



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2000/11/07
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2001/05/17
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2010/01/26
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2002/05/07
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2000/003095
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2001/033942
(30) Priorité/Priority: 1999/11/08 (FR99/14204)

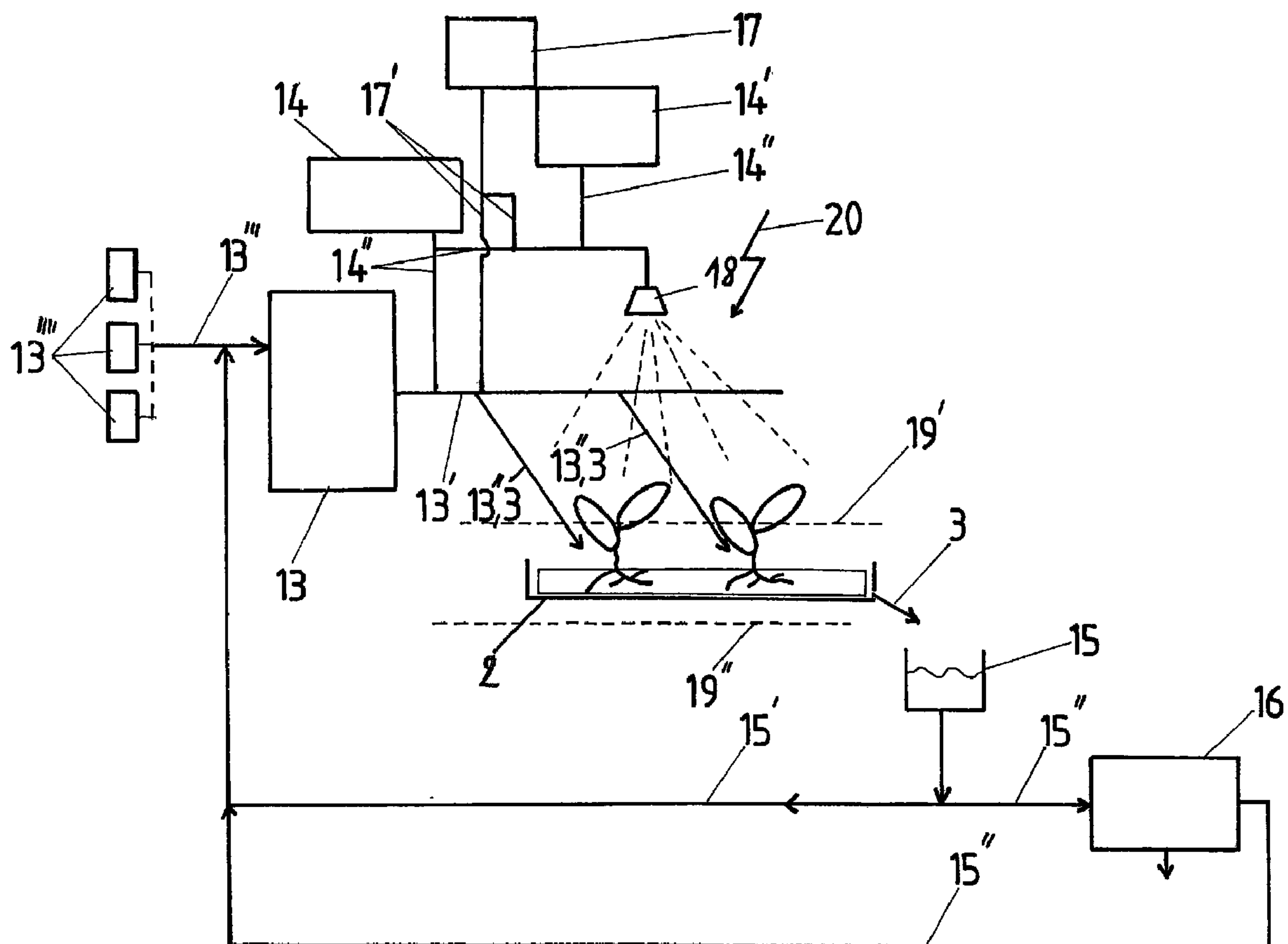
(51) Cl.Int./Int.Cl. *A01G 31/00* (2006.01),
A01G 31/02 (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
GONTIER, ERIC, FR;
CLEMENT, ALAIN, FR;
BOURGAUD, FREDERIC, FR;
GUCKERT, ARMAND, FR

(73) Propriétaires/Owners:
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE (INPL), FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE, FR

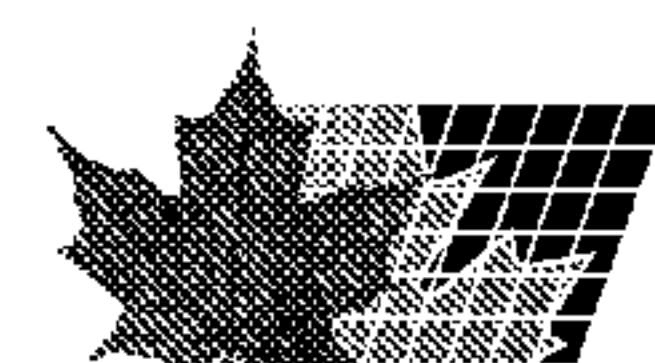
(74) Agent: GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE METABOLITES A PARTIR DE VEGETAUX EN CULTURE HORS SOL
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING METABOLITES FROM PLANTS CULTIVATED IN SOIL-LESS MEDIUM



(57) Abrégé/Abstract:

La présente invention a pour objet un procédé de production de molécules à partir de plantes, caractérisé en ce que lesdites plantes sont cultivées en conditions hors sol et sont alimentées par une solution nutritive et/ou aspergées par un liquide de



(57) **Abrégé(suite)/Abstract(continued):**

lessivage, ladite solution et/ou ledit liquide étant ensuite récupéré(e)(s) et traité(e)(s) pour en extraire certaines molécules déterminées qu'elle ou il contient et qui ont été libérées par les racines et/ou les parties aériennes desdites plante.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
17 mai 2001 (17.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/33942 A1(51) Classification internationale des brevets⁷:

A01G 31/00, 31/02

LORRAINE [FR/FR]; 2, avenue de la Forêt de Haye,
F-54500 Vandoeuvre Les Nancy (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/03095

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): GONTIER,
Eric [FR/FR]; 3, rue de Toul, F-54170 Germiny (FR).
CLEMENT, Alain [FR/FR]; 271, avenue de Boufflers,
Tour P. Dukas, F-54000 Nancy (FR). BOURGAUD,
Frédéric [FR/FR]; 81, avenue Jean Jaurès, F-54500 Van-
doeuvre Les Nancy (FR). GUCKERT, Armand [FR/FR];
87, bd Valonnières, F-54600 Villers Les Nancy (FR).

(22) Date de dépôt international:

7 novembre 2000 (07.11.2000)

(25) Langue de dépôt:

français

(26) Langue de publication:

français

(74) Mandataire: CABINET NUSS; 10, rue Jacques Kablé,
F-67080 Strasbourg Cedex (FR).

(30) Données relatives à la priorité:

99/14204

8 novembre 1999 (08.11.1999)

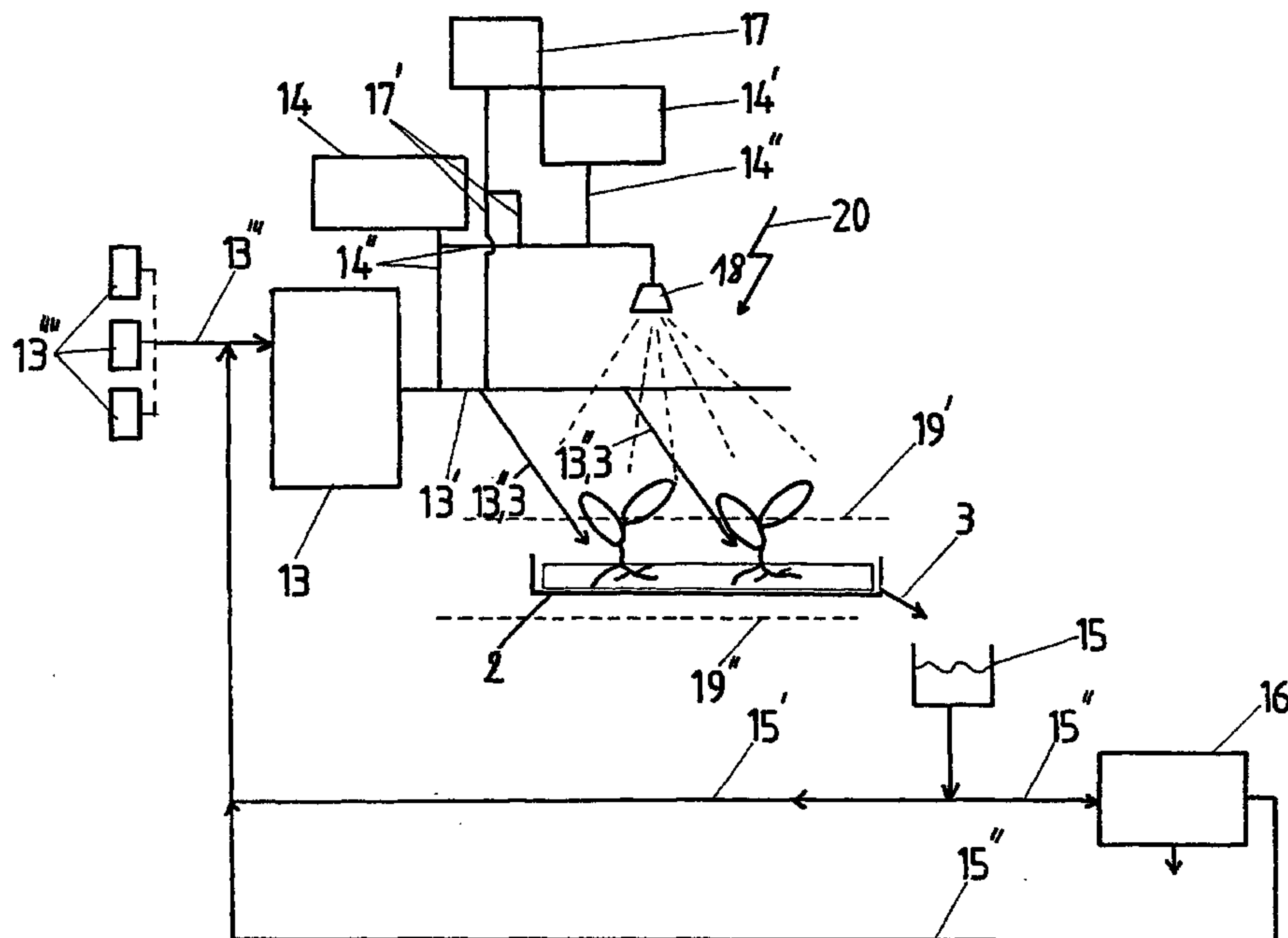
FR

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING METABOLITES FROM PLANTS CULTIVATED IN SOIL-LESS MEDIUM

(54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION DE METABOLITES A PARTIR DE VEGETAUX EN CULTURE HORS SOL



(57) Abstract: The invention concerns a method for producing molecules from plants, characterised in that said plants are cultivated in soil-less conditions and are supplied with a nutrient solution and/or sprayed with a leaching liquid, said solution and/or said liquid being subsequently recovered and treated to extract therefrom certain specific molecules which it contains and which have been released by the roots and/or top growth of said plants.

[Suite sur la page suivante]

WO 01/33942 A1

WO 01/33942 A1

LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(84) **États désignés (régional):** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrégé:** La présente invention a pour objet un procédé de production de molécules à partir de plantes, caractérisé en ce que lesdites plantes sont cultivées en conditions hors sol et sont alimentées par une solution nutritive et/ou aspergées par un liquide de lessivage, ladite solution et/ou ledit liquide étant ensuite récupéré(e)(s) et traité(e)(s) pour en extraire certaines molécules déterminées qu'elle ou il contient et qui ont été libérées par les racines et/ou les parties aériennes desdites plante.

- 1 -

Procédé de production de métabolites
à partir de végétaux en culture hors sol

L'invention concerne un procédé de production de métabolites, en continu ou en semi-continu, à partir de plantes en culture hors sol, sans perte de viabilité desdites plantes, ainsi qu'une installation pour la mise en oeuvre de ce procédé.

5 Les plantes produisent un grand nombre des molécules que l'homme utilise comme médicaments, colorants, arômes, additifs alimentaires ou pesticides. Ces composés sont souvent typiques d'une famille d'un genre ou d'une espèce végétale donnée. On les classe parmi les métabolites secondaires car ils ne semblent pas toujours indispensables à la survie de la plante non stressée (Bentley
10 1999, Bourgaud et al 1999, Gontier 1993). Beaucoup de ces molécules d'origine végétale servent ou ont servi de modèle pour la synthèse chimique en vue d'une utilisation commerciale. Parfois, les molécules sont complexes et l'extraction à partir de plantes sauvages, de plantes cultivées en champ ou in vitro restent les meilleures sources d'approvisionnement (Herman 1993).

15 En particulier, pour les molécules à haute valeur commerciale (prix au kilogramme et volume du marché), les cultures de cellules ou de tissus en bioréacteurs ont été développées (Herman 1993). Dans ce cas, les cultures doivent être axéniques, c'est à dire exemptes de micro-organismes (bactéries et champignons) dont la présence pourrait être dommageable à la croissance du
20 matériel végétal et à la production de métabolites par ce dernier. Le maintien de conditions axéniques est parfois difficile dans le temps et est source de charges financières importantes (Gontier 1993). De plus, l'utilisation de systèmes sophistiqués pour la culture in vitro (fermenteurs) ajoute un coût parfois rédhibitoire, rendant le système économiquement non viable. De manière
25 générale, la production de biomasse in vitro est onéreuse. Pour rentabiliser le système, on cherchera à faire produire le maximum de molécules par cette biomasse sans la détruire et en la réutilisant au maximum comme biocatalyseur (Herman 1993).

La stimulation de la production peut être obtenue par ajout de
30 précurseurs dans le milieu de culture (Boitel et al 1997), par perméabilisation réversible de la biomasse ou par stress physique (élévation de température, changement de pH, blessure...), chimique (ajout de sels CuSO₄, NaCl, CaCl₂,

- 2 -

(NH₄)₂SO₄...ou autres perméabilisants EDTA, DMSO, Tween20, autres tensioactifs ou détergents...) ou biochimique (élicitation...)...(Boitel et al 1995-1997, Weather et al 1991, Herman 1993, Mukundan et al 1998)

5 Le but de telles manipulations est de forcer la voie de biosynthèse en augmentant le flux global des précurseurs vers la molécule recherchée. De nombreuses publications font état de résultats extrêmement positifs obtenus par ces différentes voies (dont : Boitel et al 1995-1997, Weather et al 1991, Herman 1993). Néanmoins, le problème du caractère axénique des cultures reste entièrement posé.

10 D'autres auteurs, décrivent l'utilisation de cocktails antifongiques et antibiotiques permettant d'assurer une survie du matériel végétal en condition non axénique ("Plant Preservative Mixture" dénommé couramment PPM ®). Dans ce cas, il est difficile de doser les inhibiteurs microbiens de telle sorte que seuls les bactéries et les champignons soient affectés et ce, sans effet négatif sur la
15 biomasse végétale.

Par opposition à la culture in vitro, la production de molécules à partir de plantes récoltées dans la nature ou cultivées en champs est une alternative intéressante. Cependant, la récolte dans la nature peut conduire à la disparition d'espèces en cas de surexploitation (Gontier 1993). Elle peut aussi
20 entraîner d'importantes variations qualitatives et quantitatives de la production. La culture en champ n'est pas toujours réalisable par manque de connaissance de la plante ou, bien pire, pour cause d'impossible retour sur investissement à moyen terme. C'est souvent le cas pour les ligneux- par exemple l'if (Chen et Chen 1997, Ketchum et al 1999)- qui poussent lentement et dont la croissance s'étale sur des
25 décennies.

Depuis plusieurs années, des cultures dites hors sol (Morard 1995, Toda et al 1999) sous serre ou en extérieur se sont développées et permettent maintenant la culture de plantes maraîchères ou ornementales avec un niveau de rentabilité élevé. Les progrès concernant ces techniques ont été fulgurants depuis
30 environ quinze ans tant au niveau des dispositifs, des solutions nutritives que du contrôle et de l'automatisation de ces systèmes (Morard 1995). Jusqu'à ce jour, aucun essai de production de métabolite secondaire à partir de telles cultures n'a été tenté, ni même proposé, avec en particulier, la récupération des métabolites excrétés naturellement ou non à partir des racines des plantes ou même des parties
35 aériennes. En particulier, l'état de l'art ne montre absolument pas, ni ne suggère, qu'il est possible a priori de récupérer de tels métabolites sans que ceux ci ne soient dégradés par la microflore rencontrée dans les cultures hors sol.

- 3 -

Actuellement, on ne sait donc pas :

- si les plantes, de manière générale, relarguent des métabolites secondaires à partir de leurs racines ou de leurs feuilles de telle sorte que ce phénomène puisse être utilisé pour une application industrielle ;

5 - s'il est possible de forcer un relargage naturel ou non desdits métabolites secondaires chez les plantes cultivées en particulier en culture hors sol ;

 - si un traitement favorisant la synthèse et le relargage desdits métabolites secondaires chez la plante va affecter la survie de ladite plante de telle
10 sorte qu'aucune application industrielle ne puisse être envisagée ;

- si lesdits métabolites sont ou non dégradés de manière importante par la microflore susceptible de se développer autour des plantes ainsi cultivées.

Le problème posé à la présente invention consiste par conséquent à proposer un procédé de production de molécules à partir de plantes ne nécessitant
15 pas de conditions axéniques ou stériles, permettant de produire des quantités importantes, rentable économiquement et n'entraînant pas la destruction, même partielle, des plantes en vue de l'extraction des molécules recherchées.

A cet effet, la présente invention a pour objet un procédé de production de molécules à partir de plantes, caractérisé en ce que lesdites plantes
20 sont cultivées en conditions hors sol et sont alimentées par une solution nutritive et/ou aspergées par un liquide de lessivage, ladite solution et/ou ledit liquide étant ensuite récupéré(e)(s) et traité(e)(s) pour en extraire certaines molécules déterminées qu'elle ou il contient et qui ont été libérées par les racines et/ou les parties aériennes desdites plantes.

25 Selon une première caractéristique de l'invention, ledit procédé peut consister plus précisément à réaliser les étapes suivantes :

- a) initiation de la culture des plantes en conditions hors sol permettant la croissance et le développement desdites plantes et l'obtention d'une biomasse suffisamment importante pour rentabiliser le procédé ;

30 b) récupération des métabolites libérés par les racines ou les parties aériennes des plantes au moyen d'un liquide mis en contact par percolation ou immersion avec les racines, ou par aspersion avec les feuilles desdites plantes ;

- c) collecte de la solution usagée ou chargée sous forme de percolat (pour les racines) ou de lessivat (pour les feuilles) et isolement des molécules
35 recherchées contenues dans cette solution par extraction liquide-liquide, liquide-solide, par recristallisation, par sublimation ou par évaporation de l'eau.

- 4 -

Ledit procédé peut également comprendre une étape supplémentaire de perméabilisation forcée des racines ou des parties aériennes des plantes avec une solution contenant notamment des sels, des tensioactifs, des détergents, des solvants, des éliciteurs d'origine fongique ou bactérienne, des dérivés de l'acide jasmonique ou d'autres produits stimulant les défenses naturelles des plantes, de telle sorte que les flux sortants des racines ou des feuilles vers la solution nutritive ou le liquide de lessivage soient augmentés de manière significative et ce, sans perte totale de la viabilité desdites plantes, afin que ces dernières puissent être réutilisées, directement ou après une phase de rinçage et de remise en conditions de culture permettant au moins le rétablissement d'un bon état physiologique desdites plantes.

Dans ces conditions, le procédé comportera les étapes a à e suivantes :

a) initiation de la culture desdites plantes en conditions hors sol permettant la croissance et le développement desdites plantes et l'obtention d'une biomasse suffisamment importante pour rentabiliser le procédé. L'obtention de cette biomasse importante, notamment au niveau racinaire, peut être favorisée par une transformation génétique via *Agrobacterium rhizogenes* (Hooykaas et Schilperoort 1992) ;

b) perméabilisation des parties racinaires ou aériennes des plantes au moyen de traitement chimique (sels, tensioactifs, détergents, solvants), physique (élévation de température...) ou biochimique (éliciteur d'origine fongique ou non). Pour les traitements chimiques ou biochimiques, cette perméabilisation peut se faire à partir de la solution nutritive des plantes ou par aspersion des parties aériennes ;

c) récupération des métabolites libérés par les racines et/ou par les parties aériennes des plantes par mise en contact desdites plantes avec un liquide ;

d) récupération de la solution nutritive usagée ou du liquide aspergé chargé (autrement appelée dans la suite : percolat pour la perméabilisation par les racines et lessivat pour la perméabilisation par les parties aériennes) et isolement des molécules recherchées contenues dans cette solution (percolat ou lessivat) par évaporation de l'eau ou extraction liquide-liquide (solution nutritive et solvant insoluble dans l'eau), liquide-solide (solution nutritive et support adsorbant hydrophile, hydrophobe, anionique, cationique ou autre mais présentant une forte affinité pour les métabolites recherchés) ou par recristallisation ;

- 5 -

e) rinçage du système racinaire et/ou des parties aériennes des plantes puis remise en conditions de croissance un temps juste suffisant pour permettre de réaliser à nouveau le traitement.

En variante au déroulement séquentiel des étapes de perméabilisation, de récupération et de remise en condition mentionné ci-dessus, dont le rebouclage sur une pluralité de cycles répétitifs autorise une exploitation efficiente desdites plantes, il peut également être prévu que la perméabilisation forcée soit réalisée de manière permanente, en additionnant une solution perméabilisante à la solution nutritive délivrée de manière continue ou à intervalles réguliers aux plantes.

Dans ce dernier cas, les étapes de remise en conditions des plantes peuvent être totalement supprimées en choisissant des doses de substances perméabilisantes peu importantes et en sélectionnant des substances peu agressives ou stressantes pour les plantes, ou pour le moins être espacées avec des intervalles plus importants.

Suite à l'étape de perméabilisation ou à une phase prolongée de perméabilisation, on réalise un rinçage du système racinaire et/ou des parties aériennes des plantes, puis une remise en conditions de croissance desdites plantes pendant un temps juste suffisant pour permettre de réaliser à nouveau un traitement de perméabilisation forcée, suivi ou accompagné d'une étape de récupération des molécules recherchées.

Il peut être également prévu, de manière avantageuse, de renforcer les capacités de biosynthèse de la plante et son potentiel à relarguer des métabolites dans la solution, par l'intermédiaire d'un traitement physique choisi dans le groupe formé par une élévation de la température, une irradiation lumineuse, supplémentaire ou rallongée, une élévation de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère en contact avec ladite plante et les combinaisons de plusieurs de ces traitements physiques.

En vue de rentabiliser davantage le procédé selon l'invention, la production et l'excrétion des métabolites synthétisés par les plantes peuvent être renforcées soit par une néosynthèse de ces molécules suite à l'apport de précurseurs de ces métabolites, ces précurseurs de la voie de biosynthèse desdits métabolites étant apportés à la plante par la solution nutritive au niveau des racines ou par aspersion sur les parties aériennes en mélange avec des tensioactifs pour obtenir une pénétration foliaire, soit par un forçage de l'activité photosynthétique au moyen d'un éclairage artificiel pendant une durée plus longue que celle à laquelle la plante est habituée.

- 6 -

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, les métabolites recherchés sont libérés par les plantes au niveau de leurs racines et sont récupérés dans la solution nutritive usagée.

5 Selon un second mode de réalisation de l'invention, les métabolites recherchés sont obtenus à partir des parties aériennes des plantes par douchage ou aspersion desdites plantes avec une solution ou un liquide adapté(e), contenant préférentiellement des tensioactifs, des agents de surfaces et/ou des détergents, la solution de douchage ou d'aspersion chargée étant récupérée séparément ou en mélange avec la solution nutritive pour une extraction et une purification des
10 molécules recherchées.

De manière préférentielle, les plantes utilisées sont choisies dans le groupe des plantes supérieures ou vascularisées, aptes à synthétiser des métabolites d'intérêt économique en grande quantité et en ce que les molécules recherchées correspondent à des métabolites secondaires produits naturellement
15 par ces plantes.

Les métabolites récupérés et isolés sont choisis dans le groupe formé par les alcaloïdes de types tropaniques et indoliques, les anticancéreux, les taxanes ou dérivés du taxol, les furocoumarines, les terpènes, les glycosides, les phénylpropanoïdes, les saponines et les stéroïdes, et, plus généralement les
20 substances non assimilables ou toxiques pour les micro-organismes éventuellement présents dans l'environnement desdites plantes.

Conformément à une caractéristique supplémentaire de l'invention, les plantes utilisées peuvent être modifiées génétiquement pour leur faire produire plus de métabolites ou pour modifier leur morphologie, en augmentant par
25 exemple leur biomasse racinaire suite à une transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* ou *tumefaciens*.

L'invention sera mieux comprise, grâce à la description ci-après, qui se rapporte à des modes de réalisation préférés, donnés à titre d'exemples non limitatifs, et expliqués avec référence aux dessins schématiques annexés, dans
30 lesquels les figures 1 à 8 représentent de manière schématique différentes possibilités de mise en œuvre du procédé selon l'invention, en relation avec différents moyens et dispositifs matériels.

Ainsi, la figure 1 représente le système utilisé pour l'exemple 1 décrit dans la suite de la présente. Les plantes 1 (*Daturas*) sont cultivées dans des
35 pots en verre 2 remplis de solution nutritive 3. La tige des plantes 1 est fixée sur le couvercle 2' des pots préalablement percé de trois trous. Un orifice 4 sert à la remise à niveau de la solution nutritive et l'autre permet le passage d'un tuyau

- 7 -

d'arrivée d'air 5 qui permet de maintenir une bonne oxygénation de la solution nutritive des plantes par bullage (bulles 6).

La figure 2 présente le dispositif utilisé pour la culture d'Ifs telle que décrite pour l'exemple 2 dans la suite du texte. Dans ce cas, les plantes 1 sont posées dans le fond d'un bac en 2 PVC (polychlorure de vinyle) rempli de solution nutritive 3, et un bullage d'air assure l'oxygénation de la solution nutritive (bulles 6).

La figure 3 décrit le dispositif utilisé pour la réalisation des travaux décrits dans l'exemple 4 ci-après. Les plantes 1 (Daturas) sont placées sur des plaques percées 7 posées sur un bac de culture 2 en PVC. La solution nutritive est régulièrement pulvérisée sur les racines sous forme de brouillard 8 grâce à des brumisateurs programmables 9.

Les figures 4 à 7 représentent différents dispositifs de culture utilisables pour la production de métabolites à partir de plantes.

Plus particulièrement, les figures 4A et 4B représentent des dispositifs de culture dans lesquels la solution nutritive 3 est apportée aux plantes 1 à l'aide de capillaires. Une fois entrée en contact avec les racines desdites plantes, la solution nutritive usagée 3', aussi appelée percolat, est drainée puis recyclée. Dans ce cas, les plantes peuvent être cultivées avec ou sans substrat 2". Ce substrat peut être de différentes natures telles que: laine de roche, sable, perlite, vermiculite, sol reconstitué, ou de toute autre nature utilisée actuellement en culture hors sol.

Les plantes 1 peuvent aussi être cultivées selon la méthode NFT pour : « Nutrient Film Technique ». Dans ce cas, la solution nutritive 3 est amenée aux racines des plantes 1 par ruissellement (Fig. 5) sur une gouttière ou un plan support 10 légèrement en pente. La récupération de la solution nutritive usagée 3' se fait en bout de gouttière 10 et cette solution peut être recyclée avec ou sans récupération des métabolites qu'elle contient.

Les figures 6A et 6B décrivent des systèmes de culture hors sol avec immersion des systèmes racinaires des plantes 1 dans une solution nutritive. L'apport de solution nutritive 3 et le drainage de la solution usagée 3' peuvent être permanents (système en continu) ou non (système discontinu). L'immersion du système racinaire peut être, elle aussi, permanente (Fig. 6A) avec bullage d'air dans cette même solution nutritive ou temporaire (Fig. 6B). Dans le second cas, le drainage peut se faire vers un bac hermétique 11 en position basse. Le transfert de ce liquide peut alors être fait par une pompe ou par un compresseur 12 qui pousse

- 8 -

la solution contenue dans ce bac hermétique 11 vers le bac de culture 2, éventuellement après rajout de substances additionnelles.

La figure 7 décrit un dispositif de culture de type aéroponie, dans lequel les racines des plantes sont régulièrement arrosées par la solution nutritive 3 sous forme de brouillard 8. Ce dernier est obtenu grâce à des brumisateurs 9 placés à l'intérieur du bac de culture 2. La solution nutritive usagée 3' peut être soutirée par le bas.

La figure 8 montre de manière schématique une installation pour la mise en œuvre, à grande échelle et le cas échéant de manière automatique ou semi-automatique, le procédé de production de métabolites selon l'invention.

Comme le montre ladite figure 8, cette installation est essentiellement constituée, d'une part, par une pluralité de contenants 2 pour la culture hors sol de plantes 1, renfermant ou non un support ou substrat de culture inerte 2", d'autre part, par un dispositif de stockage et d'apport de solution nutritive 3 pour les plantes 1, comprenant un réservoir 13 et une ligne de distribution 13' associée à un réseau de conduits 13" amenant ladite solution 3 de manière contrôlée à la base desdites plantes 1, et par un dispositif de distribution de solution de perméabilisation et/ou de liquide de lessivage, comprenant notamment un réservoir de mélange et de stockage 14 pour la solution de perméabilisation et/ou un réservoir 14' pour le liquide de lessivage, associé(s) à des lignes de distribution 14" par aspersion et/ou injection et, enfin, par un ensemble de moyens 15, 15', 15", 16 de récupération, de traitement et de recyclage au moins de la solution nutritive usagée 3'.

Les moyens de récupération, de traitement et de recyclage consistent avantageusement en un bac de stockage intermédiaire 15 collectant la solution nutritive usagée 3' évacuée par drainage des contenants 2 de culture hors sol et relié par une ligne de recyclage directe 15' et par une seconde ligne de recyclage 15" comprenant une unité 16 de séparation ou d'extraction des métabolites recherchés, en une boucle de réinjection sur le réservoir de stockage 13 de solution nutritive 3, ce dernier étant également alimenté par une ligne d'injection 13''' de substances nutritionnelles additionnelles stockées dans des réservoirs 13''' adaptés, de manière à compenser les quantités de telles substances prélevées par les plantes 1.

Pour augmenter la productivité de l'installation, cette dernière peut également comprendre un dispositif de distribution de solution(s) de précurseur(s) des métabolites à synthétiser par les plantes et/ou de substances stimulant ladite synthèse de métabolites, comprenant un réservoir de stockage 17 et une ligne de

- 9 -

distribution 17' reliée simultanément à la ligne de distribution 13' ou au réseau de conduits 13", délivrant la solution nutritive 3 et à des moyens 18 de distribution par aspersion des plantes 1 au niveau de leurs parties aériennes, tout comme le dispositif 14, 14', 14" de distribution de solution de perméabilisation et/ou de
5 liquide de lessivage.

Conformément à une caractéristique supplémentaire de l'invention, représentée également sur la figure 8, l'installation peut, en outre, comporter, d'une part, des moyens 19', 19" de chauffage des plantes 1 et/ou de leurs
10 contenants 2, par exemple sous la forme de réseaux de conduits parallèles et espacés traversés par un fluide caloporteur et s'étendant au-dessus et/ou en dessous desdits contenants 2 et, d'autre part, des moyens 20 d'éclairage ou d'insolation artificiels desdites plantes 1.

Le fonctionnement de l'installation représentée sur la figure 8 est décrit plus précisément ci-après.

15 La solution nutritive 3 est préparée et stockée dans un premier réservoir 13. Elle est ensuite amenée à la base des plantes 1 par un système de tuyauteries de plus en plus petites formant un réseau de conduits 13". Les plantes sont en culture hors sol, éventuellement sur un support inerte 2". La solution nutritive usagée 3' s'écoule sur un support de préférence en pente formant
20 éventuellement le fond du contenant 2 correspondant, ce drainage 5 étant permanent, cyclique ou occasionnel. Ces eaux de drainages sont récupérées dans le bac de stockage 15. Elles sont ensuite recyclées directement ou bien les molécules qu'elles contiennent en sont extraites et purifiées par l'unité 16 avant recyclage. Un premier réservoir annexe facultatif 14, et le cas échéant un second
25 réservoir annexe 14', contient ou contiennent des agents perméabilisants, des précurseurs ou d'autres composés stimulant la production de métabolites chez les végétaux. Ces produits, mélangés à la solution nutritive ou non, sont mis en contact avec les plantes 1 au niveau des racines par percolation (injection dans la solution nutritive 3) ou au niveau des feuilles par aspersion. Les plantes sont
30 soumises à un éclairage naturel ou artificiel 20. Les parties aériennes et racinaires des plantes peuvent être réchauffées ou refroidies par des liquides caloporteurs circulant dans des arrangements de tuyauteries formant des réseaux 19', 19" ou d'autres moyens équivalents.

En relation avec les différentes variantes de réalisation de mise en
35 œuvre de l'invention, et en particulier avec le mode de réalisation représenté à la figure 8, ledit procédé sera avantageusement constitué de trois étapes principales, à savoir, une première étape de culture ayant pour but l'obtention d'une biomasse

- 10 -

importante, une seconde étape privilégiant la libération de métabolites par les plantes, soit au niveau de leurs parties racinaires, soit au niveau de leurs parties aériennes et une troisième étape visant à remettre en état lesdites plantes avant passage à nouveau à la première ou à la deuxième étape précitée (répétition de cycles).

La présente invention concerne par conséquent un procédé et un système permettant la récupération de métabolites libérés naturellement (pas de perméabilisation indispensable) ou non (perméabilisation indispensable) par la plante cultivée en conditions hors sol (définition de Morard 1995), avec ou sans support inerte (par culture hors sol, il faut comprendre tout mode de culture autre que la culture en pleine terre dans les champs ou dans la nature). Cette plante peut être cultivée par arrosage avec une solution nutritive adaptée [culture hors sol sur support poreux, sur cascade (méthode dite NFT selon Morard 1995)], par trempage permanent dans la solution nutritive avec bullage d'air (aquiculture selon Morard 1995) ou immersion temporaire dans ladite solution nutritive (subirrigation, hydroponie, film nutritif,...), ou par mise en contact avec ladite solution nutritive sous forme de brouillard (aéroponie, selon Morard 1995).

Si les métabolites sont libérés par les racines de la plante, ils seront contenus dans la solution nutritive (percolat) et donc récupérés par piégeage soit dans un solvant non miscible à l'eau, soit sur un support adsorbant lesdites molécules ou encore par évaporation ou sublimation de l'eau de la solution nutritive. Ces différents modes opératoires peuvent être combinés si nécessaire.

Si les métabolites sont libérés par les parties aériennes de la plante, avec ou sans perméabilisation, ils seront récupérés par douchage desdites plantes, la solution de douchage (lessivat) étant récupérée et les métabolites qu'elle contient extraits comme indiqué ci-dessus pour le percolat.

Dans tous les cas, l'eau, la solution nutritive usagée ou le liquide de lessivage chargé peut être réutilisé pour la culture des plantes après remise à niveau des éléments minéraux et organiques nécessaires à la croissance et au métabolisme secondaire de la plante. Si un traitement perméabilisant a été effectué, il peut être nécessaire de traiter correctement la solution usagée (percolat ou lessivat) avant sa réutilisation pour un nouveau traitement perméabilisant ou pour une réutilisation comme solution nutritive normale (pour la croissance des plantes).

Lorsque les métabolites ont été extraits de la solution nutritive par un solvant non miscible à l'eau, ce dernier est séparé de la phase aqueuse, évaporé et le résidu sec est récupéré. Les métabolites peuvent ensuite être purifiés et séparés

- 11 -

d'éventuels contaminants. Si les métabolites ont été piégés sur un support solide, on isole ce support solide de la solution nutritive, on élue les métabolites avec une phase liquide aqueuse en jouant sur la force ionique, sur le pH ou en ajoutant des contre ions ou bien on utilise un solvant organique miscible à l'eau ou non
5 (alcool, hydrocarbure, organochloré, nitrile, ou autre...). Dans ce dernier cas, on va privilégier les solvants les plus respectueux de l'environnement, les moins inflammables, les moins toxiques, les moins chers et les plus biodégradables. Dans tous les cas, on mettra en œuvre tous les moyens classiques de la chromatographie et de la chimie pour purifier et concentrer les molécules
10 contenues dans l'éluat.

Lorsque les plantes ont été perméabilisées pendant le temps défini comme optimal pour obtenir la sortie maximale de métabolites sans affection irréversible de leur survie (perméabilisation séquentielle forcée sur des périodes courtes ou perméabilisation plus douce sur des périodes plus longues), le
15 traitement perméabilisant est stoppé. Les plantes sont remises en conditions de culture normale. Lorsqu'elles ont été traitées par une solution perméabilisante, une solution de rinçage est utilisée pour éliminer cet agent perméabilisant (tensioactif, détergent, sel, acide, base...). Cette solution remplace temporairement la solution nutritive. Ensuite seulement, les plantes sont remises
20 en culture en conditions normales. Après une période de culture suffisante, les plantes peuvent à nouveau être perméabilisées. Ces cycles peuvent être réitérés jusqu'à diminution notable de la production, de la productivité, de l'état sanitaire des plantes. Dans ce cas, tout ou partie de la culture est remplacée par des jeunes plantes qui sont mises en croissance avant le premier traitement perméabilisant,
25 préférentiellement jusqu'à obtention d'un développement optimal.

Dans certains cas, un traitement perméabilisant en continu peut être envisagé. Dans ce cas, le traitement perméabilisant sera assez doux pour permettre la sortie des métabolites et surtout la survie de la plante tout au long dudit traitement perméabilisant. Lorsque l'efficacité du traitement commence à chuter
30 de manière significative, et engendre une baisse de rendement non économiquement acceptable, on remplace les « vieilles » plantes par de plus jeunes que l'on perméabilisera immédiatement ou après forçage de la croissance.

De manière générale, lors de la perméabilisation des plantes, l'ajout de précurseurs des métabolites recherchés peut être fait. Dans ce cas, ces
35 molécules peuvent être biotransformées par les cellules de ladite plante. L'ajout de précurseurs doit se faire avec modération pour éviter que ces derniers ne servent de source de carbone à des micro-organismes dont le développement

- 12 -

pourrait à terme compromettre la survie desdites plantes. Cet ajout de précurseurs peut se faire directement dans la solution nutritive lorsqu'on perméabilise les racines. Il peut se faire par la solution nutritive via les racines si on perméabilise les feuilles aussi, mais il peut également être fait par voie foliaire via le liquide de
5 douchage des plantes.

Afin d'illustrer davantage encore les possibles mises en œuvre pratiques du procédé selon l'invention, on décrit ci-après quatre exemples non limitatifs de réalisation de ce dernier.

Exemple 1 de réalisation du procédé : Production d'alcaloïdes
10 tropaniques à partir de *Datura innoxia* Mill. cultivés en hydroponie

Les plantes utilisées proviennent de graines fournies par l'Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (D-06466 Gatersleben, Corrensstr.3, Allemagne). Ces graines ont été scarifiées dans l'acide sulfurique concentré pendant 10 minutes à température ambiante. Après rinçage abondant à
15 l'eau courante, elles ont été mises à germer dans des pots contenant du sol humide et à une température de 25°C+/-1°C avec une photopériode de 16h et une hygrométrie de 60-70%. Au bout de deux mois, lorsque les plantes ont atteint une taille de 15-20cm, c'est-à-dire un stade 8-10 feuilles, elles ont été dépotées et transférées dans des pots de verre de type connu sous la désignation "baby food
20 jar" (Sigma-Aldrich Inc., France) de 175 ml. Les plantes étaient maintenues par le couvercle des pots préalablement percés de trois trous (un pour la tige, un pour le bullage d'air et un pour la remise à niveau du liquide, Voir figure 1). Une solution nutritive de type MS diluée quatre fois (Murashige et Skoog, 1962) a été ajoutée dans le pot. Des tuyaux en silicone ont permis de faire buller de l'air dans la
25 solution nutritive afin de maintenir une bonne oxygénation pour le système racinaire des plantes et aussi, pour éviter le développement trop important de populations de micro-organismes. Soixante plantes ont ainsi été mises en place. Elles ont été cultivées pendant deux semaines dans les mêmes conditions de lumière, de température et d'hygrométrie que celles indiquées ci-dessus.

Des doses croissantes (0, 1, 2, 3 ou 5%V/V – volume pour volume) de tensioactif (du type connu sous la désignation Tween20 : polyoxyéthylènesorbitan monolaurate) ont été ajoutées à la solution nutritive. La perméabilisation au Tween 20 (commercialisé par la société Prolabo) a été
35 réalisée en l'absence de bullage d'air (pour éviter la formation de mousse) pendant 0, 12, 24 ou 48 heures. La solution nutritive de chaque plante a été récoltée, filtrée et analysée par chromatographie en phase gazeuse. La concentration totale moyenne en hyoscyamine et en scopolamine augmente

- 13 -

graduellement avec la concentration en tensioactif. Elle passe de 7mg/l sans tensioactif à 45mg/l avec 5% de Tween20. La concentration en hyoscyamine et en scopolamine augmente avec la durée du traitement.

5 L'ensemble des solutions de perméabilisation a été récupéré et les molécules qu'elles contenaient ont été reprises dans du chloroforme après adjonction d'ammoniaque jusqu'à pH 9. Le chloroforme a été évaporé et le résidu sec contenait l'ensemble des deux molécules d'hyoscyamine et de scopolamine.

10 Les plantes perméabilisées ont subi un rinçage du système racinaire à l'eau courante et ont été remises en culture hydroponique comme indiqué ci dessus. Au bout de trois semaines de culture, toutes les plantes avaient survécu. Elles avaient poursuivi leur croissance et certaines parmi celles qui avaient été perméabilisées ont même eu une croissance plus forte que les plantes témoins.

Un mois plus tard, les plantes ayant été perméabilisées une première fois l'ont été une seconde fois selon plusieurs modalités :

- 15 a) 4 plantes témoins (non perméabilisées)
 b) 4 plantes perméabilisées pendant 24heures avec 3% d'un tensioactif connu sous la désignation de Teepol (marque déposée – société TEMANA)
 c) 4 plantes perméabilisées pendant 24heures avec 5% de Tween20
 20 d) 4 plantes perméabilisées pendant 24heures avec 5% de Tween20 placées sous éclairage permanent à 27°C
 e) 4 plantes perméabilisées pendant 24heures avec 5% de Tween20 + 1g/l d'ornithine et 1g/l de phénylalanine

25 les solutions nutritives ont été prélevées, filtrées et analysées comme indiqué ci-dessus.

Les concentrations en hyoscyamine et en scopolamine étaient les suivantes :

- 30 a) 1,5mg/l+/-1
 b) 2,4mg/l+/-1,4
 c) 9,1mg/l+/-4
 d) 18,8mg/l+/-3,7
 e) 22,7mg/l+/-2,4

Conclusion : Il est possible de faire pousser des Daturas en aquiculture. Les Daturas libèrent spontanément des alcaloïdes (hyoscyamine et scopolamine) dans la solution nutritive. On peut forcer cette libération (également appelée par la suite relargage) en perméabilisant les plantes avec des tensioactifs. Dans ce cas, il est possible d'avoir un effet perméabilisant tout en évitant

- 14 -

d'affecter la survie desdites plantes en jouant sur la nature du tensioactif, sa concentration et le temps de contact. Le Tween 20 est un tensioactif efficace pour cette application. A dose égale, le Tween 20 est plus efficace que le Teepol. L'ajout de précurseurs de l'hyoscyamine et de la scopolamine est très bénéfique
5 en terme de quantité d'alcaloïdes libérés dans la solution nutritive.. Le passage des plantes à un éclairage permanent pendant 24h et à une température plus élevée donne des résultats proches de ceux obtenus avec ajout de précurseurs. Dans ce cas, on peut penser qu'une optimisation du système pourrait permettre d'augmenter encore largement la productivité du procédé.

10 Les plantes perméabilisées ont été rincées et remises en culture. Toutes ont survécu et ont donné lieu à des perméabilisations ultérieures.

Il résulte de ce qui précède que les plantes de type Datura peuvent être cultivées en conditions hors sol pour leur faire produire des alcaloïdes tropaniques que l'on récupère dans la solution nutritive usagée. La production
15 peut être augmentée en procédant à un traitement adapté. Ce traitement peut se faire à l'aide de tensioactifs. Tous les tensioactifs ne sont pas aussi efficaces les uns que les autres. Plus la dose de tensioactif est élevée, plus le traitement est efficace. Plus le traitement est long plus il est efficace. Un traitement réalisé dans de bonnes conditions permet la survie de la plante, voire un développement
20 supplémentaire de celle-ci, et il est alors possible de la perméabiliser plusieurs fois. L'efficacité du traitement perméabilisant peut être renforcée par ajout de précurseurs dans la solution perméabilisante. Cette efficacité peut aussi être renforcée par forçage de la photosynthèse en soumettant les plantes à un éclairage permanent, à une augmentation du taux de CO₂ et/ou par élévation de
25 la température environnante.

Exemple 2 de réalisation du procédé : Production de taxanes à partir d'ifs en culture hors sol.

Quatre plantes d'ifs de 60cm de hauteur ont été achetés dans le commerce, dépotés et placés dans des pots en PVC (polychlorure de vinyle) d'une
30 contenance de 6 litres et contenant 5 litres d'une solution nutritive de type MS (Murashige et Skoog, 1962)diluée 12 fois. Au bout de 4 jours de culture en serre avec bullage d'air (0,25vvm – 0,25 volume de gaz par volume de milieu et par minute) (Figure 2), la solution nutritive a été prélevée, filtrée sur filtres du type Millex 0,45µm et analysée par HPLC (chromatographie liquide haute pression)
35 sur colonne C18 de 30 cm avec un gradient de 0 à 100% de méthanol et une détection UV à 254nm. Il n'a pas pu être détecté de taxol dans cette solution nutritive. La solution a été remplacée par une solution neuve et 2% de Tween20

- 15 -

ont été ajoutés dans le pot de culture de deux des plantes. Après 24 heures, une concentration de 2,1mg/l $\pm$ 1,04 (soit 5 μ g/l/g de matière fraîche) a été mesurée dans la solution nutritive des plantes perméabilisées alors que seulement 0,2mg/l $\pm$ 0,16 (soit 0,2 μ g/l/g de matière fraîche) ont pu être mesurés dans le cas des plantes non perméabilisées. Des résultats assez similaires sont obtenus pour le dosage de la baccatine 3 (autre métabolite secondaire intéressant chez l'if). Après rinçage des racines, les plantes ont pu être perméabilisées à nouveau sans compromettre leur viabilité pendant au moins les trois semaines de l'expérimentation. Ces résultats montrent donc qu'il est possible d'obtenir une libération partielle des taxanes (paclitaxel) à partir d'ifs en culture hors sol (dans ce cas, culture hydroponique de type aquiculture). Dans notre exemple, ni la solution nutritive, ni le traitement perméabilisant n'ont été optimisés. On peut donc s'attendre à des résultats plus intéressants encore après optimisation de ladite solution nutritive (voir Morard 1995), des conditions de culture (température, lumière, CO₂...) et dudit traitement perméabilisant.

Exemple 3 de réalisation du procédé : Production de furocoumarines à partir de Rues (*Ruta graveolens*) cultivées en hydroponie (aquiculture selon Morard 1995).

Huit plantes âgées de 10 mois et cultivées en pot ont été placées en culture en solution nutritive MS/4 (solution de Murashige et Scoog 1962, diluée 4 fois) avec bullage d'air pendant deux semaines (même dispositif que sur la figure 2). Quatre des huit plantes ont été perméabilisées pendant 24 heures avec 3% (V/V) de Tween 20. Les solutions nutritives ont été ensuite prélevées, filtrées et analysées par chromatographie en phase gazeuse. Les solutions nutritives des plantes perméabilisées contenaient en moyenne 8,1 $\pm$ 4,1mg/l de furocoumarines (psoralène, 8 méthoxypsoralène, 5 méthoxypsoralène et 5.8 diméthoxypsoralène) contre 5,2 $\pm$ 2,8mg/l pour les solutions nutritives des quatre plantes témoins. Les racines des plantes ont été rincées à l'eau puis les plantes ont été remises en culture pour une semaine. Ensuite, les quatre plantes ayant déjà été perméabilisées la première fois ont été à nouveau perméabilisées de la même manière. Les résultats sont les suivants : 22,5 $\pm$ 6,1mg/l pour les perméabilisées contre 19 $\pm$ 8.5mg/l pour les non perméabilisées.

Une troisième perméabilisation a été refaite sur les mêmes plantes et a donné des résultats similaires avec survie de la totalité des plantes.

Conclusion : Les Rues peuvent être cultivées en conditions hors sol. Elles relarguent naturellement des furocoumarines dans la solution nutritive mais cette libération peut être augmentée par un traitement perméabilisant adapté (ici,

- 16 -

le Tween 20 à 3%). D'autres types de traitements peuvent être envisagés de la même manière : autres tensioactifs, élévation de la température de la solution nutritive ou augmentation de la salinité de la solution nutritive, ajout d'umbelliferone ou de phénylalanine par exemple. Comme dans l'exemple 2, les conditions de culture et le traitement perméabilisant peuvent bien entendu être optimisés pour donner des rendements encore meilleurs.

Exemple 4 de réalisation du procédé : Culture de *Datura innoxia* et *Datura stramonium* en aéroponie

Des graines de *Datura stramonium* et de *Datura innoxia* ont été mises à germer dans des petits godets contenant de la vermiculite arrosée de solution nutritive. Ces godets ont ensuite été transférés dans des supports composés de plaques (de PVC) percées. Ces plaques ont été placées sur un grand bac de 1,2m X 1m X 1m au fond duquel six brumisateurs trempaient dans de la solution nutritive (figure 3). Les brumisateurs se déclenchaient pendant 15 minutes toutes les demi-heures. L'ensemble du dispositif a été placé en phytotron avec des conditions identiques à celles de l'exemple 1. Au bout d'un mois de culture, de quelques dizaines de grammes de matière fraîche, la biomasse totale a dépassé le kilogramme (tiges + feuilles + racines). Une analyse par HPLC a révélé la présence de 8mg/l d'alcaloïdes dans les 40 litres de solution nutritive, soit un total calculé de 320mg d'hyoscyamine et de scopolamine.

Conclusion : la croissance des *Daturas* en aéroponie est très rapide. Les plantes sont saines et vigoureuses. En outre, elles relarguent spontanément des alcaloïdes dans la solution nutritive. Ce relargage peut être amélioré par un traitement adapté tel que la perméabilisation, un changement de la solution nutritive avec augmentation de la concentration en sels ou augmentation de la température d'incubation des racines et éventuellement l'ajout de précurseurs des alcaloïdes tropaniques (Gontier 1993).

Il résulte de ce qui précède qu'on peut cultiver des *Daturas* en aéroponie et dans ce cas, la croissance du matériel végétal est très rapide. De grandes quantités de biomasse peuvent être obtenues en un temps plus court qu'en hydroponie (aquiculture selon Morard 1995). De plus, il est possible de récupérer des métabolites secondaires dans la solution nutritive usagée. La teneur en métabolites de cette solution est fonction de la quantité de biomasse et du temps de contact de la solution nutritive avec la partie racinaire de cette biomasse. On peut aussi imaginer d'augmenter la concentration en métabolites par un traitement adapté (perméabilisation, force ionique, température, élicitation).

- 17 -

Ainsi, dès lors qu'il est possible de faire pousser des plantes sur plusieurs milliers de mètres carrés de serre (c'est le cas pour la tomate et le concombre) et dès lors qu'il est possible de recycler les solutions nutritives usagées (c'est le cas en méthode de type aquiculture, aéropnique, NFT (Nutrient Film Technique), le procédé de l'invention peut permettre de cultiver sur plusieurs milliers de mètres carrés des plantes produisant des métabolites secondaires. On peut récupérer les métabolites relargués spontanément dans la solution nutritive usagée. On peut même forcer la libération de ces molécules ainsi que leur biosynthèse avant relargage. Chez les plantes qui produisent des métabolites secondaires qui sont ensuite "extrudés" ou "excrétés" à la surface des feuilles (Brown et Zobel 1990), on peut même récupérer ces composés par douchage desdites plantes avec une solution adaptée et récupérer les lessivats contenant les métabolites d'intérêt. Un tel dispositif servira à produire des molécules d'origine végétale et ces molécules pourront avoir diverses applications telles que thérapeutiques, cosmétiques, alimentaires ou non alimentaires. De préférence, ces molécules seront de masse moléculaire assez réduite et ne devront pas être totalement insolubles dans l'eau additionnée ou non de tensioactif.

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée au mode de réalisation décrit et représenté aux dessins annexés. Des modifications restent possibles, notamment du point de vue de la constitution des divers éléments ou par substitution d'équivalents techniques, sans sortir pour autant du domaine de protection de l'invention.

25

30

35

- 18 -

Bibliographie détaillée :

5 BENTLEY R., 1999, "Secondary metabolite biosynthesis : the first century", Critical review in Biotechnology. 19,1,1-40.

10 BOITEL-CONTI M., GONTIER E., LABERCHE J.C., DUCROCQ C. and SANGWAN-NORREEL B.S., 1995 – "Permeabilization of *Datura innoxia* hairy roots for release of stored tropane alkaloids". *Planta Medica*, 61,287-290.

15 BOITEL-CONTI M., GONTIER E., LABERCHE J.C., DUCROCQ C., SANGWAN-NORREEL B.S., 1996 – "Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill hairy root cultures". *Plant Cell reports*, 16, 241-244.

20 BOITEL-CONTI M., GONTIER E., ASSAF C., LABERCHE J.C.. and SANGWAN B., Cultures de racines in vitro, Demande de brevet français n° 97 00641, 22 janvier 1997.

25 BOURGAUD F., BOUQUE V. and GUCKERT A., 1999, "Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56, 97-104

30 BROWN S.A. and ZOBEL A.M., 1990, "Biosynthesis and distribution of coumarins in the plant", Padova, 20-22 septembre 1990, Italy, Ed : Societa italiana di fitochimica and imprimitur editrice s.n.c, 15-37

35 GONTIER E., 1993, "Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. cultivé in vitro : impact physiologique de l'immobilisation des cellules dans une matrice d'alginate de calcium". Thèse de l'Université de Picardie Jules Verne, pp 200.

HERMAN E.B., 1993, "Recent advances in plant tissue culture II, Secondary metabolite production" 1988-1993, Ed. Herman E.D., Agritech consultants, Inc., Shrub oak, USA.

35

- 19 -

HOOYKAAS P.J.J. and SCHILPERORT R.A., 1992, "Agrobacterium and plant genetic engineering", Plant Molecular Biology, 19, 15, 15-38.

5 KETCHUM R.E.B., GIBSON D.M., CROTEAU R.B. and SCHULER M. 1999, "The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate", Biotechnol. and Bioeng. 62, 1, 98-105

10 MORARD P., 1995, "Les cultures végétales hors sol", publications agricoles Agen, ISBN : 2-9509297-0-2, pp304.

MUKUNDAN U., BHIDE V., SINGH G. and CURTIS WR, 1998, "pH mediated release of betalains from transformed root cultures of *Beta vulgaris*". Appl. Microbiol. And Biotechnol., 50, 241-245
15

MURASHIGE and SCOOG, 1962, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", Physiol. Plant, 15, 473-497.

20 SHEN Y.C. and CHEN C.Y., 1997, "Taxanes from the roots of *Taxus mairei*". Phytochem., 44, 8, 1527-1533.

TODA T, KOYAMA H. and HARA T., 1999, "A simple hydroponic method for the development of a high viable root system in *Arabidopsis thaliana*". Biosc. Biotechnol. Biochem. 63, 1, 210-212.
25

WEATHER P. CHEETHAM R.D. and DILORO A., 1991, "Process for extracting enhanced amounts of plant secondary metabolites with limited loss of plant viability", brevet US-A 5413928.

CLAIMS

1) Méthode de production de molécules à partir de racines ou de parties aériennes de plantes comprenant les étapes suivantes :

5 cultiver lesdites plantes en conditions hors sol et en conditions non stériles;

alimenter lesdites plantes par une solution nutritive et/ou asperger lesdites plantes par un liquide de lessivage;

10 récupérer et traiter ladite solution et/ou ledit liquide pour en extraire les métabolites secondaires libérés par les racines et/ou les parties aériennes desdites plantes, lesdits métabolites étant choisis dans le groupe formé par les alcaloïdes de type tropaniques et indoliques, les anticancéreux, les taxanes ou dérivés du taxol, les flurocoumarines, les terpènes, les glycosides, les phénylpropanoïdes, les saponines et les stéroïdes;

récupérer lesdits métabolites extraits;

15 effectuer une perméabilisation forcée desdites racines ou desdites parties aériennes desdites plantes avec une solution perméabilisante contenant des sels, des tensioactifs, des détergents, des solvants, des éliciteurs d'origine fongique ou bactérienne, des dérivés de l'acide jasmonique ou d'autres produits stimulant les défenses naturelles des plantes; et

20 répéter lesdites étapes de la perméabilisation forcée, de la récupération et traiter ladite solution et/ou ledit liquide pour extraire les métabolites et récupérer lesdits métabolites extraits jusqu'à une obtention d'une quantité suffisante desdits métabolites à partir desdites plantes, caractérisée en ce que :

25 ladite étape de perméabilisation forcée est réalisée de manière continue, en additionnant ladite solution perméabilisante à ladite solution nutritive délivrée de manière continue ou à des intervalles réguliers auxdites plantes de telle sorte que les flux sortants desdites racines et/ou desdites parties aériennes, vers la solution nutritive et/ou le liquide de lessivage contiennent lesdits métabolites et sont augmentés de manière significative et ce, sans perte totale de la viabilité desdites plantes;

ladite étape de la perméabilisation forcée n'entraînant pas une destruction desdites plantes, et

lesdites plantes étant modifiées génétiquement pour leur faire produire plus de métabolites ou pour augmenter leur biomasse racinaire suite à une transformation
5 génétique par *Agrobacterium rhizogenes*.

2) Méthode selon la revendication 1, comprenant les étapes supplémentaires suivantes :

initiation de la culture des plantes en conditions hors sol permettant la croissance et le développement desdites plantes;

10 récupération desdits métabolites libérés par lesdites racines ou les parties aériennes des plantes au moyen d'un liquide mis en contact avec lesdites racines par percolation ou par immersion ou en aspergeant les feuilles desdites plantes;

collecte de la solution usagée ou chargée sous forme de percolat pour lesdites racines ou sous forme de lessivat pour lesdites feuilles;

15 isolation des molécules recherchées contenues dans ladite solution collectée par extraction liquide-liquide ou liquide-solide, par recristallisation, par sublimation ou par évaporation de l'eau.

3) Méthode selon la revendication 1, comprenant les étapes supplémentaires suivantes :

20 rincer lesdites racines ou les parties aériennes desdites plantes après la perméabilisation forcée; et

remettre les lesdites plantes rincées en conditions de croissance pendant un temps juste suffisant pour permettre de réaliser à nouveau un traitement de perméabilisation forcée, suivi ou accompagné d'une étape de récupération des
25 molécules recherchées.

4) Méthode selon la revendication 1, comprenant l'étape supplémentaire suivante :

augmenter les capacités de biosynthèse desdites plantes et leur potentiel à relarguer des métabolites dans la solution, par l'intermédiaire d'un traitement physique choisi dans le groupe formé par une élévation de la température, une irradiation lumineuse, supplémentaire ou rallongée, une élévation de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère en contact avec ladite plante et les combinaisons de plusieurs de ces traitements physiques.

5) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la production et l'excrétion desdits métabolites synthétisés par lesdites plantes sont renforcées par une néosynthèse desdits métabolites suite à l'apport de précurseurs des métabolites, et lesdits précurseurs sont ajoutés auxdites plantes en incluant lesdits précurseurs à ladite solution nutritive au niveau des racines ou par aspersion sur les parties aériennes en mélange avec des tensioactifs pour obtenir une pénétration foliaire.

6) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la production et l'excrétion desdits métabolites sont renforcées par un forçage de l'activité photosynthétique au moyen d'un éclairage artificiel pendant une durée plus longue que celle à laquelle la plante est habituée.

7) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits métabolites sont obtenus à partir desdites parties aériennes des plantes par douchage ou aspersion desdites plantes avec une solution ou un liquide adapté(e) contenant des tensioactifs, des agents de surfaces et/ou des détergents, et

la solution de douchage ou d'aspersion chargée étant récupérée séparément ou en mélange avec ladite solution nutritive pour une extraction et une purification desdites molécules.

8) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites plantes utilisées sont choisies dans le groupe des plantes supérieures ou vascularisées, aptes à synthétiser les métabolites d'intérêts.

9) Méthode de production de molécules à partir de racines et/ou de parties aériennes de plantes comprenant les étapes suivantes :

fournir une pluralité de contenants pour la culture hors sol des plantes;

fournir un dispositif de stockage et d'apport de solution nutritive pour lesdites plantes comprenant un réservoir et une ligne de distribution associée à un réseau de conduits amenant ladite solution de manière contrôlée à la base desdites plantes;

5 fournir un dispositif de distribution de solution de perméabilisation ou de liquide de lessivage, comprenant un réservoir de mélange et de stockage pour la solution de perméabilisation et/ou un réservoir pour le liquide de lessivage, associé(s) à des lignes de distribution par aspersion et/ou injection;

10 fournir un ensemble de moyens pour récupération, traitement et recyclage au moins de la solution nutritive usagée, lesdits moyens de récupération, de traitement et de recyclage consistent en un bac de stockage intermédiaire collectant la solution nutritive usagée évacuée par drainage lesdits contenants et relié par une ligne de recyclage directe et par une seconde ligne de recyclage comprenant une unité de séparation ou d'extraction, en une boucle de réinjection sur ledit réservoir de stockage de solution nutritive, ladite unité extrayant lesdits métabolites contenus dans ladite
15 solution nutritive usagée et libérés par lesdites racines et/ou les parties aériennes desdites plantes;

cultiver lesdites plantes en conditions hors sol et en conditions non stériles;

alimenter lesdites plantes par une solution nutritive et/ou asperger lesdites plantes par un liquide de lessivage;

20 récupérer et traiter ladite solution et/ou ledit liquide pour en extraire les métabolites secondaires libérés par les racines et/ou les parties aériennes desdites plantes, lesdits métabolites étant choisis dans le groupe formé par les alcaloïdes de type tropaniques et indoliques, les anticancéreux, les taxanes ou dérivés du taxol, les flurocoumarines, les terpènes, les glycosides, les phénylpropanoïdes, les saponines et
25 les stréroïdes;

récupérer lesdits métabolites extraits;

effectuer une perméabilisation forcée desdites racines ou desdites parties aériennes desdites plantes avec une solution perméabilisante contenant des sels, des tensioactifs, des détergents, des solvants, des éliciteurs d'origine fongique ou

bactérienne, des dérivés de l'acide jasmonique ou d'autres produits stimulant les défenses naturelles des plantes; et

répéter lesdites étapes de la perméabilisation forcée, de la récupération et traiter ladite solution et/ou ledit liquide pour extraire les métabolites et récupérer
5 lesdits métabolites extraits jusqu'à une obtention d'une quantité suffisante desdits métabolites à partir desdites plantes, dans lesquelles;

la dite étape de perméabilisation forcée étant réalisée de manière continue, en additionnant ladite solution perméabilisante à ladite solution nutritive délivrée de manière continue ou à des intervalles réguliers auxdites plantes de telle sorte que les
10 flux sortants desdites racines et/ou desdites parties aériennes, vers la solution nutritive et/ou le liquide de lessivage contiennent lesdits métabolites et soient augmentés de manière significative et ce, sans perte totale de la viabilité desdites plantes;

ladite étape de la perméabilisation forcée n'entraînant pas une destruction desdites plantes.

15 10) Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit réservoir est également alimenté par une ligne d'injection de substances nutritionnelles additionnelles stockées dans des réservoirs, adaptés, de manière à compenser les quantités de telles substances prélevées par les plantes.

20 11) Méthode selon la revendication 9, comprenant les étapes supplémentaires suivantes :

initiation de la culture des plantes en conditions hors sol permettant la croissance et le développement desdites plantes;

25 récupération desdits métabolites libérés par lesdites racines ou les parties aériennes des plantes au moyen d'un liquide mis en contact avec lesdites racines par percolation ou par immersion ou en aspergeant les feuilles desdites plantes;

collecte de la solution usagée ou chargée sous forme de percolat pour lesdites racines ou sous forme de lessivat pour lesdites feuilles;

isoler les molécules recherchées contenues dans ladite solution collectée par extraction liquide-liquide ou liquide-solide, par recristallisation, par sublimation ou par évaporation de l'eau.

- 12) Méthode selon la revendication 9, comprenant les étapes supplémentaires
5 suivantes :

rincer lesdites racines ou les parties aériennes desdites plantes après la perméabilisation forcée; et

- remettre les lesdites plantes rincées en conditions de croissance pendant un temps juste suffisant pour permettre de réaliser à nouveau un traitement de
10 perméabilisation forcée, suivi ou accompagné d'une étape de récupération des molécules recherchées.

- 13) Méthode selon la revendication 9, comprenant l'étape supplémentaire suivante :

- augmenter les capacités de biosynthèse desdites plantes et leur potentiel à
15 relarguer des métabolites dans la solution, par l'intermédiaire d'un traitement physique choisi dans le groupe formé par une élévation de la température, une irradiation lumineuse, supplémentaire ou rallongée, une élévation de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère en contact avec ladite plante et les combinaisons de plusieurs de ces traitements physiques.

- 20 14) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la production et l'excrétion desdits métabolites synthétisés par lesdites plantes sont renforcées par une néosynthèse desdits métabolites suite à l'apport de précurseurs des métabolites, et

- lesdits précurseurs sont ajoutés auxdites plantes en incluant lesdits précurseurs à ladite solution nutritive au niveau des racines ou par aspersion sur les parties
25 aériennes en mélange avec des tensioactifs pour obtenir une pénétration foliaire.

- 15) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la production et l'excrétion desdits métabolites sont renforcées par un forçage de l'activité photosynthétique au moyen d'un éclairage artificiel pendant une durée plus longue que celle à laquelle la plante est habituée.

16) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits métabolites sont obtenus à partir desdites parties aériennes des plantes par douchage ou aspersion desdites plantes avec une solution ou un liquide adapté(e) contenant des tensioactifs, des agents de surfaces et/ou des détergents, et

5 la solution de douchage ou d'aspersion chargée étant récupérée séparément ou en mélange avec ladite solution nutritive pour une extraction et une purification desdites molécules.

17) Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que lesdites plantes utilisées sont choisies dans le groupe des plantes supérieures ou vascularisées, aptes à
10 synthétiser les métabolites d'intérêts.

Fig. 1

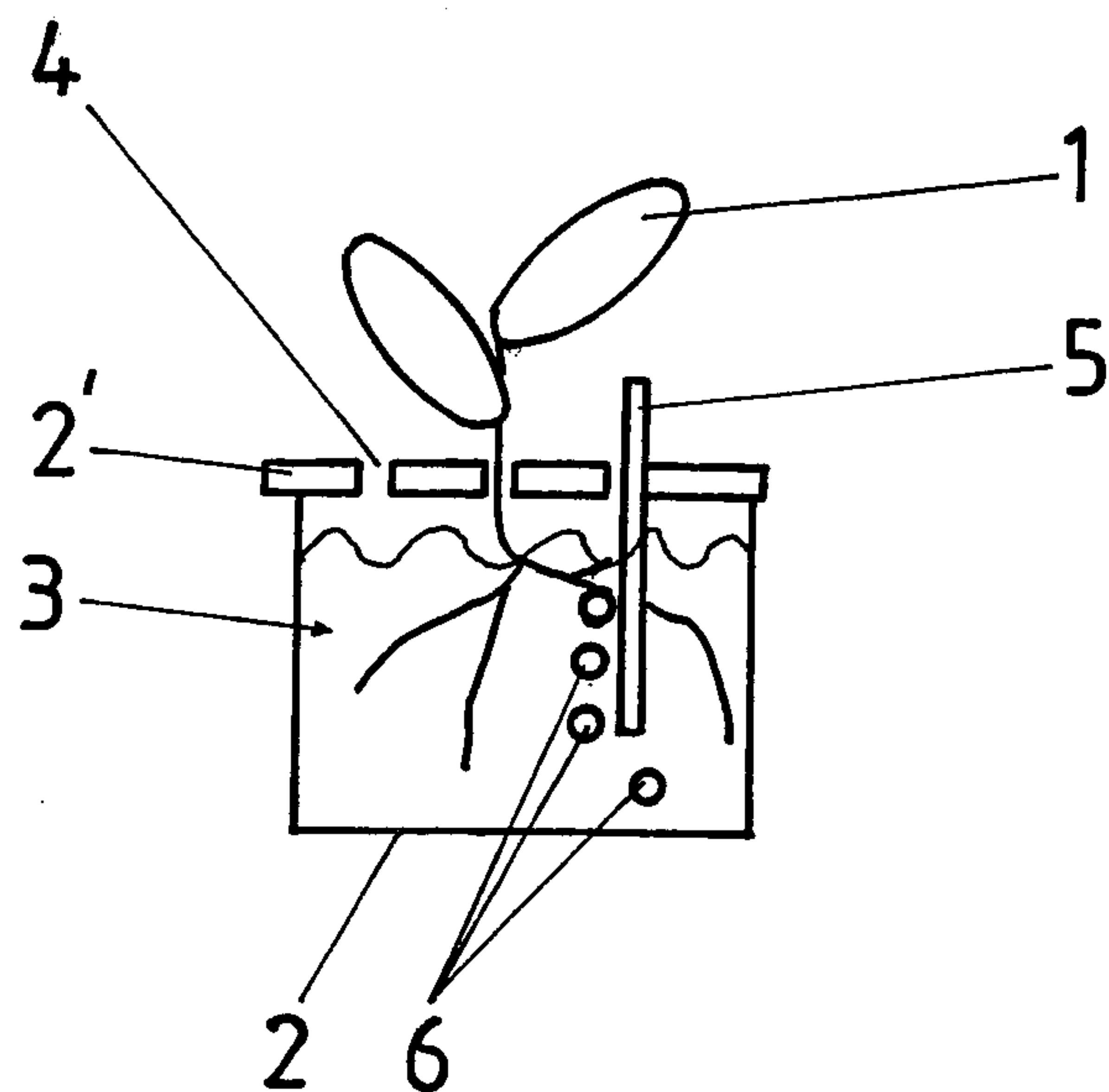


Fig. 2

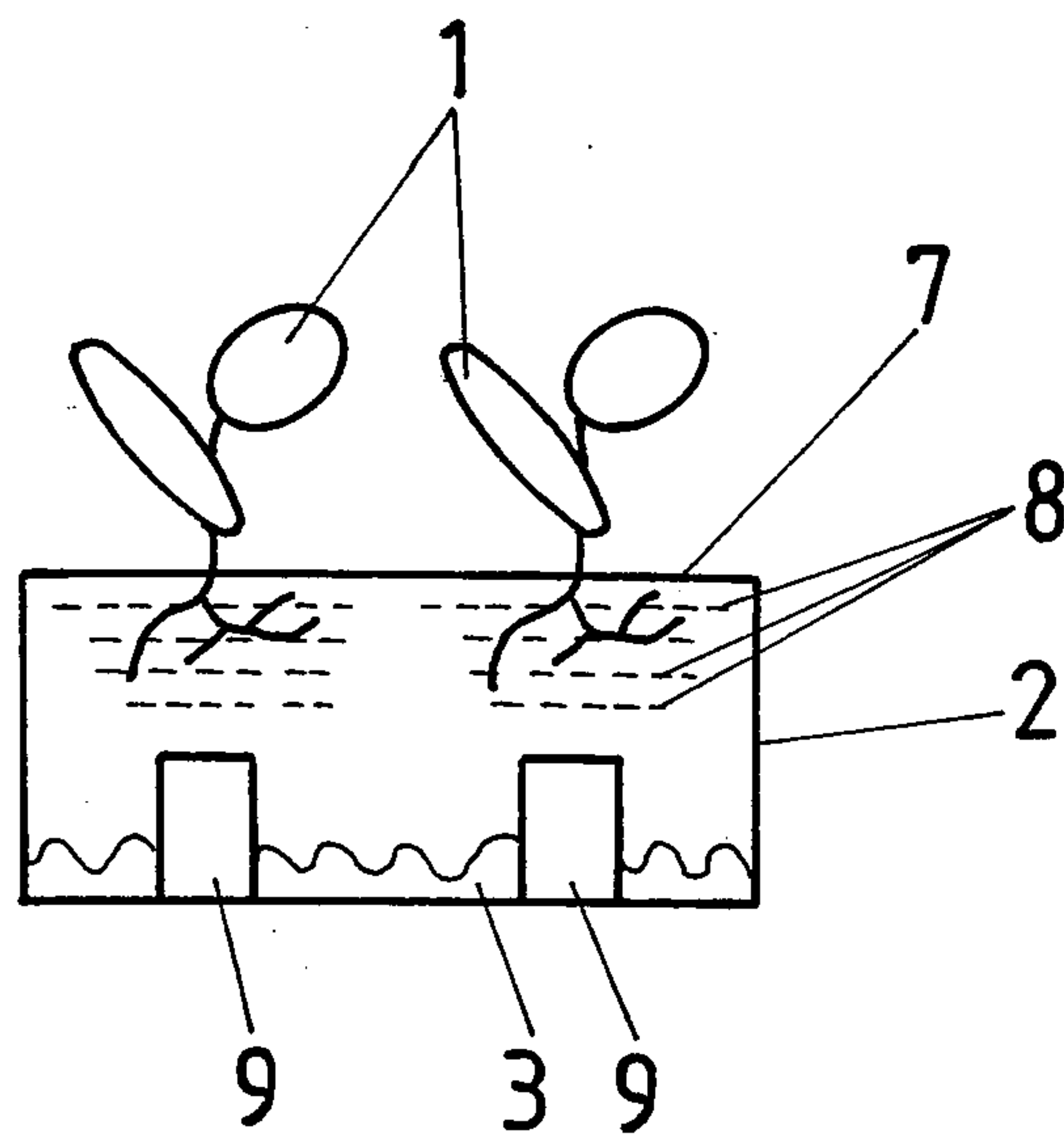
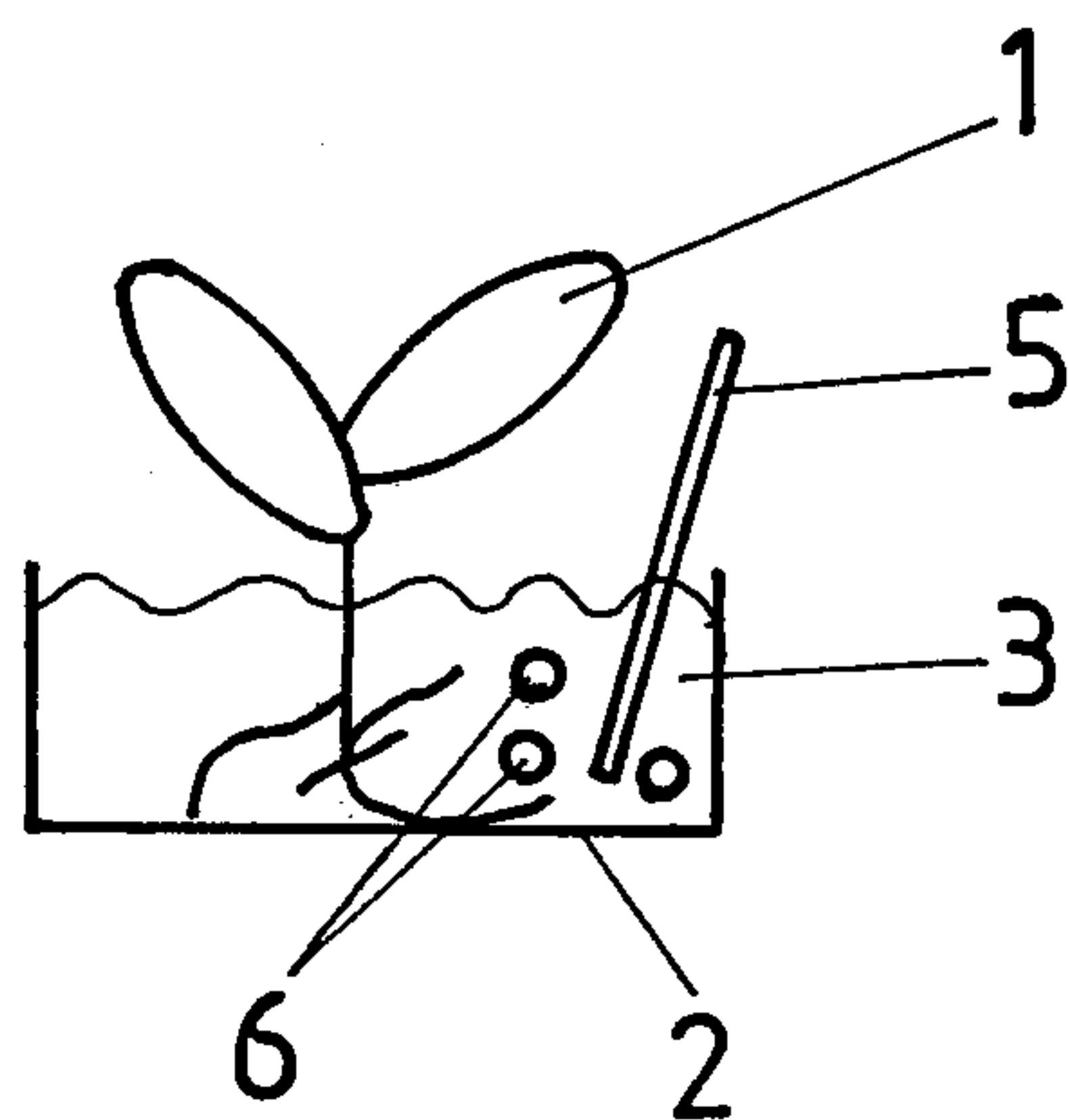


Fig. 3

Fig. 4

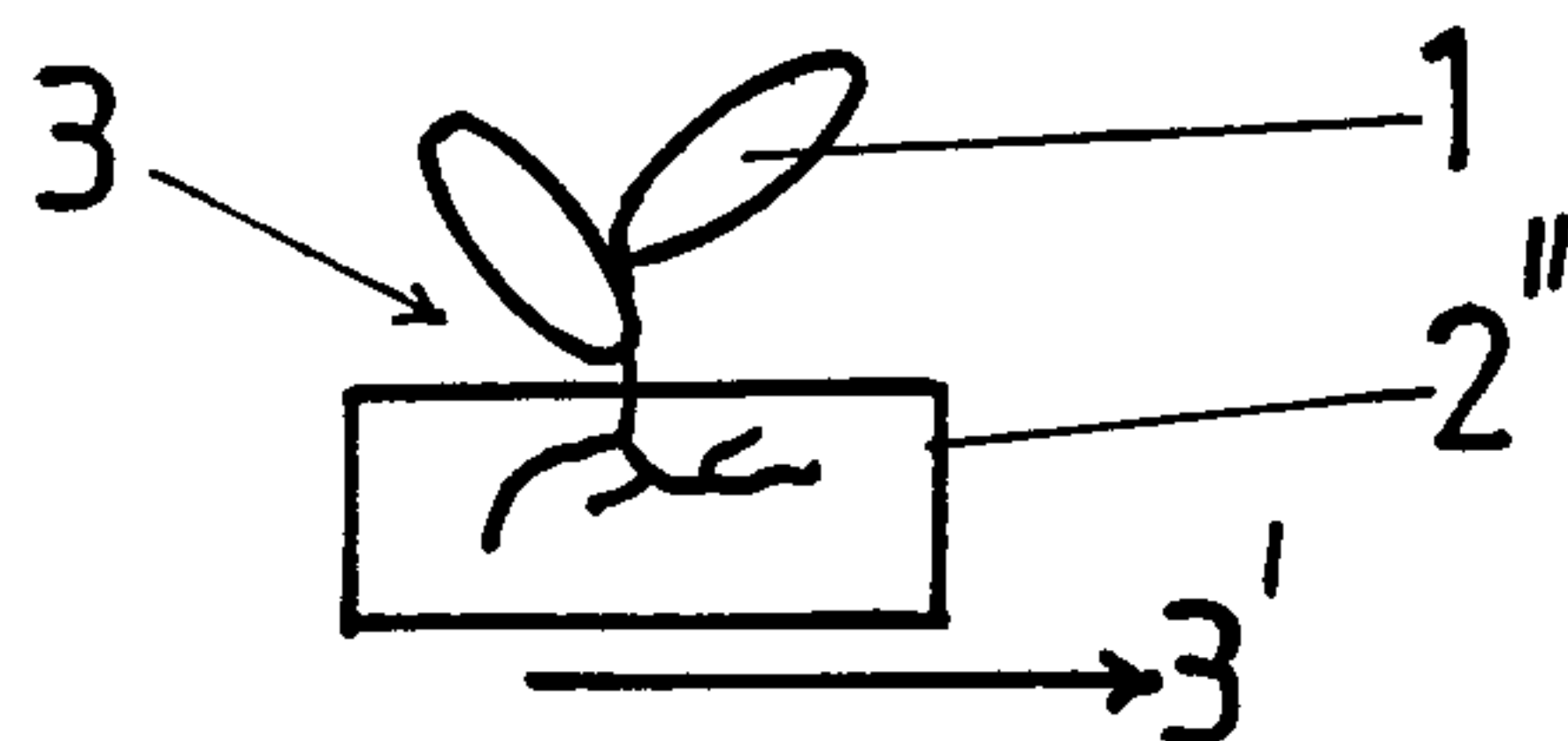


Fig. 4A

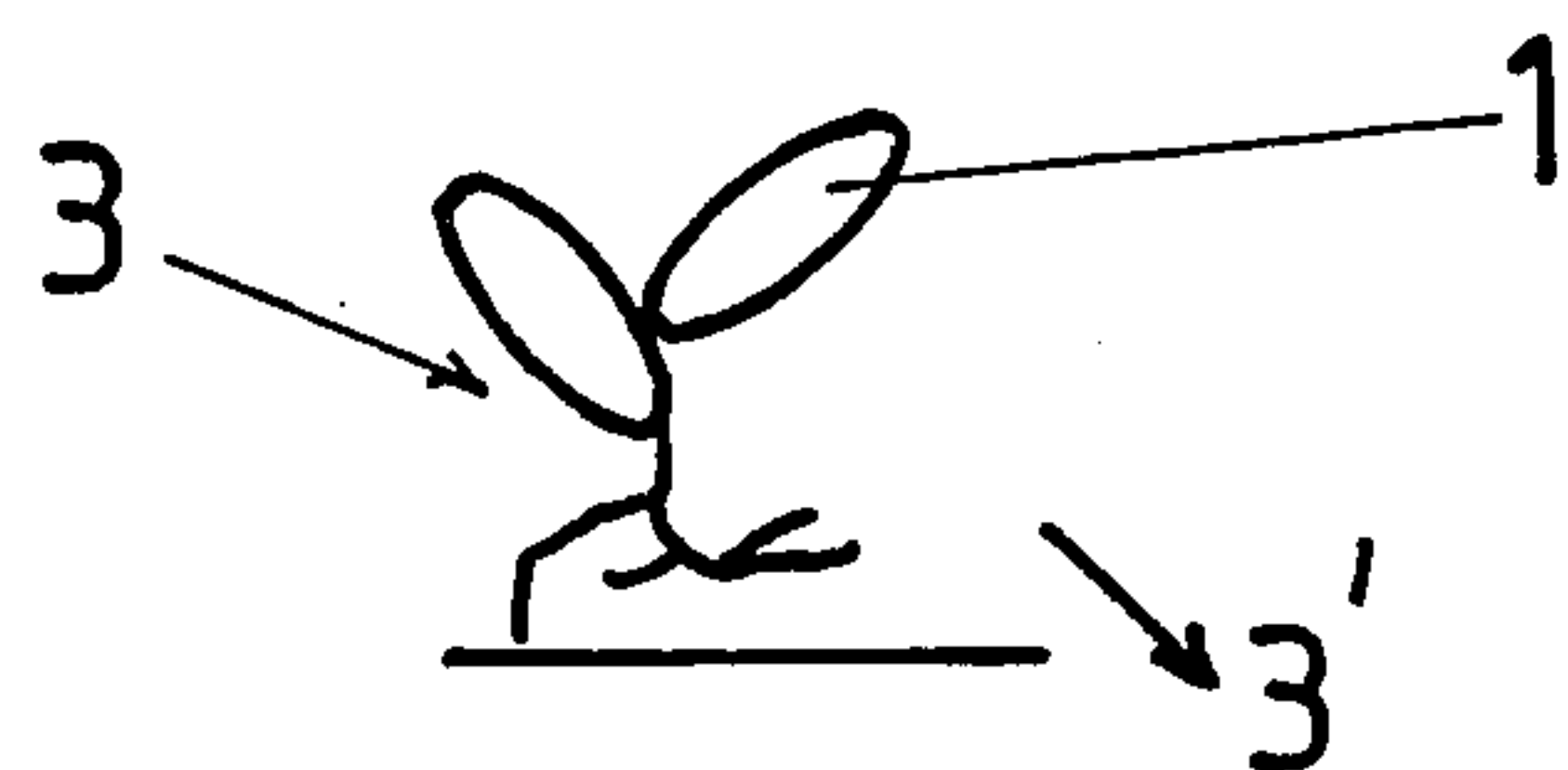


Fig. 4B

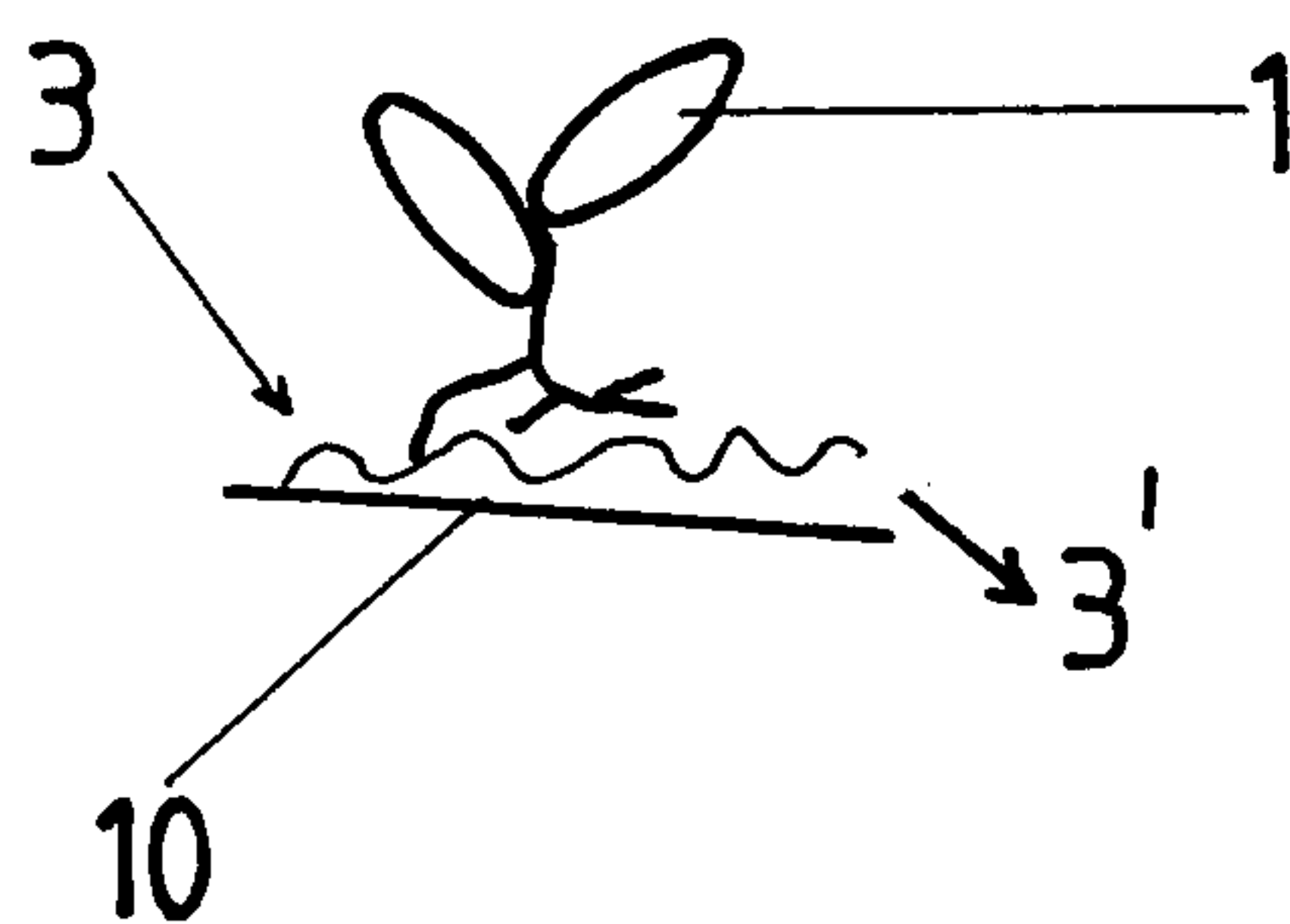


Fig. 5

Fig. 6

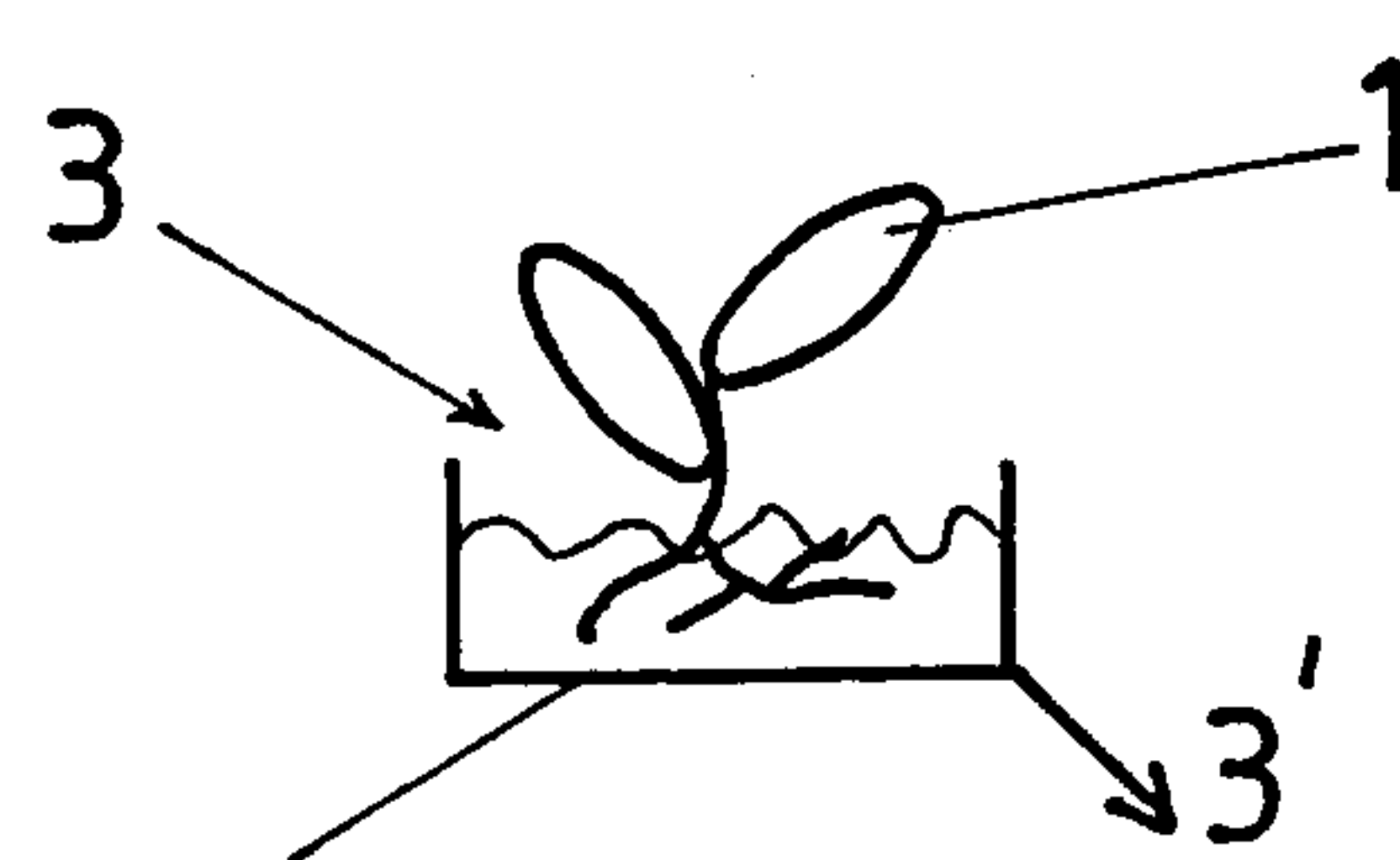


Fig. 6A

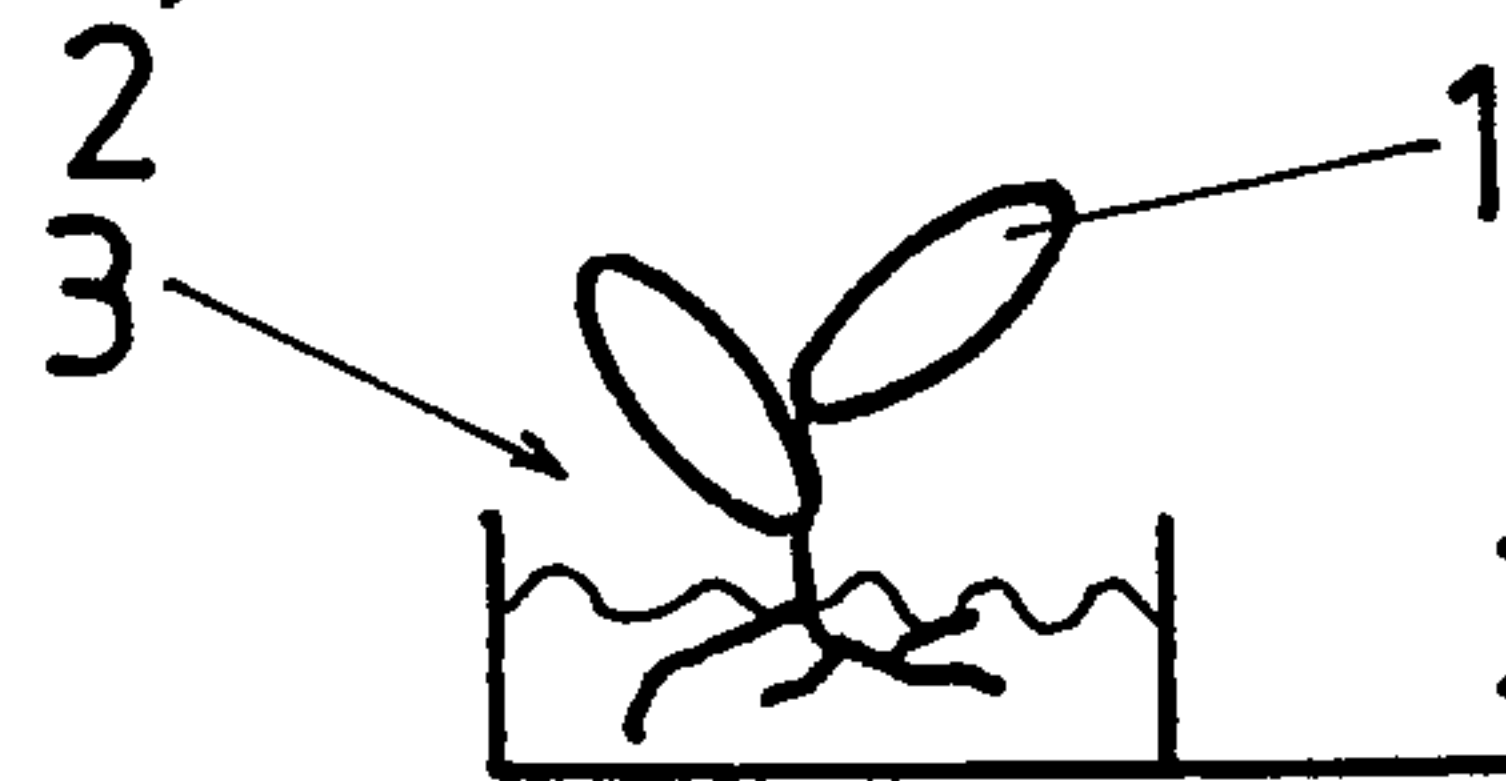


Fig. 6B

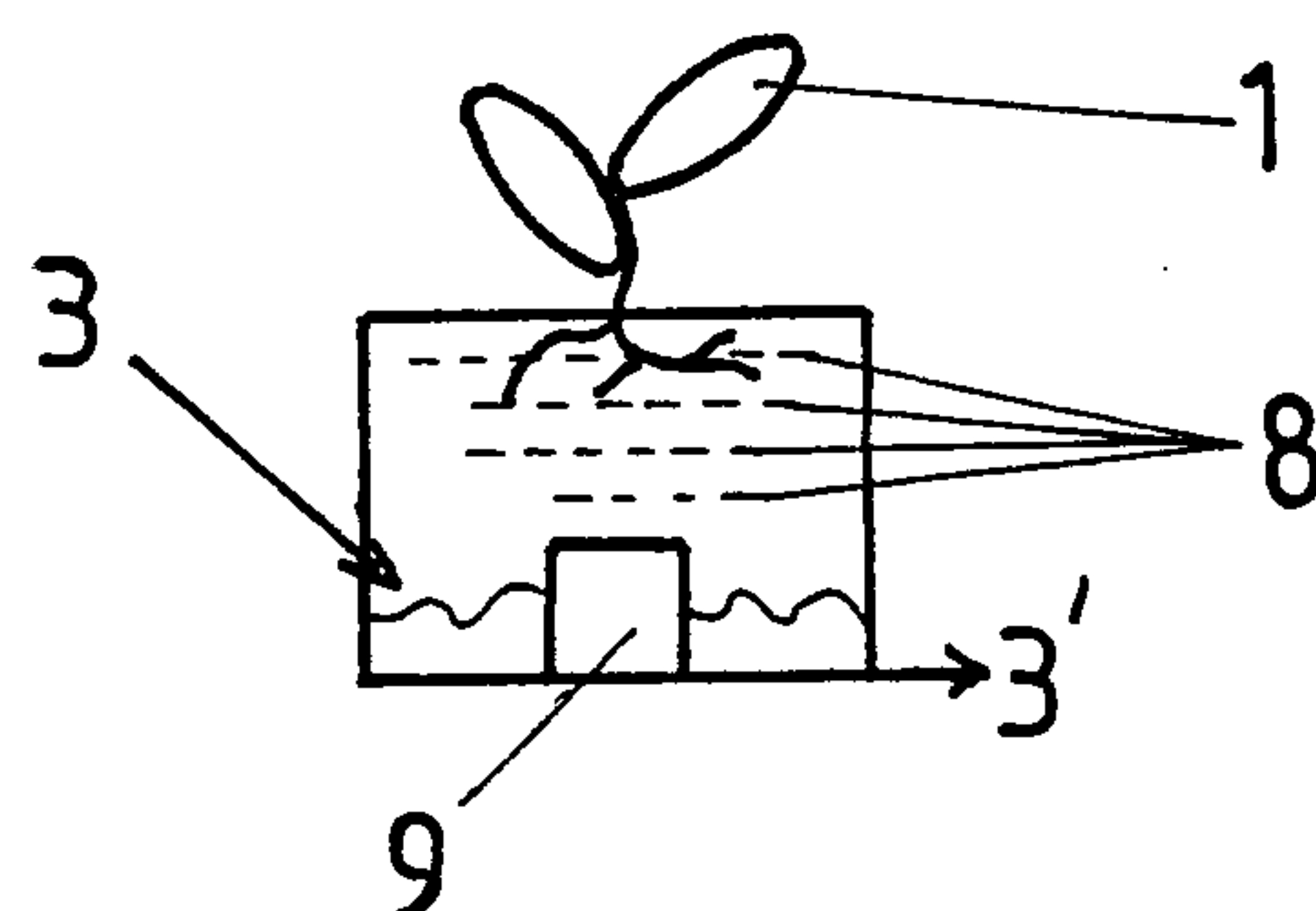


Fig. 7

