 250 ml. Finalement, on ajoute 5 mg de menthone, à partir d'une solution dans l'éthanol, et on fait incuber les flacons sur un dispositif à secouage rotatif (120 t/mn) à 25°C. On applique la même procédure à des cellules traitées aux rayons gamma, obtenues comme dans l'exemple 1.

Chacun des quatre traitements - (1) non-irradié
35 et en suspension libre ; (2) irradié et en suspension libre;

(3) non irradié et emprisonné dans le PAAH ; (4) irradié et emprisonné dans le PAAH - est exécuté en double. On prélève périodiquement des échantillons et on détermine leur composition en monoterpène, comme dans l'exemple 1.

5 Les résultats sont reportés sur la figure 3. Les expériences en double donnent des résultats similaires (voir sur la figure 3 les courbes pour les cellules irradiées et en suspension libre, pour lesquelles les résultats sont présentés séparément pour chacun des deux flacons, et non en 10 valeur moyenne comme pour les trois autres traitements). Il est clair que les cellules irradiées aux rayons gamma, aussi bien lorsqu'elles sont piégées qu'en suspension libre, conservent leur capacité de biotransformation, ce qui complète et étend les résultats de l'exemple 1.

15 EXEMPLE 3

Afin de vérifier si les cellules à division arrêtée peuvent ou non effectuer une biotransformation répétée, on procède à l'expérience ci-après. Des suspensions de cellules sont préparées et irradiées aux rayons gamma, comme 20 dans l'exemple 1. On fait incuber des suspensions de cellules dans quatre flacons avec du menthone, pendant 18 heures. On récolte ensuite les deux flacons et on détermine la composition en monoterpène (extraction totale d'une journée) et les cellules des deux autres flacons sont séparées 25 des milieux par centrifugation. On analyse les milieux pour déterminer les monoterpènes (extrait de milieu + 1 jour) et les cellules sont remises en suspension dans du milieu B₅ pendant 30 heures. On ajoute alors du menthone (5 mg par flacon) aux cellules en suspension et on fait incuber 30 les cellules à nouveau pendant 18 heures. On sépare alors les cellules du milieu, comme ci-dessus, et on détermine la composition en monoterpène (extrait de milieu + 3 jours). On remet en suspension les cellules dans du milieu B₅ pendant 30 heures. On ajoute ensuite du menthone (5 mg par 35 flacon) aux cellules en resuspension et on fait incuber les

deux flacons une troisième fois pendant 18 heures. On sépare alors le milieu et on détermine par analyse la composition en monoterpène du milieu, comme ci-dessus (extrait de milieu + 5 jours).

D'autre part, deux flacons contenant des cellules irradiées aux rayons gamma sont entretenues sur un dispositif à secouage rotatif, à 25°C pendant 6 jours. On ajoute ensuite 5 mg de menthone et on fait incuber les flacons pendant 18 heures. On analyse alors le contenu des 10 flacons pour la composition en monoterpène, comme dans l'exemple 1 (extrait total + 6 jours). Les chromatographies gzz-liquide des analyses sont représentées sur la figure 4. Les résultats montrent que les cellules irradiées aux rayons gamma sont capables de biotransformations multiples et que ces cellules peuvent être conservées en cultures par secouage pendant 6 jours sans affaiblissement de leur capacité de biotransformation.

EXAMPLE 4

Afin de déterminer si la rétention de la capacité de biotransformation de cellules à division arrêtée est ou non limitée aux cellules Mentha et à la conversion de menthone en néomenthol, ou si la capacité de biotransformation de cellules à division arrêtée est un phénomène général, on procède à la biotransformation de géraniol en produits de conversion, avec des cellules Mentha et Nicotiana irradiées aux rayons gamma.

On prépare des flacons Erlenmeyer (250 ml) contenant 100 ml de suspensions de cellules de Mentha souche 193 irradiées aux rayons gamma, comme dans l'exemple 1. On prépare également des flacons semblables, avec 100 ml d'une suspension de cellules Nicotiana sylvestris souche SH irradiées aux rayons gamma. De plus, on prépare de tels flacons avec des cellules irradiées aux rayons gamma et piégées au PAAH de Mentha souche 193 et de Nicotiana sylvestris souche 35 SH.

- Chacune des quatre suspensions de cellules irradiées : (1) Mentha en suspension libre, (2) Mentha piégée au PAAH, (3) Nicotiana en suspension libre, (4) Nicotiana piégée au PAAH, est ensuite traitée de la manière ci-après.
- 5 On ajoute 10 mg de géraniol par flacon et on fait incuber le flacon pendant 6 heures (cellules Mentha) ou pendant 13 heures (cellules Nicotiana) sur un appareil rotatif à secouage, à 25°C. On extrait le milieu et on l'analyse pour déterminer les monoterpènes (comme dans l'exemple 3), puis
- 10 on remet les cellules en suspension dans 100 ml de milieu B₅, dans des flacons de 250 ml traités par secouage comme ci-dessus pendant 18 heures (Mentha) ou 9 heures (Nicotiana). On ajoute ensuite 10 mg de géraniol, on procède à une deuxième transformation comme ci-dessus et on analyse
- 15 le milieu pour les monoterpènes, comme ci-dessus. On répète le processus une fois (Mentha) ou deux fois (Nicotiana), ce qui donne au total 3 ou 4 biotransformations consécutives avec les cellules Mentha ou Nicotiana. Les chromatographies gaz-liquide sont représentées sur les figures 5 et 6
- 20 pour les cellules Mentha et Nicotiana irradiées aux rayons gamma, respectivement.

Les cellules Mentha et Nicotiana irradiées aux rayons gamma sont capables d'effectuer des biotransformations multiples de géraniol, avec peu ou pas de perte de 25 capacité de conversion. Seules, les cellules Mentha en suspension libre et irradiées aux rayons gamma perdent une partie de cette capacité de conversion à la troisième passe de biotransformation. Cette capacité de conversion est totalement conservée par les cellules irradiées aux rayons gamma 30 et piégées au PAAH, aussi bien pour Mentha que pour Nicotiana.

EXEMPLE 5

Afin de déterminer si la conservation de la capacité de biotransformation existe également pour des micro-35 organismes dans lesquels la division des cellules est ar-

rêtée par irradiation aux rayons gamma, on applique le procédé à une levure (Saccharomyces cerevisiae). On expose des cellules de levure de souche Y-567 à une dose de rayons gamma de 400 krad, ce qui provoque un arrêt de division à 5 99,5%, puis on les met en suspension à une densité de 4 mg de cellules séchées par ml de milieu contenant 10% de glucose. Des cellules de levure non irradiées sont mises en suspension comme ci-dessus, pour servir de témoin. Les suspensions sont entretenues en cultures à secouage à 30°C.

10 On extrait périodiquement des parties aliquotes pour analyser les concentrations en glucose et éthanol pendant l'incubation. Les cellules de levure à division arrêtée conservent leur capacité de fermentation de glucose en éthanol (figure 7) et donnent une fermentation initiale plus rapide 15 que les cellules de levure du témoin (non irradiées).

EXEMPLE 6

Afin de déterminer si la capacité de biotransformation est ou non également conservée par des bactéries dans lesquelles la division de cellule a été arrêtée par 20 irradiation aux rayons gamma, on procède à un essai avec Mycobacterium NRRL 3805. Cette souche de Mycobacterium sature la liaison $\Delta 1$ du 1,4-androstadiène 3,17-dione (ADD). 50 mg de bactéries à l'état frais (8,4 mg. de poids sec) sont (1) non irradiées (témoin), (2) irradiées à une dose 25 de 500 krad de rayons gamma. Les bactéries sont mises en suspension dans un tampon phosphate 0,05 M, pH 7,0 et 0,1 μ U de ADD. On fait incuber les suspensions sur un appareil à secouage (130 t/mn) à 30°C. On prélève des échantillons pour l'analyse HPLC de phase inverse du produit (AD).

30 On obtient les résultats ci-après, exprimés en μ M de produit.

Temps	1h	2h	3h	4h	5h
non irradiées	5,95	11,57	16,28	20,86	25,73
irradiées aux 35 rayons gamma	5,92	10,86	17,26	22,94	24,57

La pente calculée pour les bactéries non irradiées et irradiées aux rayons gamma est de 5,09 et 5,15 respectivement, ce qui correspond à un rendement relatif total de 100% et 101,2% pour les bactéries non irradiées et irradiées, respectivement. Par conséquent, les bactéries dans lesquelles la division des cellules a été arrêtée par irradiation aux rayons gamma conservent complètement leur capacité de transformation stéroïde.

EXEMPLE 7

Afin de vérifier la capacité de cellules de mammifères, à division arrêtée par irradiation, à engendrer la bioconversion d'un métabolite spécifique, on applique des cellules de murin de souche P388D1, de type macrophage, à raison de 4×10^5 cellules par plaque environ. Après 4 jours de croissance, un groupe de plaques est irradié aux rayons gamma (15 krad) pour arrêter la division des cellules. Un autre groupe de plaques (témoin) n'est pas irradié. Le milieu est changé dans chacune des plaques et on ajoute de l'acide arachidonique (3 μM). On extrait le milieu de chaque plaque, 4 heures après, et on détermine la concentration en prostaglandine-E₂ dans le milieu, par essai radioimmunologique. Aussi bien pour les plaques irradiées aux rayons gamma que pour les plaques non irradiées (témoin) on trouve une concentration de prostaglandine de 1250 pg/ml \pm 150, ce qui indique que l'arrêt de la division des cellules provoqué par irradiation n'a pas diminué cette biotransformation dans une souche de cellules de mammifère.

Il est entendu que des modifications de détail peuvent être apportées dans la forme et la mise en oeuvre du procédé suivant l'invention, sans sortir du cadre de celle-ci.

Revendications

1. Procédé de bioconversion, pour la conversion d'un précurseur en un produit désiré, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact ce précurseur avec des cellules dont la division a été arrêtée, qui conservent leur capacité à effectuer une bioconversion.
2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise des cellules qui ont été irradiées par un rayonnement électromagnétique ou de particules de façon à provoquer l'arrêt de la division des cellules sans affaiblir leur capacité de bioconversion.
3. Procédé suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les cellules sont emprisonnées dans une matrice de polymère ou sont fixées à un substrat solide.
4. Procédé suivant l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi des cellules végétales, des cellules de levure, des cellules de bactéries et des cellules de vertébrés.
5. Procédé suivant l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'un composé chimique précurseur spécifique est converti en un composé qui est un parfum, un composé pharmaceutiquement actif ou une essence.
6. Procédé suivant l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les cellules sont irradiées alors qu'elles sont en suspension, qu'elles sont piégées dans une matrice de polymère ou qu'elles adhèrent à un support solide.
7. Procédé de bioconversion pour la conversion d'un précurseur chimique donné en un composé chimique donné, caractérisé en ce qu'il utilise des cellules dont la division a été arrêtée, suivant l'une des revendications précédentes.
8. Produit chimique obtenu par bioconversion d'un précurseur, caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé suivant l'une des revendications 1 à 7.

Légendes des figures

Figure 1 : Effet de l'irradiation aux rayons gamma (50 krad) sur la division de cellules Mentha. Des cellules non irradiées (témoin) et des cellules irradiées sont appliquées sur un milieu nutritif solidifié et stockées au froid (pas de culture) ou cultivées à 25°C pendant 12 Jours.

Figure 2 : Cinétique de la biotransformation de menthone en néomenthol par des cellules Mentha 193 non irradiées et irradiées aux rayons gamma.

Figure 3 : Biotransformation de menthone par des cellules Mentha en suspension libre et piégées au PAAH qui sont irradiées aux rayons gamma ou non.

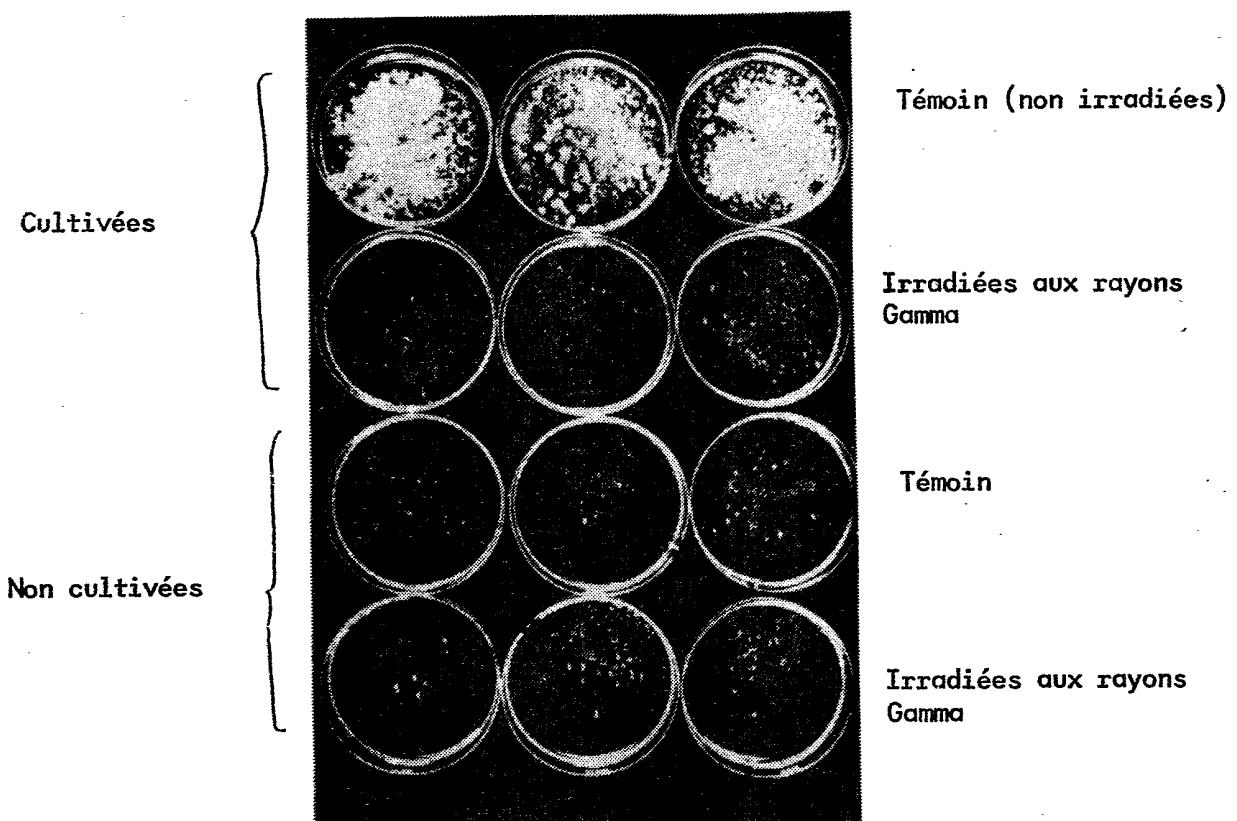
Figure 4 : Biotransformation multiple de menthone par des cellules Mentha irradiées aux rayons gamma.

Figure 5 : Biotransformation multiple de géraniol par des cellules Mentha irradiées aux rayons gamma.

Figure 6 : Biotransformation multiple de géraniol par des cellules Nicotiana irradiées aux rayons gamma.

Figure 7 : Cinétique de la conversion de glucose en éthanol par des cellules Saccaromyces cerevisiae dans lesquelles la division de cellule a été arrêtée par un rayonnement gamma de 400 krad (trait plein) ou n'a pas été arrêtée (témoin en pointillé).

1/7



Fia. 1

2/7

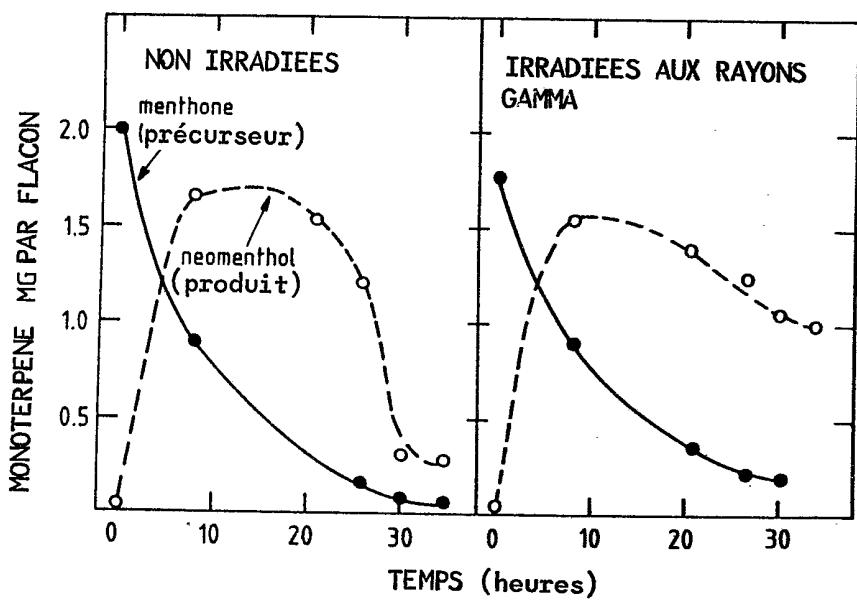


Fig. 2

3/7

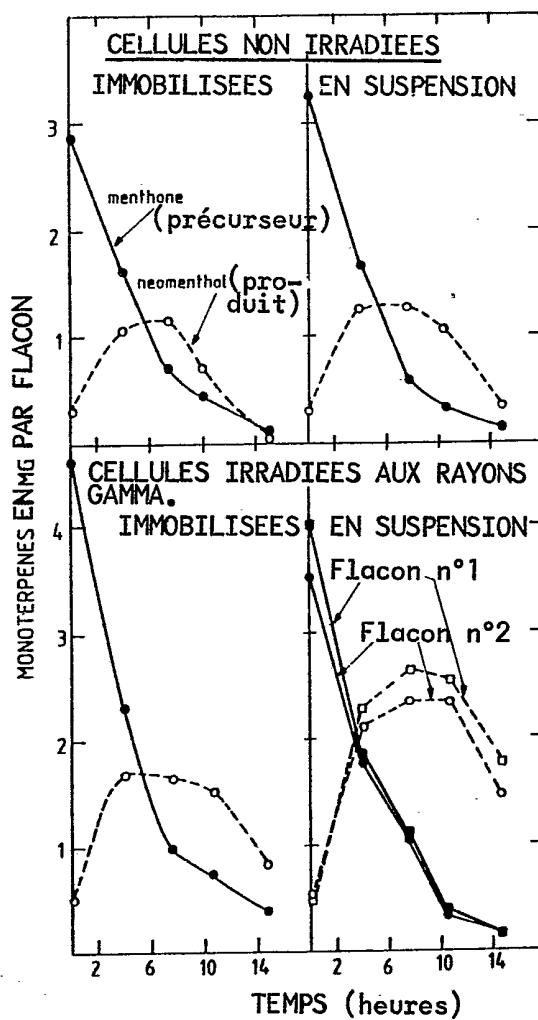


Fig. 3

4/7

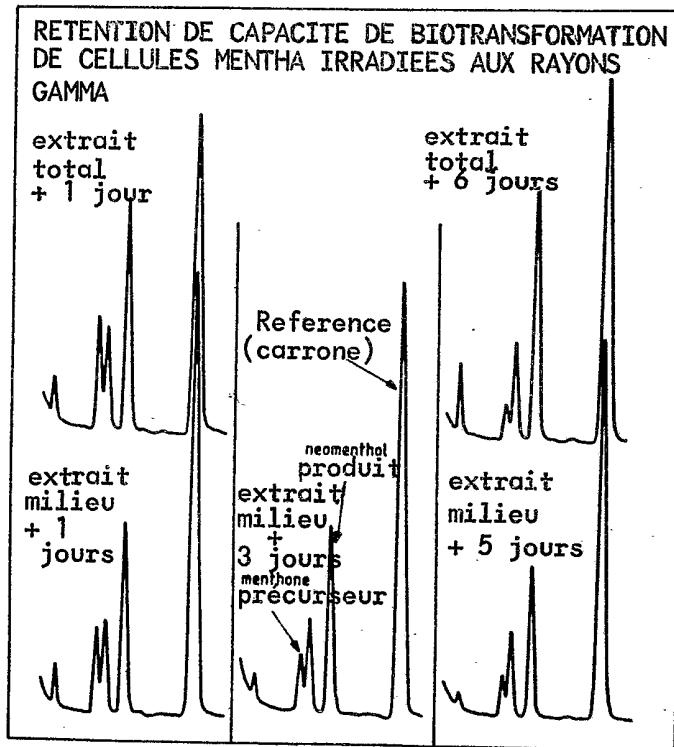


Fig. 4

5/7

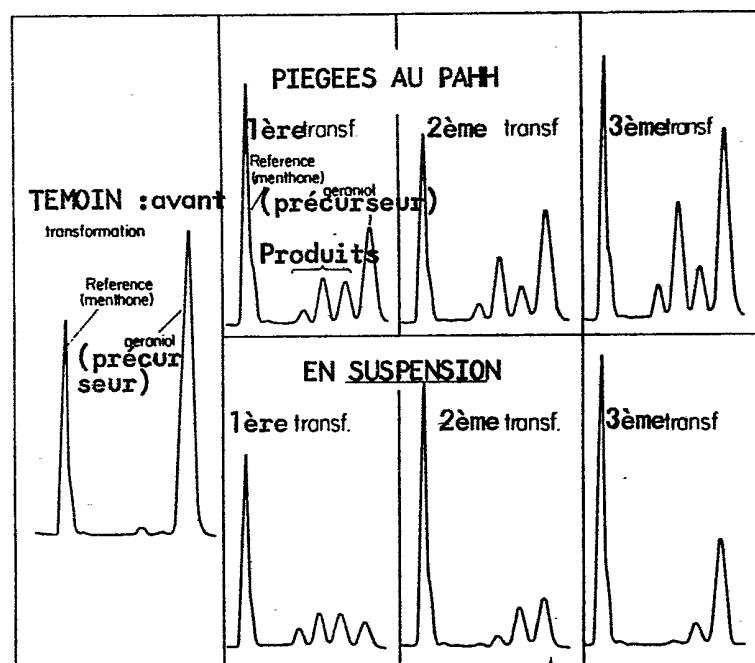


Fig. 5

6/7

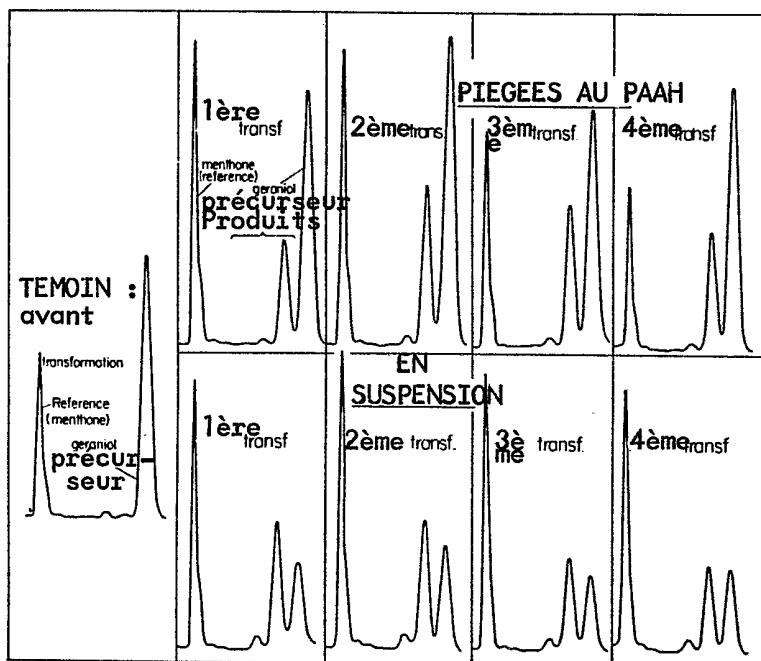


Fig. 6

7/7

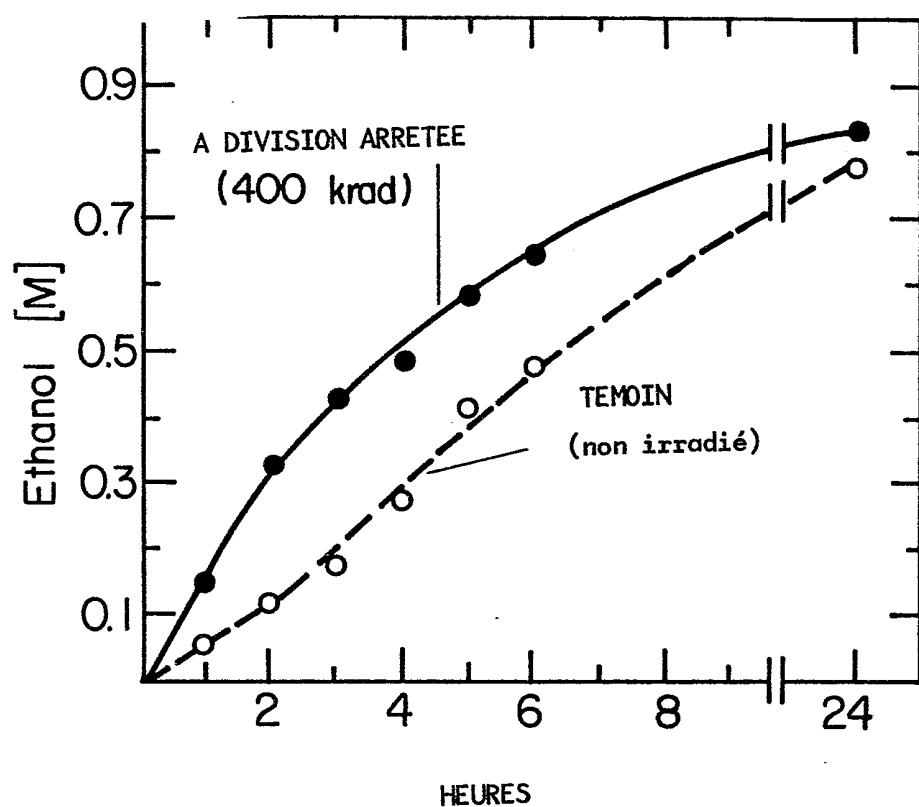


Fig. 7