UNIVERSITE DE MONTREAL

CONCEPTION D'UN BIOREACTEUR POUR LA CULTURE EN SUSPENSION DE CELLULES DE PLANTES

par

Mario JOLICOEUR

DEPARTEMENT DE GENIE CHIMIQUE

ECOLE POLYTECHNIQUE

MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION

DU GRADE DE MAITRE ES SCIENCES APPLIQUEES (M.Sc.A.)

mai 1990

c Mario Jolicoeur 1990

National Library
of Canada

Canadian Theses Service

Ottawa, Canada
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Service des thèses canadiennes

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

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

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

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

ISBN 0-315-58932-9

Canada

UNIVERSITE DE MONTREAL

ECOLE POLYTECHNIQUE

Ce mémoire intitulé:

CONCEPTION D'UN BIOREACTEUR POUR LA CULTURE EN SUSPENSION DE CELLULES DE PLANTES

présenté par: Mario JOLICOEUR

en vue de l'obtention du grade de: M.Sc.A.

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

M. Pierre J. CARREAU, Ph.D., président

M. Claude CHAVARIE, Ph.D.

M. Bruce RAMSAY, Ph.D.

M. Jean ARCHAMBAULT, Ph.D.

De cette même plume
s'évadent rêves anciens
et planent petits souvenirs
du regard en rotation

SOMMAIRE

Un bioréacteur à fond profilé de volume utile de l'ordre de 10 L pour la culture en suspension de cellules de plantes a été conçu. Un ruban hélicoïdal double fut retenu comme agitateur et une aération par la surface libre accentuée par trois chicanes a été préconisée afin d'éviter la production de mousse.

Une étude modèle à l'aide d'une suspension pseudo-cellulaire d'agar granuleux a permis de vérifier la performance de la configuration de bioréacteur retenue face à une forte augmentation de la viscosité avec la densité cellulaire (de 10^{-3} Pa•s pour une concentration pseudo-cellulaire et cellulaire de 0.1% en matières sèches (M.S.) jusqu'à 0.8 Pa•s pour 2% M.S.). L'homogénéité axiale a été maintenue pour une vitesse d'agitation supérieure à 60 rpm malgré la décantabilité des pseudo-cellules. La présence du fond profilé et des trois chicanes de surface a permis de réduire considérablement les temps de mélange de 25 à 8.5 s et d'augmenter le $k_L a$ de 3 à 20 h^{-1} avec une rotation anti-horaire de 120 rpm pour de l'eau. Pour une vitesse maximale imposée de 150 rpm, le temps de

mélange a diminué de 20 à 4.5 s en présence de chicanes alors que le coefficient de transfert d'oxygène a augmenté de 4 à 43 h^{-1}. L'efficacité des chicanes dans des conditions similaires (120 rpm) fut diminuée par l'augmentation de la densité en pseudo-cellules; le $k_L a$ a chuté de 20 à 3 h^{-1} pour des concentrations de 0 à 3% en matières sèches d'agar granuleux dans de l'eau.

Par la suite, cinq cultures ont été entreprises avec des cellules de Catharanthus roseus (souche MCR17) pour la configuration du bioréacteur la plus performante. Ces essais effectués à 120 rpm à 28°C dans du 1B5 (un milieu de croissance conventionnel pour cellules de plantes contenant 2% et 5% de sucrose) ainsi que des cultures témoins en flacons agités ont mené à des valeurs similaires du taux de croissance de 0,41 j^{-1}. La concentration maximale atteinte en bioréacteur a été similaire aux résultats en flacons et égale à 27 contre 26 g M.S./L respectivement. Le volume apparent occupé par les cellules de ces suspensions correspondait à 100% du volume total de la suspension. En fin de culture, les suspensions sont devenues très visqueuses (leur viscosité apparente (η_a) augmentant de 0.01 à 5 Pa•s du jour 0 au 14^{ième} jour

pour un taux de cisaillement de 0.165 s^{-1} et des concentrations respectives de .1 et 2.5% M.S.). Le caractère rhéofluidifiant s'est aussi intensifié, l'indice non-newtonien n passant de 1 à 0.1. L'oxygénation par la surface libre a néanmoins réussi à maintenir le niveau d'oxygène dissous au-dessus de 10% de la saturation pour de l'air (limite critique à la croissance) par l'enrichissement en oxygène des gaz alimentés.

ABSTRACT

A 10 L working volume bioreactor was developped for suspension culture of plant cells. Efficient surface aeration and mixing was provided by a combination of a double helical ribbon impeller, a profiled bottom and three surface baffles.

A model study with granulated agar as pseudocell suspensions showed the axial homogeneity to be maintained for speeds above 60 rpm. The presence of the three surface baffles and the profiled bottom decreased the mixing time for water from 25 to 8.5 s and increased $k_L a$ values from 3 to 20 h^{-1} at 120 rpm (counterclockwise rotation with an upward pumping at the blades). A $k_L \cdot a$ of 43 h^{-1} with water has been obtained for a maximum rotational speed investigated of 150 rpm counterclockwise and the mixing time decreased from 20 to 4.5 s with the use of baffles. The effectiveness of the baffles for the oxygen transfer decreased with an increase in pseudocell concentration. The $k_L a$ dropped from 20 to 3 h^{-1} for concentrations of 0 to 3% dry weight (d.W.) at 120 rpm.

Batch cultures of Catharanthus roseus cells with 2% and 5% sucrose in 1B5 medium were performed in the bioreactor at 120 rpm and 28^{0}C as well as in shake flasks. Similar growth rates of 0.41 d^{-1} and maximum dry biomass of 27 (bioreactor) and 26 g d.w./L (shake flasks) were obtained. A maximum settled volume of 100% was reached for both culture systems. The shear-thinning behaviour of the suspension with the cell concentration became more pronounced as the flow behaviour index decreased from 1 to 0.1 from day 0 to day 14 and the suspension apparent viscosity increased from 0.01 to 5 Pa•s at a shear rate of 0.165 s^{-1} and concentrations of .1 and 2.5% d.w. respectively. The dissolved oxygen concentration was maintained above 10% of air saturation by oxygen enrichment of the gaz providing surface aeration.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier les personnes suivantes pour leur aide apportée au long de ces travaux de maîtrise:

- mon directeur de recherche, Dr. Claude Chavarie, qui depuis mes premiers pas en biotechnologie a su m'orienter et m'encourager à évoluer en des sphères captivantes;

- Dr. Jean Archambault, mon co-directeur, aussi pour ses encouragements ainsi que pour m'avoir permis d'effectuer ces travaux;

- Dr. Pierre Carreau et Dr. Gérald André pour quelques discussions très intéressantes;

- je remercie spécialement M. Robert Delisle pour les longues heures passées à régler les nombreux problèmes électriques apparaissant sporadiquement;

- aussi je remercie Gérald et Nick de l'atelier de mécanique pour une aide précieuse et efficace lors de la conception et de la réalisation des prototypes;

- je tiens à remercier l'Association des Diplômés de Polytechnique pour leur aide financière;

- toute l'équipe de l'IRB pour la préparation des inocula;

- je remercie particuliairement Claudie, mon amie, pour les longues heures passées au clavier d'un IBM ainsi que pour ces soirées lors desquelles j'avais à prélever des échantillons et autres opérations imprévues.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	v
ABSTRACT	viii
REMERCIEMENTS	x
LISTE DES TABLEAUX	xviii
LISTE DES FIGURES	xix
LISTE DES SYMBOLES	xxvii
LISTE DES ANNEXES	xxxi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTERATURE	5
1.1. Morphologie et physiologie des cellules de plantes	5
1.2. Culture en suspension de cellules de plantes	6
1.2.1. Taux de croissance	6
1.2.2. Comportement rhéologique	7
1.2.3. Sensibilité au cisaillement	8
1.2.4. Besoins en oxygène	11
1.3. Bioréacteurs	13
1.3.1. Agitation mécanique	13
1.3.1.1. Aération par bullage	13
1.3.1.2. Aération par la surface libre	16

1.3.1.3. Aération par membrane 17

1.3.2. Agitation par entraînement gazeux 19

1.4. Systèmes pseudo-cellulaires 20

1.5. Configuration de réacteurs pour fluides visqueux et rhéofluidisants 22

CHAPITRE 2: METHODOLOGIE EXPERIMENTALE 26

2.1. Etude à froid 26

2.1.1. Montage expérimental 26

2.1.2. Préparation de l'agar granuleux 26

2.1.3. Mesure de l'homogénéité axiale 28

2.1.4. Mesure du temps de mélange 28

2.1.5. Mesure du couple à l'agitateur 29

2.1.6. Mesure de la concentration en oxygène dissous 31

2.1.7. Evaluation du $k_L a$ 32

2.2. Cultures 34

2.2.1. Montage expérimental 34

2.2.2. Cellules étudiées: Catharanthus roseus, souche MCR17 35

2.2.3. Conditions opératoires 35

2.2.3.1. Température 35

2.2.3.2. Agitation 37

2.2.3.3. Aération 37

2.2.4. Paramètres physiques 38

2.2.4.1. Mesure de la concentration en oxygène dissous 38

2.2.4.2. Mesure du pH 39

2.2.4.3. Mesure et régulation de la température 39

2.2.4.4. Mesure de débits gazeux 39

2.2.4.5. Evaluation du taux de consommation en oxygène: Qo_2 40

2.2.5. Composition et préparation du milieu de croissance 41

2.2.6. Préparation de l'inoculum 41

2.2.7. Stérilisation 42

2.2.7.1. Le milieu de croissance 42

2.2.7.2. Les équipements 42

2.2.8. Procédures analytiques 43

2.2.8.1. Mesure du volume cellulaire décantable 43

2.2.8.2. Mesure du poids humide 43

2.2.8.3. Mesure du poids sec 44

2.2.8.4. Mesure de la concentration en orthophosphate: PO_4^{-3} 44

2.2.8.5. Mesure de la concentration en nitrates: NO_3^{-2} 45

2.2.8.6. Mesure de la concentration en azote ammoniacal: NH_4^{+} 45

2.2.8.7. Concentration en hydrates de carbone 46
2.3. Mesure de la vitesse d'agitation 47
2.4. Mesure de la viscosité de la suspension 47

CHAPITRE 3: SELECTION ET CARACTERISATION D'UNE SUSPENSION PSEUDO-CELLULAIRE 49
3.1. Suspension modèle à froid 49
3.2. Résultats 50
3.2.1. Morphologie 50
3.2.2. Volume humide décantable 52
3.2.3. Comportement rhéologique 52
3.3. Discussion 57

CHAPITRE 4: CONCEPTION ET CARACTERISATION DU BIOREACTEUR MODELE 59
4.1. Utilisation d'un agitateur à double ruban hélicoïdal 59
4.2. Choix d'une aération par la surface libre 60
4.3. Paramètres de conception 60
4.4. Développement du bioréacteur modèle et résultats 61
4.4.1. Présentation de configurations de base et amélioration de conception 61
4.4.2. Evaluation de la qualité de mélange 69

4.4.2.1. Homogénéité 69
4.4.2.2. Caractérisation par le temps de mélange 71
4.4.3. Comportement face au transfert d'oxygène 77
4.4.4. Puissance consommée à l'agitateur 86
4.5. Discussion des résultats 86
4.5.1. Temps de mélange 86
4.5.2. Capacité de transfert d'oxygène 90
4.5.3. Relation entre le temps de mélange et le $k_L a$ 96
4.5.4. Relation entre la puissance consommée à l'agitateur, le $k_L a$ et la concentration en pseudo-cellules 101
4.5.5. Potentiel de mise à l'échelle 103

CHAPITRE 5: CULTURES EN BIOREACTEUR 104
5.1. Choix de croissances comparatives en flacons agités 104
5.2. Résultats de cultures 105
5.2.1. Observations et résultats de croissance 105
5.2.2. Suivi du comportement rhéologique 121
5.2.3. Evaluation du taux de consommation en oxygène: Qo_2 121

5.3. Discussions sur les résultats de cultures 125
5.3.1. Rhéologie des suspensions cellulaires 125
5.3.2. Performances du bioréacteur 127
5.3.3. Transfert d'oxygène 132

CONCLUSION 136
RECOMMANDATIONS 142
REFERENCES 145

ANNEXE A 158
ANNEXE B 160
ANNEXE C 164
ANNEXE D 178
ANNEXE E 181
ANNEXE F 185
ANNEXE G 205
ANNEXE H 219
ANNEXE I 231

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques de deux agitateurs à rubans hélicoïdaux 25

Tableau 2 : Designs des chicanes de surface étudiées 67

Tableau 3 : Temps de mélange pour les réacteurs modèles 74

Tableau 4 : Influence du sens de rotation sur le $k_L a$ 80

Tableau 5 : Paramètres de croissance 117

Tableau 6 : Importance de la croissance sur les parois non-mouillées du bioréacteur 119

Tableau 7 : Taux de consommation en oxygène 125

Tableau B1: Temps de réponse des sondes à oxygène 161

Tableau E1: Composition du milieu de culture 1B5 182

Tableau F1: Caractéristiques des solutions de xanthane 190

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Montage expérimental du réacteur modèle 27

Figure 2 : Courbe de calibration du couple-mètre 30

Figure 3 : Montage expérimental du bioréacteur de culture 36

Figure 4 : Distribution de tailles des granules d'agar 51

Figure 5 : Photos au microscope de granules d'agar et de cellules de plantes 53

Figure 6 : Volume décantable de l'agar granuleux et des cellules de plantes 54

Figure 7 : Courbe comparative de viscosité pour un taux de cisaillement de γ=33 s^{-1} 55

Figure 8 : Courbes de viscosité de suspensions d'agar granuleux 56

Figure 9 : Configuration de base du réacteur modèle 62

Figure 10 : Réacteur modèle muni d'un fond profilé 63

Figure 11 : Hauteur du vortex 65

Figure 12 : Planches photographiques montrant l'entraînement gazeux causé par les chicanes 68

Figure 13 : Mesure de l'homogénéité axiale 72

Figure 14 : Planches photographiques; zone à mélange lent 73

Figure 15 : Courbes de mesure de $k_L a$ 78

Figure 16 : Influence de la longueur des chicanes sur le $k_L a$ 82

Figure 17 : Etude de l'influence de l'orientation des chicanes à 120 rpm 83

Figure 18 : Etude de l'influence de l'orientation des chicanes à 135 rpm 84

Figure 19 : Etude de l'influence de l'orientation des chicanes à 150 rpm 85

Figure 20 : Puissance appliquée à l'agitateur: rotation anti-horaire, avec et sans chicanes 87

Figure 21 : Nombre de rotations nécessaires à l'homogénéisation selon la vitesse d'agitation 89

Figure 22 : Taux de transfert de l'oxygène face à une demande cellulaire estimée 93

Figure 23 : Concentration estimée en oxygène dissous 95

Figure 24 : Circuit de circulation du fluide 97

Figure 25 : Relation entre le $k_L a$ et le temps de mélange total; rotation anti-horaire, 3 chicanes de surface 100

Figure 26 : Relation entre le $k_L a$ et la puissance développée à l'agitateur 102

Figure 27 : Courbe de croissance: culture 1 en bioréacteur 106

Figure 28 : Courbe des substrats: culture 1 en bioréacteur 107

Figure 29 : Courbes de croissance et des substrats: culture 2 en bioréacteur 109

Figure 30 : Courbe de suivi de l'oxygène: culture 2 en bioréacteur 110

Figure 31 : Courbes de croissance: culture 5 en bioréacteur et flacon agité 112

Figure 32 : Courbe de suivi des substrats: culture 5 en bioréacteur 113

Figure 33 : Courbe de suivi des substrats: culture 5 en flacon agité 114

Figure 34 : Courbe de suivi de l'oxygène: culture 5 en bioréacteur 115

Figure 35 : Courbe de suivi du pH: cultures en bioréacteur 116

Figure 36 : Courbe de viscosité: culture 5 en bioréacteur 122

Figure 37 : Courbe de viscosité: culture 5 en flacon agités 123

Figure 38 : Courbe d'évaluation du Qo_2 : culture 4 en bioréacteur, $6^{ième}$ jour 124

Figure 39 : Courbe de suivi des paramètres de la loi de puissance: cultures en bioréacteurs 128

Figure 40 : Courbe de suivi des paramètres de la loi de puissance: cultures en flacons agités 129

Figure B1 : Courbe de réponse de la sonde à oxygène YSI 162

Figure B2 : Courbe de réponse de la sonde à oxygène Ingold 163

Figure C1 : Bioréacteur de croissance 165

Figure C2 : Couvercle du bioréacteur 166

Figure C2a: Vue de coupe 166

Figure C2b: Vue du dessus 166

Figure C3 : Chicanes de surface 168

Figure C4 : Agitateur à rubans hélicoïdaux double 169
Figure C5 : Arbre supérieur de l'agitateur 170
Figure C6 : Base du bioréacteur: vue de coupe 171
Figure C7 : Base du bioréacteur: vue du dessus 172
Figure C8 : Base du bioréacteur: ports d'entrée 173
Figure C8c: Port d'échantillonnage 174
Figure C9 : Bélier de la vanne de sortie 175
Figure C9a: Vue complète de côté 175
Figure C9b: Corps du bélier 175
Figure C9c: Manivelle 176
Figure C9d: Système de roulement de la manivelle 176
Figure C10: Tube de verre central 177
Figure F1 : Configuration du ruban hélicoïdal simple 188
Figure F2 : Courbes de viscosité de solutions de xanthane: rhéomètres Brookfield et Bohlin 191
Figure F3 : Ratio couple/Lecture au rhéomètre Brookfield 195
Figure F4 : Relation viscosité/Lecture au rhéomètre Brookfield muni d'un ruban hélicoïdal simple 198
Figure F5 : Evaluation du facteur de proportionnalité k_s 200

Figure F6 : Courbe de puissance: ruban hélicoïdal simple 202
Figure G1 : Planches photographiques: essais de décoloration; 60 rpm; fond plat 206
Figure G2 : Planches photographiques: essais de décoloration; 60 rpm; fond profilé 207
Figure G3 : Planches photographiques: essais de décoloration; 90 rpm; fond plat 208
Figure G4 : Planches photographiques: essais de décoloration; 90 rpm; fond profilé 209
Figure G5 : Planches photographiques: essais de décoloration; 120 rpm; fond plat 210
Figure G6 : Planches photographiques: essais de décoloration; 120 rpm; fond profilé 211
Figure G7 : Planches photographiques: essais de décoloration; 120 rpm; fond profilé; 3 chicanes de surface 212
Figure G8 : Planches photographiques: essais de décoloration; 135 rpm; fond plat 213
Figure G9 : Planches photographiques: essais de décoloration; 135 rpm; fond profilé 214
Figure G10: Planches photographiques: essais de décoloration; 135 rpm; fond profilé; 3 chicanes de surface 215

Figure G11: Planches photographiques: essais de décoloration; 150 rpm; fond plat 216
Figure G12: Planches photographiques: essais de décoloration; 150 rpm; fond profilé 217
Figure G13: Planches photographiques: essais de décoloration; 150 rpm; fond profilé; 3 chicanes de surface 218
Figure H1 : Courbes de croissance: culture 3 en bioréacteur et flacons agités 220
Figure H2 : Courbe de suivi des substrats: culture 3 en bioréacteur 221
Figure H3 : Courbe de suivi des substrats: culture 3 en flacon agité 222
Figure H4 : Courbe de suivi de l'oxygène: culture 3 en bioréacteur 223
Figure H5 : Courbes de viscosité: culture 3 en bioréacteur 224
Figure H6 : Courbes de croissance: culture 4 en bioréacteur et flacons agités 225
Figure H7 : Courbe de suivi des substrats: culture 4 en bioréacteur 226
Figure H8 : Courbe de suivi des substrats: culture 4 en flacon agité 227

Figure H9 : Courbes de suivi de l'oxygène: culture 4 en bioréacteur 228

Figure H10: Courbes de viscosité: culture 4 en bioréacteur 229

Figure H11: Courbes de viscosité: culture 4 en flacon agité 230

Figure I1 : Courbe d'évaluation du Qo_2 : culture 4 en bioréacteur, $14^{ième}$ jour 232

Figure I2 : Courbe d'évaluation du Qo_2 : culture 5 en bioréacteur, $14^{ième}$ jour 233

LISTE DES SYMBOLES

a : aire interfaciale (m^2/m^3)

A_{RH} : surface du ruban hélicoïdal simple (m^2)

A_c : surface de cylindres pleins (m^2)

C.M.C. : carboxy-méthylcellulose

Co_2 : concentration en oxygène dissous dans le liquide (mg o_2/L)

Co_2^* : concentration de saturation en oxygène (mg o_2/L)

c1 : une constante (éq. 7) ((rotations/s)$^{(1-a)}$)

c2 : une constante (éq. 7)

c3 : une constante (éq. F4) (m^3)

c4 : une constante (éq. F5) ((% d'échelle)/Pa)

d : diamètre de l'agitateur aux rubans (m)

D : diamètre du réservoir (m)

D_{O2} : coefficient de diffusivité de l'oxygène gazeux dans l'eau (m^2/h)

d.w. : matières sèches ("dry weight") (g)

H : hauteur du liquide (m)

hc : hauteur des rubans de l'agitateur (m)

He : constante de Henry (atm/(mg/L))

Ho : hauteur initiale du fluide au repos (m)

k_L : coefficient de transfert de l'oxygène (m/h)

k_e : coefficient de transfert relatif aux sondes à oxygène (éq. 5) (h^{-1})

$k_L a$: coefficient de transfert de l'oxygène de la phase gazeuse au liquide (h^{-1})

k_p : facteur de proportionnalité entre Np et Re (éq. F10)

k_s : facteur de proportionnalité entre γ_a et N (éq. F6) ($(rotations)^{-1}$)

l : longueur du ruban hélicoïdal (m)

L : lecture au rhéomètre Brookfield (% d'échelle)

m : indice de consistance de la loi de puissance ($Pa \cdot s^{(1+n)}$)

M : nombre de rotations nécessaires à l'homogénéité (rotations)

M.H. : matière humide (g)

M.S. : matière sèche (g)

n : indice du comportement en écoulement de la loi de puissance

N : vitesse de rotation (rpm)

Np : nombre de puissance

p : le pas des rubans hélicoïdaux (m)

P : puissance développée à l'agitateur (w)

P_t : pression totale (N/m^2)

Qo_2 : taux de consommation spécifique en oxygène (mg o_2 /g M.S./h)

r : rayon (m)

Rc : rayon des cylindres (m)

R_{RH} : rayon à l'extrémité des rubans hélicoïdaux (m)

R_b : bras de levier (éq. F1) (m)

Re : nombre de Reynolds

So : concentration initiale en hydrates de carbone totaux (% massique)

t : temps (h)

t_c : temps de recirculation (s)

t_e : temps de réponse des sondes à oxygène (s)

t_{exp} : temps d'exposition d'éléments de fluide à la surface libre (h)

t_g : temps de génération cellulaire (j)

t_m : temps de mélange total (s)

t_{m1} : temps de mélange de la zone à mélange rapide (s)

t_{m2} : temps de mélange de la zone à mélange lent (s)

V : volume utile du bioréacteur (m^3)

V_r : composante radiale de la vitesse du fluide (m/s)

V_z : composante axiale de la vitesse du fluide (m/s)

w : largeur des rubans hélicoïdaux (m)

x : concentration en cellules (g M.S./L)

x_o : concentration initiale en cellules (g M.S./L)

Yo_2 : fraction volumique de l'oxygène dans un gaz

$Y_{x/s}$: coefficient de rendement cellulaire
(g M.S./g d'hydrates de carbone alimentés)

z : fraction de la hauteur totale du liquide (m)

γ : taux de cisaillement (s^{-1})

γ_a : taux de cisaillement apparent (s^{-1})

η : viscosité (Pa•s)

η_a : viscosité apparente (s^{-1})

μ : taux de croissance (éq. 16) (j^{-1})

μ : viscosité newtonnienne (éq. F2) (Pa•s)

ρ : densité cellulaire humide (kg M.H./m^3 M.H.)

τ : contrainte de cisaillement (N/m^2)

$\mathcal{T}$: couple appliqué à l'agitateur (N•m)

ω : vitesse angulaire (rad/s)

LISTE DES ANNEXES

Annexe A : Préparation des réactifs et description détaillée de la méthode de coloration/décoloration 158

Annexe B : Temps de réponse des sondes à oxygène 160

Annexe C : Plans techniques du bioréacteur 164

Annexe D : Technologie de mise en suspension des cellules de plantes 178

Annexe E : Milieu de croissance 1B5 181

Annexe F : Caractérisation d'un agitateur à ruban hélicoïdal simple comme élément de mesure d'un rhéomètre 185

Annexe G : Planches photographiques des essais de coloration/décoloration 205

Annexe H : Données expérimentales des cultures avec des cellules de C.roseus 219

Annexe I : Courbes expérimentales pour la mesure du Qo_2 231

INTRODUCTION

Le marché mondial de composés extraits de plantes s'élève à environ 10$ milliards par année (1). On parle de substances utilisées principalement dans les domaines alimentaire (colorants et saveurs) et pharmaceutique (codéine, morphine, vincristine, vinblastine, etc.). Certains composés tels la vincristine et la vinblastine (agents anti-leucémiques) ont un intérêt économique non-négligeable par leur prix de vente élevé (5000$/g) (2).

Gautheret réussissait la première culture de tissus végétaux en 1934 (1). En 1942, il observait la présence dans le tissus cultivé de composés normalement détectés et extraits de plantes. Ces substances sont dites métabolites secondaires car elles apparaissent en phase stationnaire de croissance. Cette découverte posait le pas d'une culture de tissus pour fins de production de composés d'intérêt qui serait indépendante du climat.

Depuis, de grands progrès ont été réalisés quant aux techniques d'isolement de souches de cellules

productives ainsi que pour la définition des milieux de croissance et de production de métabolites secondaires. Pourtant les besoins pour des bioréacteurs efficaces pour la culture en suspension à haute densité cellulaire demeurent réels. Plusieurs caractéristiques des suspensions de cellules de plantes rendent peu efficaces bioréacteurs conventionnels de type "airlift" ainsi que les cuves agitées mécaniquement. Les cellules de plantes ont un taux de croissance se chiffrant en jours (3), sont sensibles au cisaillement (4,5), croissent sous forme d'agrégats de diamètre jusqu'à 2000 μm (4) et ont un comportement rhéofluidisant pour des suspensions denses (>1% matières sèches (M.S.)) (6). Une mauvaise qualité de mélange, un transfert d'oxygène insuffisant, un cisaillement trop élevé ainsi qu'une production de mousse constituent les principaux problèmes posés lors d'une culture en suspension (7).

Ce travail de recherche porte sur la conception d'un bioréacteur pour la culture en suspension de cellules de plantes. Il s'inscrit dans le cadre d'un projet global de développement d'un procédé industriel de production de métabolites secondaires.

L'objectif de ce projet de recherche consiste à concevoir un bioréacteur capable de cultiver et de maintenir viable un volume d'environ 10 L de suspensions cellulaires denses (>2% M.S.) pouvant servir d'inoculum de bioréacteurs d'immobilisation de volumes supérieurs.

Ce mémoire de maîtrise comporte trois grandes sections précédées par une description sommaire de la lignée cellulaire utilisée ainsi qu'une revue générale de la littérature. Le premier chapitre expérimental porte sur la sélection et la caractérisation d'une suspension d'agar utilisée pour simuler le comportement de cellules de plantes au cours du développement du prototype du bioréacteur. En un deuxième temps, un réacteur modèle muni d'un agitateur à rubans hélicoïdaux sera caractérisé relativement au temps de mélange ainsi qu'au taux de transfert de masse d'oxygène sous une aération par la surface libre uniquement. Par la suite, des cultures seront effectuées avec des cellules de Catharanthus roseus. Le choix de cette espèce fut orienté par l'abondance de littérature disponible à son sujet ainsi que par les connaissances expérimentales que possède le groupe de

recherche du Dr. J. Archambault de l'Institut de Recherche en Biotechnologie du Conseil National de Recherche (IRB) avec ce type de cellule.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTERATURE

1.1. Morphologie et physiologie des cellules de plantes

Les cellules végétales sont de grosses cellules dont le diamètre moyen varie généralement de 20 à 150 μm (3,4). Cette taille correspond à un volume cellulaire de l'ordre de 100 à 200000 fois supérieur à celui des bactéries (5). Le contenu en eau des cellules peut atteindre plus de 95% selon leur phase de croissance et leur masse volumique est légèrement supérieure à celle de l'eau (1,002 et 1,023 kg/L) (3). Les cellules sont largement vacuolisées en fin de croissance (6). Bien que leur membrane cellulaire à base de cellulose leur permet d'être résistantes aux contraintes sous tension ainsi qu'à de grandes pressions osmotiques, elles n'en demeurent pas moins sensibles au cisaillement (6,7,8).

Une des caractéristiques importantes des cellules végétales repose en leur richesse génétique qui leur confère un potentiel de totipotence (chaque cellule possède un bagage génétique complet lui permettant de

former n'importe quel tissu d'une plante) (5). Les cellules de plantes cultivées en suspension sont de type hétérotrophe (consomment du carbone organique) et vivent en conditions aérobies (9,10).

1.2. Culture en suspension de cellules de plantes

1.2.1. Taux de croissance

Plusieurs caractéristiques des cellules de plantes compliquent particulièrement la conception d'un bioréacteur de culture en suspension. Avec un temps de dédoublement cellulaire de plus de 24 h (27^0 C) pour Catharanthus roseus (4,11,12) la stérilité du système de culture ainsi que des périphériques du bioréacteur doit être maintenue pendant plusieurs jours. Les taux de croissance spécifique retrouvés dans la littérature varient selon la souche et les conditions de culture. On parle généralement de 0,45 j^{-1} (12). Courtois et Guern (13) trouvèrent μ = 0,55 j^{-1} à 23^0C et 0,68 j^{-1} à 27^0 C pour C. roseus.

1.2.2. Comportement rhéologique

Les cellules de plantes croissent sous forme d'agrégats de plus de 2000 μm (5,6) qui ont tendance à précipiter. Ces agrégats peuvent être composés de plus de 200 cellules (6). Cette forte taille les rendant visibles à l'oeil nu fait en sorte qu'elles occupent une portion importante du volume de la suspension à forte concentration cellulaire; la concentration maximale (100% du volume de la suspension) en cellules de C. roseus peut être estimée par calcul à environ 30 g M.S./L lorsque l'on considère que leur contenu en eau est d'environ 95%.

De fait, plusieurs auteurs ont démontré que cette forte concentration en particules (cellules et agrégats) confère à la suspension un comportement non-newtonien rhéofluidifiant (3,14,15). Des mesures au rhéomètre Brookfield ont permis à Tanaka (3) de montrer que la viscosité des suspension de cellules de plantes obéissait à une loi de puissance de type:

$$\eta = m \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \qquad (1)$$

pour des concentrations cellulaires supérieures à 1% M.S.. Des valeurs constantes de n de 0,53 et 0,79 pour des cellules de C. roseus et pour des cellules de Nicotiana tabacum ont été obtenues. Aussi cet auteur a montré que pour des concentrations supérieures à 1% M.S. l'indice de consistance m suit une loi de puissance avec la concentration (soit environ 0,05 pour un poids sec de 1% et plus de 1 pour 1,3%).

D'autres travaux ont démontré le caractère newtonien du filtrat des suspensions: les viscosités variant de 1,0 à $1,4 \times 10^{-3}$ Pa•s pour des suspensions de C. roseus (10) et de 0,9 à $2,2 \times 10^{-3}$ Pa•s pour des suspensions de N. tabacum (16).

1.2.3. Sensibilité au cisaillement

Leur paroi cellulaire rigide à base de cellulose rend les cellules de plantes friables et sensibles au cisaillement (6,7). Peu d'études complètes et systématiques traitent de seuils critiques de cisaillement sur la viabilité des cellules. Quelques travaux permettent toutefois d'évaluer l'influence du cisaillement. Selon Pareilleux (4) la viabilité de

cellules de plantes telles C. roseus peut être affectée si les contraintes de cisaillement dépassent des valeurs de 1000 à 5000 N/m^2. Pour les agrégats cellulaires il parle d'une limite d'adhésion de 200 N/m^2 au-delà de laquelle la cohésion des cellules entre elles n'est plus assurée.

Scragg et al. (17) ont soumis un échantillon d'une suspension de Catharanthus roseus d'une concentration de 100 g M.H./L durant 5 minutes à un taux de cisaillement constant de 297 s^{-1}. Ces auteurs n'ont pas noté de diminution de la masse sèche totale au cours des essais. Le cisaillement imposé a surtout provoqué le bris des agrégats de taille moyenne. Aussi, selon l'évolution de la viscosité apparente, il semblerait que l'effet soit très direct et rapide. Il est aussi difficile de conclure de ce type d'expérience n'investiguant qu'une seule valeur du taux de cisaillement ainsi qu'un temps d'exposition relativement négligeable face à un temps de culture autour de 10 j.

Dans des travaux plus récents, Scragg et al. (8) ont soumis des suspensions de cellules de C. roseus à

un taux de cisaillement moyen de 167 s^{-1} pendant 5 heures. Deux lignées cellulaires furent testées, soit la souche C87N et la souche IDI. Pour la souche C87N, cultivée depuis trois ans, une rapide diminution des poids sec et humide (du nombre de cellules) confirme que le seuil critique du taux de cisaillement fut dépassé et qu'il s'en suivit, nous supposons, une importante lyse cellulaire. Aussi, les chercheurs ont noté que la distribution de tailles des agrégats se stabilise assez rapidement. Quant à la souche IDI, initiée seulement quelques mois avant l'essai, elle s'est avérée beaucoup plus résistante. Les taux de croissance des suspensions de C. roseus C87N soumises au traitement fut comparables à celles qui n'ont pas subi de traitement. Ces résultats confirment l'hypothèse de degrés de sensibilité au cisaillement fonction des souches étudiées.

Lors d'autres travaux Tanaka et al. (18) ont maintenu des conditions d'agitation constantes tout au long de cultures comparatives avec des cellules de C. roseus en flacons agités. Deux systèmes de culture furent utilisées: erlenmeyer de 500 mL (volume utile de 100 mL) sans et avec 2 chicanes immergées et orientées

radialement. Une vitesse d'agitation de 140 rpm a été imposée. Une variation dans la composition de la paroi cellulaire a été notée entre les deux modes de culture. Formé principalement de pectine (environ 40%) les cellules qui sont soumises à un stress hydrodynamique inférieur (sans chicane) ont des contenus en hémicelluloses A et B ainsi qu'en cellulose de 15 à 20%. Les cellules en présence de chicanes ont une paroi cellulaire composée dans des proportions similaires des substances citées ci-haut. Pour une concentration initiale en sucrose de 30 g/L la concentration maximale en cellules fut inférieure en présence de chicanes et la croissance fut plus lente: soit 10 g M.S./L au 9^{ième} jour contre 6.5 g M.S./L au 15^{ième} jour respectivement. Les taux de croissances ont été de 1.36 g M.S./L/j sans chicane contre 0.42 g M.S./L/j en présence de chicanes.

1.2.4. Besoins en oxygène

Les besoins en oxygène des cellules de plantes sont modérés comparativement aux bactéries. En fait, le taux de consommation en oxygène des cellules végétales est de 20 à 63 fois moindre que pour des

levures (4,19,20). Payne et al. (19) parlent d'une consommation de $4,79x10^{-3}$ kg O_2/kg M.S./h alors que Pareilleux (4) propose un taux de consommation de 10 à $15x10^{-3}$ kg O_2/kg M.S./h pour différentes souches de cellules de Catharanthus roseus. La concentration minimale critique requise à la croissance (respiration à l'assimilation des sucres) est de 10% de la saturation en présence d'air; soit 10^{-6} kg O_2/L (21).

Selon le bioréacteur utilisé un débit d'air trop important peut causer l'épuisement de certains gaz essentiels à la croissance des cellules, tel le CO_2, dissous dans les cellules et/ou dans le milieu de croissance (11,22,23).

Certains auteurs suggèrent un coefficient de transfert d'oxygène de 5,3 à 12,1 h^{-1} (24) alors que d'autres proposent des valeurs variant entre 10 et 50 h^{-1} afin que le transfert d'oxygène dans le milieu liquide soit suffisant par rapport à la demande biologique (4,6). En fait, la valeur de $k_L a$ nécessaire dépend de la quantité de cellules présentes, valeur qui augmente avec la croissance selon l'équation suivante :

$$\frac{dCo_2}{dt} = k_L a \left(Co_2^* - Co_2 \right) - Qo_2 x \qquad (2)$$

où $k_L a$ est le coefficient de transfert en oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide, Co_2^* est la concentration de saturation en oxygène dans le fluide et Co_2 la concentrationj en oxygène dissous. Le terme réactionnel Qo_2 représente le taux de consommation en oxygène des cellules et x la concentration cellulaire.

1.3. Bioréacteurs

Plusieurs bioréacteurs furent utilisés pour fin de culture en suspension de cellules de plantes. On dénombre deux grandes classes de bioréacteurs, soit ceux qui sont agités mécaniquement et ceux dont le mélange s'effectue par entraînement gazeux.

1.3.1. Agitation mécanique

1.3.1.1. Aération par bullage

Certains bioréacteurs à petite échelle (<1 L) tels les ballons avec agitation par barreaux magnétiques

ainsi que les flacons agités sur plaque oscillante, ont été largement utilisés (25,26,27,28). Malgré leur handicap évident face à une mise à l'échelle industrielle, ces systèmes simples permettent d'excellents résultats. Pareilleux et Vinas (27) ont opéré un tel système de 3 L (ballon avec agitation par un barreau magnétique) en alimentant et soutirant en continu du médium. Avec une alimentation de 5% sucrose la suspension a atteint une concentration de 26 g M.S./L après 12 jours avec des cellules de C. roseus. Il n'est pourtant aucunement fait mention de problèmes de mousse ou de la qualité de mélange.

Les travaux de Drapeau et al. (12) et de Kato et al. (29) ont démontré qu'il est possible d'utiliser des turbines de type "Rushton". Le taux spécifique de croissance μ obtenu fut de 0,45 j^{-1} à 26°C pour un fermenteur Chemap de 14 L agité entre 80 et 100 rpm. Une concentration de 10,7 g M.S./L fut atteinte pour un contenu initial en sucrose de 1,9% (12).

Pour des concentrations supérieures à 1% M.S. le comportement rhéofluidifiant allié à des viscosités élevées (> 0,1 Pa•s) pose des problèmes importants de

mélange (29,30). A l'aide d'agar granuleux comme système pseudo-cellulaire, Tanaka et al. (3,10,14,31) ont montré la forte dépendance du coefficient de transfert de l'oxygène $k_L a$ par rapport à la concentration cellulaire. Le $k_L a$ chute de 40 à moins de 20 h^{-1} pour une augmentation du contenu en agar de 1.1% à 2.2% M.S..

Aussi, les travaux déjà cités de Drapeau et al. (12) insistent sur l'apparition de zones mortes à la fin de la période de croissance exponentielle (>1% M.S.) pour une vitesse d'agitation de 80 à 100 rpm. L'augmentation de la vitesse d'agitation jusqu'à 175 rpm fit disparaître ces zones mortes.

Ulbrich et al. (32) ont utilisé un bioréacteur avec un agitateur à spirale pour la culture en suspension de cellules de Coleus blumei. Il s'agissait d'un agitateur à ruban hélicoïdal simple dont la géométrie n'est pas citée. Opérant entre 50 et 100 rpm, une concentration cellulaire de 25,7 g M.S./L a été obtenue pour une alimentation en sucrose de 5%. Ces résultats sont parmi les plus performants cités dans la littérature en terme de densité cellulaire obtenue.

Mais avec une aération par bullage les auteurs ne parlent pas de présence ni d'absence de mousse.

Plusieurs chercheurs, dont Fowler (33), notent que lorsque la suspension est aérée directement par bullage, le milieu de culture a tendance à former de la mousse. Dans des travaux complémentaires ce même auteur rapporte que l'utilisation d'agents anti-mousse a résulté en une augmentation de la phase de latence et une diminution du taux de croissance pour des cultures de cellules de C. roseus (6). La mousse a enfin tendance à séparer par flottation les cellules du milieu de culture.

1.3.1.2. Aération par la surface libre

Pour les bioréacteurs oxygénés par bullage munis d'un agitateur formé de deux bandes rectangulaires verticales, Chapman et al. (34) ont déterminé que la contribution de l'aération de surface représente 20% (au maximum) de l'oxygénation totale pour une vitesse d'agitation d'environ 360 rpm.

Un bioréacteur de type cylindre rotatif aéré

uniquement par la surface libre a permis d'atteindre une concentration en cellules de Vinca rosea de 20 g M.S./L (35). L'aération de surface a été améliorée par l'ajout de chicanes sur les parois du cylindre. La présence de 8 chicanes au lieu d'une seule a permis de multiplier par trois le coefficient de transfert d'oxygène (d'environ 19 à 55 h^{-1} à 30 rpm) sans toutefois favoriser la formation de mousse. La hauteur des chicanes a varié de 0.72 à 2.16×10^{-2} m. La géométrie des trois cylindres utilisés consistait en des ratios diamètre/longueur de 0.49, 0.72 et de 0.94. Des bioréacteurs de volumes utiles de 0.360 à 1.0 L ont servi à l'étude. L'aération fut de 1 à 3 volume de gaz/volume de liquide/min (vvm) ce qui correspond à plus de 10 fois les taux d'alimentation pour les autres types de bioréacteurs. Une extrapolation vers de plus grands volumes est problématique compte tenu du faible pourcentage du volume total occupé par la suspension cellulaire.

1.3.1.3. Aération par membrane

Le silicone ayant comme propriété d'être perméable à l'oxygène gazeux, l'incorporation de tubes composés

de ce matériau semble intéressant afin d'alimenter en oxygène une suspension cellulaire. Certains compagnies (Braun et Diessel) ont déjà exploité cette idée pour la culture de cellules animales et des chercheurs ont utilisé un bioréacteur similaire comprenant un long tube de silicone alimenté en oxygène (30). Une matrice où est enroulé le tube tourne et agit comme agitateur. Une suspension de cellules de Thalictrum rugosum de 50 g M.S./L par des ajouts périodiques de glucose (1.5% massique initial) a été atteint sans production de mousse. Le même type d'aération a été étudié pour la culture de cellules mammifères (36). Une étude de Su et al. (37) a porté sur le transfert d'oxygène au moyen d'enroulements de tubes immobiles de silicone (4.8 m de longueur, $2x10^{-3}$ m de diamètre extérieur et $1.5x10^{-3}$ m de diamètre intérieur) et de polypropylène microporeux (3 m de longueur, $2.6x10^{-3}$ de diamètre extérieur, $1.8x10^{-3}$ m de diamètre intérieur avec des pores de $0.2x10^{-6}$ m et un facteur de vide de 75%). Un agitateur muni de pales inclinées tournant à 200 rpm a été installé au fond du bioréacteur. Un débit gazeux de 0.5 L/min en oxygène pur a dû être alimenté aux tubes pour atteindre les performances d'une aération par bullage avec de l'air: 0.93 et $1.04x10^{-1}$ kg O_2/L/h pour

des tubes de silicone et de polypropylène respectivement contre $0.88x10^{-1}$ kg O_2/L/h en bullage avec de l'air dans de l'eau pour un bioréacteur de 1.2 L de volume utile. Ces taux de transfert sont insuffisants si on considère qu'un taux de consommation de $1.5x10^{-1}$ kg O_2/L/h peut être estimé pour une concentration cellulaire de 10 g/L (4). De plus les auteurs indiquent qu'une pression supérieure à $13x10^{-3}$ bar dans les tubes entraîne la formation de bulles ce qui peut aider à la formation de mousse. Cependant, une mise à l'échelle industrielle semble problématique en raison de l'insuffisance des taux de transfert et de la fragilité de ces tubes pour des systèmes plus volumineux.

1.3.2. Agitation par entraînement gazeux

Dans la gamme assez étendue de designs présentés dans la littérature, plusieurs chercheurs prévilégient les bioréacteurs gazo-siphon pour leur faible niveau de cisaillement imposé et une aération efficace. Il y a deux types de bioréacteurs concernés: soit les colonnes à bulles et les gazo-siphons. Dans les deux cas, de bons rendements ont été observés pour la culture en

suspension de C. roseus.

Pour la colonne à bulle, des taux de croissance de 0,38 (7) à 0,41 j^{-1} (38) ont été obtenus pour des cellules de C. roseus avec une concentration maximale atteinte de 14,3 g M.S./L pour 2% sucrose initialement. Pour le bioréacteur de type gazo-siphon, des taux de croissance de 0,27 (39) à 0,42 j^{-1} (11) sont cités. Wagner et Vogelmann (15) ont atteint un poids sec de 28 g/L pour une suspension de C. roseus en airlift de 10 L à 28°C et un taux d'aération de 0.33 vvm. Avec Morinda citrifolia un volume cellulaire décanté total d'environ 98% de la suspension fut atteint pour un poids sec de 15 g/L. Plusieurs auteurs parlent de mélange imparfait pour de fortes concentrations cellulaires (> 15 à 20 g M.S./L); i.e. avec un caractère rhéofluidifiant important (15,31,40, 41), des zones mortes furent détectées en fin de culture (15). Une aération directe de la suspension peut causer de la mousse et dégazer la suspension en CO_2.

1.4 Systèmes pseudo-cellulaires

Quelques auteurs semblent porter un intérêt pour

l'utilisation de systèmes pseudo-cellulaires lors de l'étude du comportement d'un réacteur. Tanaka et al. (3,10,35) ont utilisé des granules d'agar en suspension dans l'eau comme suspensions modèle de cellules de plantes. Ils ont validé cette suspension modèle en démontrant sa similarité rhéologique et morphologique avec les suspensions de plusieurs lignées de cellules de plantes dont Nicotiana tabacum et Catharanthus roseus. Ces études comparatives ont été effectuées par classe de taille d'agrégats (cellulaires et pseudo-cellulaires) ainsi que globalement avec une distribution de tailles généralement rencontrée pour des suspensions de cellules de plantes. La préparation recommandée de l'agar granuleux mène à des granules de densité et de contenu en eau semblables aux agrégats de cellules, soit respectivement 1,023 kg/L et 94% d'eau comparativement à 1,002 à 1,005 kg/L et de 94 à 96% d'eau.

L'utilisation de ce système pseudo-cellulaire a permis d'évaluer les performances de certaines configurations de bioréacteurs tels les gazo-siphon, des bioréacteurs agités mécaniquement et aérés par bullage ainsi que des cylindres rotatifs horizontaux en

regard du transfert de masse de l'oxygène.

Thomas et Jones (41) ont caractérisé l'hydrodynamique d'un réacteur à vortex annulaire pour fins de culture de cellules de plantes à l'aide d'une solution de 2% C.M.C. (carboxy-méthyl-cellulose) ainsi que du glycérol. Le choix du C.M.C. à titre de solution modèle a été fait en raison de son comportement rhéofluidifiant et non selon un comportement rhéologique similaire aux suspensions de cellules de plantes. Aucun résultat en ce sens n'est cependant présenté.

1.5. Configuration de réacteurs pour fluides visqueux et rhéofluidisants

Les systèmes conventionnels offerts par l'industrie biotechnologique, tels les agitateurs de type hélice "marine" ou de type "Rushton", sont efficaces pour l'agitation de solutions au comportement newtonien. Toutefois, pour des solutions ou suspensions fortement non-newtoniennes, visqueuses et présentant une haute sensibilité au cisaillement, ces systèmes s'avèrent déficients (15,42,43).

Dressant l'inventaire des agitateurs réputés efficaces pour le mixage de fluides visqueux, on retrouve principalement trois configurations: soit les agitateurs en forme d'ancre, de vis d'Archimède et de rubans hélicoïdaux.

Des travaux menés sur des fluides visqueux et rhéofluidifiants indiquent non seulement la supériorité des agitateurs à rubans hélicoïdaux sur les autres types d'agitateurs, mais aussi, démontrent leur efficacité à maintenir des conditions d'homogénéité. Moo-Young et al. (42), Johnson (43) ainsi que Coyle et al. (44) ont conclu que l'utilisation d'un agitateur formé de rubans hélicoïdaux mène à des temps de mélange inférieurs comparativement aux agitateurs conventionnels.

Coyle et al. (44) dressent un tableau comparatif entre les agitateurs à rubans hélicoïdaux et les agitateurs axiaux (type Rushton). Pour des fluides newtoniens et non-newtoniens de viscosité entre 10 et 50 Pa•s soumis à un taux de cisaillement de 5 s^{-1}, le nombre de rotations requises afin d'atteindre un degré d'homogénéité similaire est au moins six fois moindre

avec un agitateur hélicoïdal comparativement aux autres types d'agitateurs. Ceci permet l'utilisation de vitesses inférieures et donc d'imposer un taux de cisaillement moindre considérant un ratio constant entre le taux de cisaillement et la vitesse d'agitation (45). Selon la configuration de l'agitateur dans le réacteur, Carreau et al. (46) ont mis en évidence l'effet de pompage des rubans. Le fluide a donc tendance à recirculer comme dans un réacteur de type gazo-siphon muni d'un tube à recirculation (43,47).

Plusieurs configurations d'agitateurs à rubans hélicoïdaux ont été comparés quant aux valeurs des temps de mélange par Takahashi (48) ainsi que Yap (47) pour plusieurs fluides dont des solutions d'hydroxyethyl cellulose (H.E.C.) pour les premiers auteurs et du glycérol (newtonien) ainsi que des solutions de carboxy-méthyl-cellulose (C.M.C.) et de séparan (toutes non-newtoniennes) pour le deuxième auteur. Les configurations ayant mené aux temps de mélange les plus bas pour l'ensemble des fluides possédaient les caractéristiques illustrées au tableau 1.

	Yap (47)	Takahashi (48)
Nombre de rubans =	2	2
	D/d = 1,11	1,10
	l/d = 4,12	----
	w/d = 0,195	0,100
	P/d = 0,707	0,621
	h/D = 1	1

Tableau 1: Caractéristiques de deux agitateurs à rubans hélicoïdaux

La configuration proposée par Yap comme la plus performante se distingue essentiellement par des rubans beaucoup plus larges. Une rotation favorisant un pompage vers le haut aux rubans (rotation horaire) a mené à des temps de mélange inférieurs comparativement à un pompage favorisé vers le bas (rotation anti-horaire) (47). Malgré un mélange global plus rapide, des zones stagnantes ou mortes sont apparues pour une rotation horaire.

CHAPITRE 2

METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

2.1. Etude modèle

2.1.1. Montage expérimental du bioréacteur modèle

Le bioréacteur modèle a consisté en une cuve en plexiglass de 0.229 m de diamètre intérieur. L'agitation était assurée par un agitateur à ruban hélicoidal double en acier inoxidable. Un couple-mètre installé entre le moteur (DC, 1/2 hP) et l'agitateur a permis de suivre en continu le couple appliqué. Le montage expérimental est présenté à la figure 1.

2.1.2. Préparation de l'agar granuleux

L'agar granuleux est préparé en gélifiant une solution aqueuse d'agar (5,8%) par une chauffe à 121^{0}C à l'autoclave puis en refroidissant à la température de la pièce (24^{0}C). Le gel est par la suite homogénéisé en fines particules qui sont tamisées pour ne conserver que celles de diamètres situés entre 20 et 417 μm.

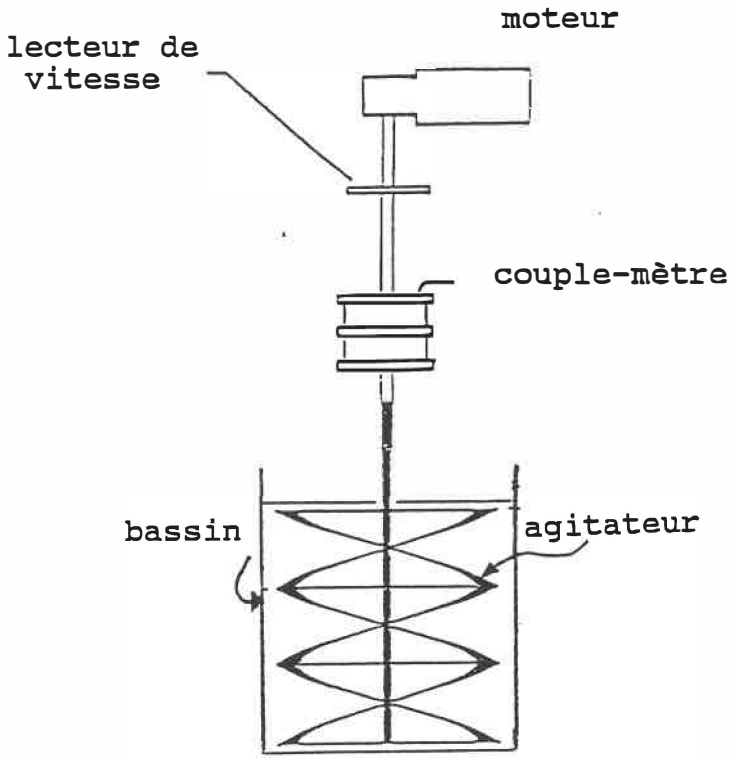


Figure 1 : Montage expérimental du réacteur modèle

Cette procédure a été tirée de travaux de H. Tanaka (3).

2.1.3. Mesure de l'homogénéité axiale

Après exposition de la suspension d'agar granuleux à une vitesse donnée pour plus de 15 min, des échantillons ont été prélevés dans le réacteur à l'aide d'un tube de verre à col large plongé dans le fluide immédiatement après arrêt de l'agitation. Le prélèvement s'est effectué par succion pour trois profondeurs; soit à 0.2, 1.0 et 2.0×10^{-1} m du niveau du liquide.

2.1.4. Mesure du temps de mélange

La méthode de coloration/décoloration fut utilisée (46). Elle consiste en la coloration par une solution 2N d'iode en présence d'amidon puis la décoloration est opérée à l'aide d'une solution 1N de thiosulfate de sodium (le mode de préparation des solutions colorantes et décolorantes sont présentées en annexe A). Le processus de décoloration dont la cinétique est très rapide par rapport au mélange est observé visuellement.

Le temps de mélange total correspond au temps requis pour atteindre une décoloration complète du fluide. Deux périodes de vitesses de décoloration différentes ont été observées. Suite à l'injection du décolorant à la surface du fluide près de la paroi, le temps requis pour l'homogénéisation d'une première région fut noté t_{m1}, puis le temps pour l'homogénéisation de la deuxième région dont le mélange s'effectue plus lentement a été noté t_{m2}. Le temps total de décoloration (mélange) correspond à la somme des temps pour les deux régions: $t_{m1}+t_{m2}$.

2.1.5. Mesure du couple à l'agitateur

Le couple-mètre utilisé est le même que celui qu'avait utilisé Yap (47). Le principe de fonctionnement de cet appareil est basé sur le phénomène de stress magnétique anysotropique. Monté directement entre l'arbre de l'agitateur et le moteur (figure 1) la lecture (en % d'échelle) représente le couple attribuable au fluide. La courbe de calibration est présentée à la figure 2.

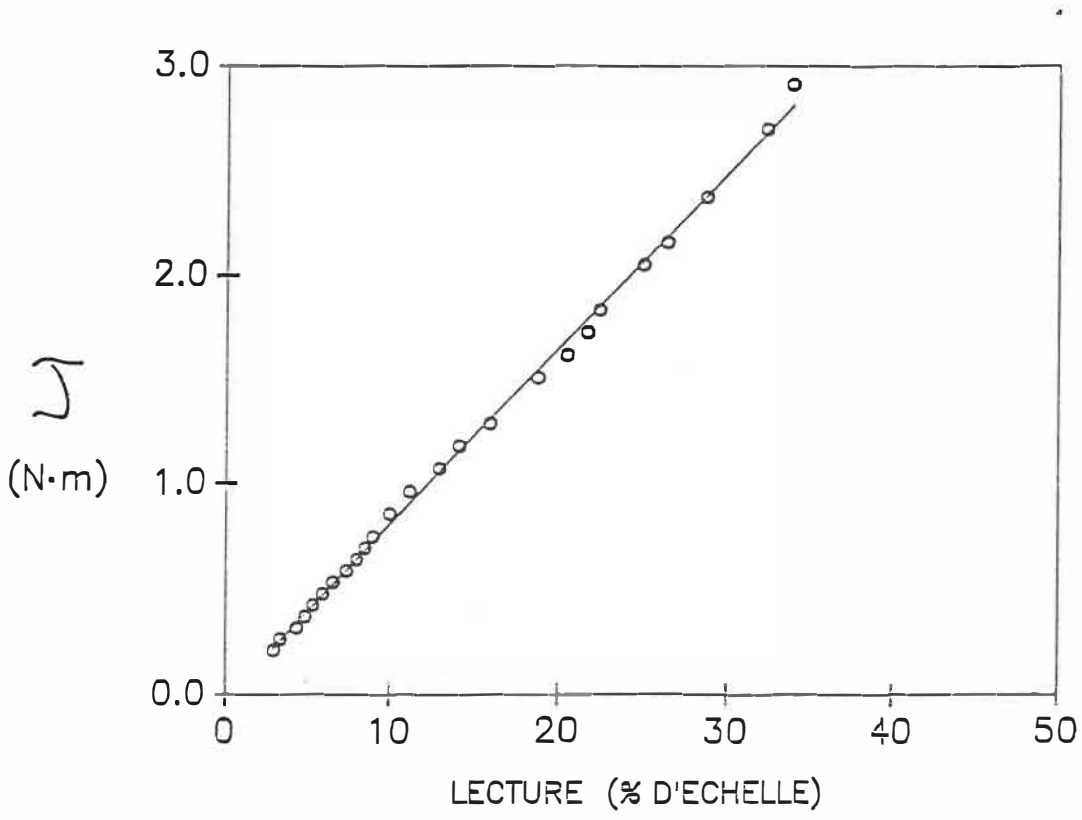


Figure 2 : Courbe de calibration du couple-mètre

2.1.6. Mesure de la concentration en oxygène dissous

Une sonde à oxygène de la firme YSI fut utilisée. Placée au fond du réacteur (à l'envers), la sonde fut positionnée près des zones de mélange lent sans gêner l'écoulement du fluide.

La calibration du 0% en oxygène a été obtenue par bullage d'azote dans le réacteur et la saturation par aération de surface dans les conditions des expériences (température de 28^0C et vitesse d'agitation donnée).

Le temps de réponse de cette sonde (t_e) (correspondant à 63.2% de la réponse finale) a été de 8 s (voir Annexe B).

2.1.7. Evaluation du coefficient de transfert d'oxygène: $k_L \cdot a$

Le coefficient de transfert d'oxygène est un paramètre très important lors de la conception d'un bioréacteur. Il permet en fait de déterminer si le design allié aux conditions d'opération entraînent une capacité de transfert d'oxygène suffisante.

Un bilan sur l'oxygène en présence de cellules prend la forme suivante:

$$\frac{dC_{O2}}{dt} = k_L a \, (C_{O2}^{*} - C_{O2}) - Q_{O2} \cdot x \qquad (2)$$

Pour le bioréacteur modèle des suspensions d'agar granuleux ont été utilisées comme système pseudo-cellulaire. Le bilan sur l'oxygène devient:

$$\frac{dC_{O2}}{dt} = k_L a \, (C_{O2}^{*} - C_{O2}) \qquad (3)$$

qui une fois intégré prend la forme d'une équation linéaire d'ordre 1 dont la pente correspond au coefficient de transfert de masse :

$$-\ln (C_{O2}^{*} - C_{O2}) = k_L a \cdot t + \text{constante} \qquad (4)$$

La dynamique des sondes utilisées peut intervenir sur la valeur du $k_L a$ en limitant le taux de transfert de l'oxygène au-travers de la membrane des sondes. Selon Moser (49) un coefficient de transfert caractéristique de la sonde peut être calculé à partir du temps de réponse.

$$k_e = 0.49/t_e \qquad (5)$$

Cette valeur sert de critère, à savoir la valeur sous laquelle la dynamique de la sonde n'influence pas significativement la mesure de la dynamique du processus d'oxygénation. Pour la sonde YSI un k_e de 220 h^{-1} a été calculé et donc aucune correction n'a dû être apportée car toutes les valeurs obtenues expérimentalement y sont inférieures. Il en a été de même pour la sonde Ingold avec un k_e de 103 h^{-1}.

2.2. Cultures

2.2.1. Montage expérimental

Le bioréacteur, de diamètre intérieur de .229 m, un volume utile de 11 L, était muni de trois chicanes de surface et d'un agitateur à ruban hélicoïdal double construits en acier inoxidable 316. Un joint d'étanchéité mécanique refroidi à l'eau (Circo Flex Inc.) fut installé à l'arbre d'agitation qui fut stabilisé par la présence d'un jeu de roulement. L'arbre était entraîné par une poulie reliée à un moteur de 1/2 hp (DC) couplé à un réducteur de vitesse (1:4). Le couvercle (acier inoxidable 316) logeait les ports d'inoculation, d'ajout de médium, d'entrée et de sortie des gaz. Le tube d'alimentation des gaz (acier inoxidable 316) était précédé d'un filtre (pores de $0.2x10^{-6}$ m de diamètre, Millipore Inc.) et pouvait être positionné très près de la surface de liquide. La sortie d'air était suivie d'un condenseur de la vapeur d'eau et d'un filtre. La base du bioréacteur recevait les sondes de pH de de pO_2 ainsi que le port d'échantillonnage. Les sondes étaient installées à 15° de l'horizontale selon les spécifications de la

compagnie Ingold et le port d'échantillonnage était incliné à 45° de l'horizontale afin d'éviter l'accumulation de cellules. Une vanne à bélier fut fabriquée et installée au bas du bioréacteur de manière à ne créer aucune zone morte en position enfoncée. Une pièce en tefflon était vissé au bélier afin de créer l'étanchéité avec le fond de la base du bioréacteur. Le montage expérimental est illustré à la figure 3. L'Annexe C regroupe les plans techniques.

2.2.2. Cellules étudiées: Catharanthus roseus; souche MCR17

Les cellules de Catharanthus roseus sont des cellules de pervenche. La souche MCR17 a été isolée et fournie par l'IRB. La méthode d'isolation et de mise en suspension des cellules de plantes est présentée en Annexe D.

2.2.3. Conditions opératoires

2.2.3.1. Température

Dans la littérature, on situe la température de

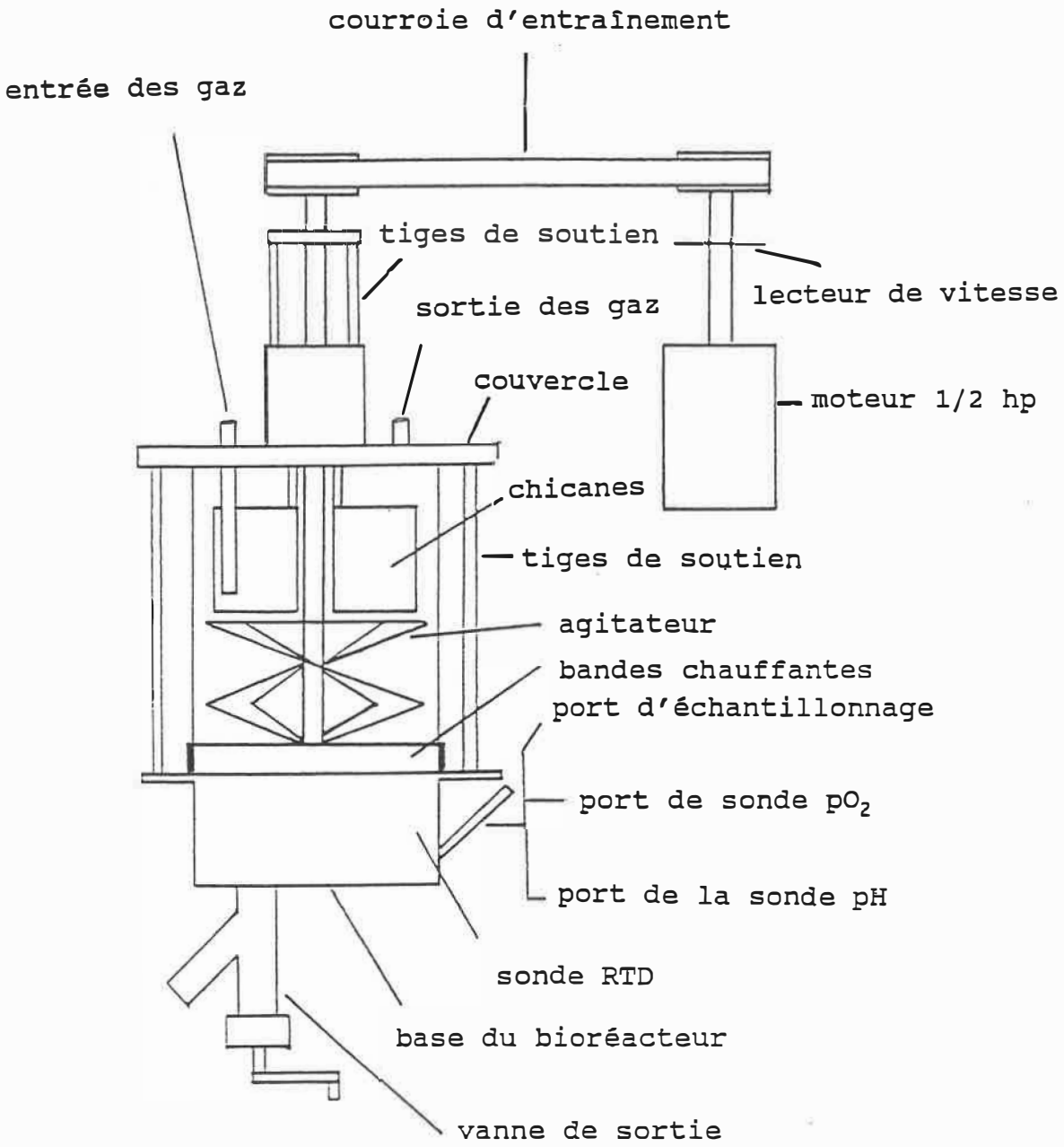


Figure 3 : Montage expérimental du bioréacteur de culture

culture optimale pour des cellules de C. roseus entre 25 et 30°C (21). Les cultures en bioréacteur ont été maintenues à une température de 28,0±0,2°C selon l'expérience acquise avec les cellules de Catharanthus roseus à l'Institut de Recherche en Biotechnologie de Montréal. La chambre d'incubation pour les flacons agités a été également maintenue à 28°C.

2.2.3.2. Agitation

Suite à la caractérisation du bioréacteur modèle, l'agitation imposée fut de sens anti-horaire (pompage vers le haut aux rubans) et de 120 rpm tout au long des cultures 1, 3, 4 et 5. La culture 2 fut démarrée à 120 rpm puis la vitesse a été augmentée à 135 et à 150 rpm. Les flacons agités l'ont été à 150 rpm d'après les observations de Snape et al. (50) considérant cette valeur comme optimale au niveau du transfert d'oxygène.

2.2.3.3. Aération

L'aération de la suspension cellulaire s'est effectuée par la surface libre uniquement. Sauf pour

l'essai 1 (2% sucrose), l'oxygène dissous a été maintenu à l'intérieur de la plage de concentration de 10 à 100% de la saturation par enrichissement en oxygène au moyen des gaz alimentés. L'alimentation en gaz a été maintenue autour de 0,1 vvm (volume de gaz/volume de liquide/min).

2.2.4. Paramètres physiques

2.2.4.1. Mesure de la concentration en oxygène dissous

Une sonde polarographique de la compagnie Ingold munie de membranes (PTFE/silicone) fut installée à 15^0 par rapport à l'horizontale au bas du bioréacteur. Avant l'inoculation de chaque culture, la sonde fut étalonnée de façon à atteindre la saturation en oxygène (recommandée à 95% par la compagnie Ingold) dans les conditions normales d'opération: alimentation en air seulement et une température du médium de 28^0C. La concentration de saturation de l'oxygène dans le milieu B5 est estimé à 95% de la valeur pour de l'eau (37). Le temps de réponse de cette électrode a été évalué à 17 s (Annexe A).

2.2.4.2. Mesure du pH

Placée à 15^0 par rapport à l'horizontale au bas du bioréacteur une électrode de la compagnie Phenix a permis de suivre le pH. Aucun encrassement n'a été observé au démantèlement du bioréacteur. La calibration de la sonde fut effectuée avant la stérilisation du bioréacteur. Aucune déviation n'a été observée lors de la mise en opération.

2.2.4.3. Mesure et régulation de la température

Une sonde de surface de température RTD ("resistance temperature detector"), maintenue sur la partie externe en acier du bioréacteur par de la colle conductrice a permis de mesurer la température à l'intérieur de façon continue. Deux bandes chauffantes installées autour de la paroi en verre du bioréacteur et reliées à un contrôleur de type PID maintenaient la température à $28,0 \pm 0,2^0$ C.

2.2.4.4. Mesures de débits gazeux

Un débit-mètre servait à mesurer le débit de

l'oxygène gazeux ajouté et le débit gazeux total a été mesuré en continu par un "Wet test meter" relié directement à la sortie des gaz du bioréacteur.

2.2.4.5. Evaluation du taux de consommation en oxygène

Les prises de mesures de la concentration en oxygène dissous ont été effectuées en bioréacteur lors des cultures. La procédure suivie se résume ainsi:

1. Baisse progressive (sur 30 s) de la vitesse d'agitation jusqu'à 60 rpm afin de minimiser l'influence de la surface libre tout en maintenant les cellules en suspension;

   . immédiatement après la réduction de la vitesse, on coupe l'alimentation en air;

2. mesure à intervalle régulier de la concentration en oxygène dissous

3. lorsque le niveau d'oxygène dissous atteint une concentration de 10% de la saturation, la vitesse d'agitation est progressivement (sur 30 s) ramenée à la valeur initiale et l'air est réalimenté.

Le taux de consommation en oxygène est déterminé par le rapport de la pente maximale (initiale) de la courbe de l'oxygène en fonction du temps rapportée sur la concentration en cellules présente au moment de la mesure. Nous avons cherché, par cette méthode, à ne pas influencer le déroulement subséquent de la culture.

2.2.5. Composition et préparation du milieu de croissance

Le milieu de culture utilisé est le 1B5, un milieu généralement employé pour la culture de cellules de Catharanthus roseus (9). La composition de ce milieu de croissance est présentée en Annexe E.

2.2.6. Préparation de l'inoculum

Avec un milieu 1B5 contenant 2% de sucrose

initialement, des flacons Erlenmeyer de 500 mL ont été inoculés à 10% volumique avec des suspensions en fin de phase exponentielle (6 à 7 jours, ≈1% M.S.). Les flacons ont par la suite été incubés à 28^{0}C sur une plaque à oscillations circulaires (150 rpm) pour la même période de 6 à 7 jours.

2.2.7. Stérilisation

2.2.7.1. Le milieu de croissance

Le milieu de culture en bioréacteur fut stérilisé par filtration (Millipak 20, compagnie Millipore de porosité de 0,22 μm de diamètre) alors que le milieu utilisé pour le maintient des souches ainsi que pour les inocula a été stérilisé à l'autoclave (121^{0}C et 150 kPa durant 30 min.).

2.2.7.2. Les équipements

Le bioréacteur ainsi que les périphériques (bidon de stockage de milieu stérile, condenseur, sondes à oxygène et à pH) ont été stérilisés d'un seul coup dans un autoclave de capacité suffisante à 121^{0}C pendant 90

minutes sous 150 kPa.

2.2.8. Procédures analytiques

2.2.8.1. Mesure du volume cellulaire décantable

De masse volumique supérieure à celle de l'eau, les cellules de plantes ont tendence à décanter. On définit le volume cellulaire décantable comme étant le volume apparent occupé par un lit de cellules décantées par gravité. Des échantillons de 10 mL de suspensions ont été versés dans des cylindres gradués de 10 mL de volume. Après 15 min, aucune évolution du volume décanté n'a pu être observée.

2.2.8.2. Mesure du poids humide

Un volume de 35 mL de suspension prélevé fut filtré (pores de 2,5 μm de diamètre; compagnie Watman). Le poids humide fut déterminé par pesée de la matière retenue (préalablement lavée rapidement à l'eau distillée) rapportée sur le volume d'échantillon de la suspension.

2.2.8.3. Mesure du poids sec

La mesure du poids sec a été obtenu en pesant le résidu obtenu lors de la mesure du poids humide séché à 70^0C durant 24 h. Ce poids est rapporté au volume d'échantillon de suspension prélevé.

2.2.8.4. Mesure de la concentration en orthophophate

La méthode colorimétrique utilisée consiste en une oxydation à l'acide ascorbique (51).

Pour un volume total de 5 mL comblé à l'eau déminéralisée, 200 μL d'échantillon filtré sont ajoutés à 800 μL d'une solution de réactifs combinés. Cette solution se compose comme suit:

50 mL	5 N H_2SO_4
5 mL	solution de tartrate
15 mL	molybdate d'ammonium
30 mL	solution 0,01 M d'acide ascorbique

Après une période réactionnelle de 10 à 30 min à

24^{0}C, l'absorbance de l'échantillon est lu au spectrophotomètre à 880 nm.

2.2.8.5. Mesure de la concentration en nitrates

Cette mesure est effectuée à l'aide d'une sonde à nitrates (compagnie Orion). La procédure consiste à ajouter 80 μL d'une solution d'ISA ("ionic strength ajuster") à 4 mL d'échantillon. La lecture est prise directement en millivolts.

2.2.8.6. Mesure de la concentration en azote ammoniacal

L'azote ammoniacal fut quantifié par colorimétrie (52).

Incubé à 37^{0}C pour 30 min, une solution composée de 20 μL d'échantillon filtré mélangé à 2,5 mL d'une solution A et à 2,5 mL d'une solution B est déposée dans un spectrophotomètre et la lecture est prise à 630 nm.

Les réactifs A et B sont préparés comme suit:

A: .10 g de phénol (toxique)
.50 mg de sodium nitroferricyanique dihydrate
.compléter à 1 L avec de l'eau déminéralisée
.conserver à 4°C.

B: .peser 0,5 g de NaOH
.ajouter 0,8 mL de NaCl
.compléter à 100 mL avec de l'eau déminéralisée.

La concentration des solutions standards varie de 0,25 à 5,5 mM en NH_4 par mélange de $(NH_4)_2SO_4$ dans l'eau.

2.2.8.7. Concentration en hydrates de carbone

La quantification des hydrates de carbone, soit le sucrose, le glucose et le fructose, s'est effectuée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Le système utilisé consistait en un détecteur de type réfractomètre différentiel (Waters model 410)

et une colonne HPX-87C (compagnie Bio-rad) maintenue à 80^0C. La phase mobile était de l'eau déionisée dont le débit était fixé à 1 mL/min.

2.3. Mesure de la vitesse d'agitation

Une plaque circulaire perforée de 24 trous fixée à l'arbre du moteur a permis de mesurer la vitesse d'agitation par le couplage d'une source lumineuse et d'une cellule photoélectrique situées de part et d'autre de la plaque. La mesure s'est faite directement par un compte d'impulsions.

2.4. Mesure de la viscosité des suspensions

Les mesures de la viscosité des suspensions pseudo-cellulaires d'agar granuleux et de cellules de plantes ont été prises à l'aide d'un ruban hélicoïdal simple raccordé à un viscosimètre Brookfield (Synchro-Lectic). Le volume nécessaire d'échantillon a été de 25 mL. La viscosité a été évaluée directement des lectures de l'appareil (en % d'échelle) suite à l'étalonnage ainsi que la caractérisation de l'agitateur hélicoïdal (Annexe F) selon l'expression:

$$\eta_a = 4.68 \times 10^{-4} \cdot (L/N')^{1.01} \qquad (F8)$$

obtenue par des mesures sur des huiles newtoniennes où η_a est la viscosité apparente en Pa•s, L est la lecture au rhéomètre Brookfield en % d'échelle et N' est la vitesse d'agitation en rotations par seconde. Le facteur de proportionnalité entre le taux de cisaillement (en s^{-1}) et la vitesse d'agitation (en rotations/s) a été déterminé à l'aide de mesures de viscosité comparatives à un rhéomètre Bohlin (cylindres coaxiaux) ainsi qu'à un rhéomètre Brookfield munis d'un ruban hélicoïdal de solutions aqueuses de xanthane (0.1%, 0.2%, 0.3% et 0.35 %). Une valeur unique de 33 a été déterminée.

CHAPITRE 3

SELECTION ET CARACTERISATION D'UNE SUSPENSION PSEUDO-CELLULAIRE

3.1. Suspension modèle

L'emploi d'une solution modèle est essentielle pour la conception de bioréacteurs. Tant dans l'industrie chimique que biotechnologique, la manipulation de certains fluides requiert des conditions expérimentales spécifiques et contraignantes (environnement aseptique pour les procédés biologiques). L'utilisation de solutions modèles s'impose donc souvent lors d'études préliminaires. Le choix de ces solutions est orienté par leur similarité de comportement avec les suspensions réelles (transfert de masse et rhéologie).

L'agar granuleux tel que décrit par Tanaka (3,10,14) a été choisi à titre de suspension modèle pour cette étude. Ce choix a été établi en raison de la similarité de comportement hydrodynamique et rhéologique entre ce système et les suspensions de cellules de plantes présentée par Tanaka. Ce système

pseudo-cellulaire demande une préparation simple, offre une résistance au cisaillement et, de plus, la suspension d'agar granuleux s'apparente aux suspensions de cellules de plantes car elle baigne dans la même phase liquide: l'eau.

3.2. RESULTATS

3.2.1. Morphologie

Les granules d'agar en suspension dans l'eau prennent un aspect opaque. A forte concentration (≈2,5% M.S.) la suspension ressemble à de la compotte de pomme. Elle donne l'impression d'être une pâte dont l'eau sert d'agent de cohésion entre les particules.

Avec un contenu en agar de 5,8% le gel d'agar préparé s'apparente aux cellules de plantes (≈95% d'eau) (3). La plage de diamètre moyen obtenue après filtration a été comprise entre 5 et 400 μm (figure 4) comparativement à de 20 à 150 μm (18) à 2000 μm (6). Des observations au microscope ont révélées que les cellules de Catharanthus roseus en cellules uniques ou en agrégats diffèrent des granules d'agar par des

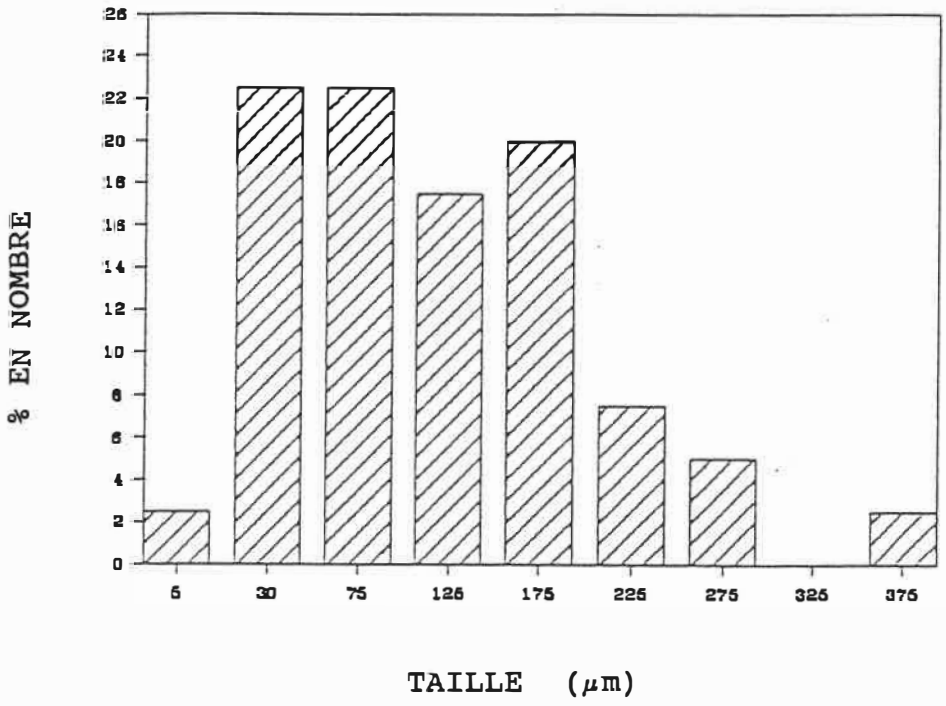


Figure 4 : Distribution de tailles des granules d'agar

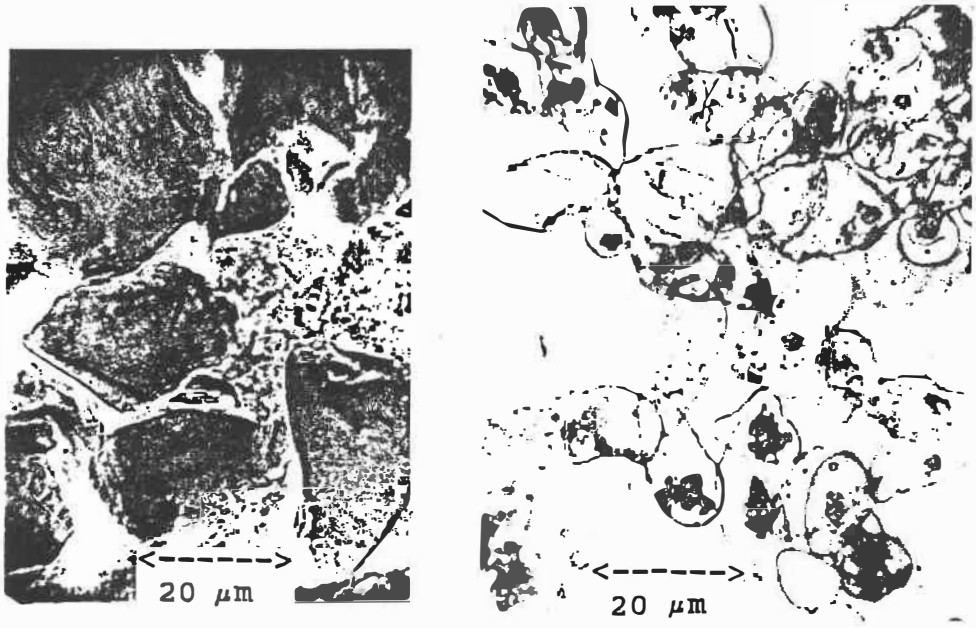
contours plus courbes (voir la figure 5).

3.2.2. Volume humide décantable

Le temps nécessaire afin d'atteindre un volume décanté stable fut légèrement supérieur pour les particules d'agar comparativement aux suspensions de C. roseus (environ 20 minutes contre environ 15 minutes). Les résultats présentés à la figure 6 confirment la limite du contenu en cellules calculée à environ 3% M.S. et l'agar converge aussi vers cette valeur.

3.2.3. Comportement rhéologique

D'un point de vue rhéologique, le comportement de l'agar granuleux et celui des cellules végétales en suspension est similaire tel qu'illustré à la figure 7 pour un taux de cisaillement de 33 s^{-1}. A la figure 8 on peut observer que le comportement rhéofluidifiant de la suspension pseudo-cellulaire s'accentue avec l'augmentation de la concentration en granules d'agar.



granules d'agar cellules de C. roseus

Figure 5 : Photos au microscope de granules d'agar et de cellules de plantes

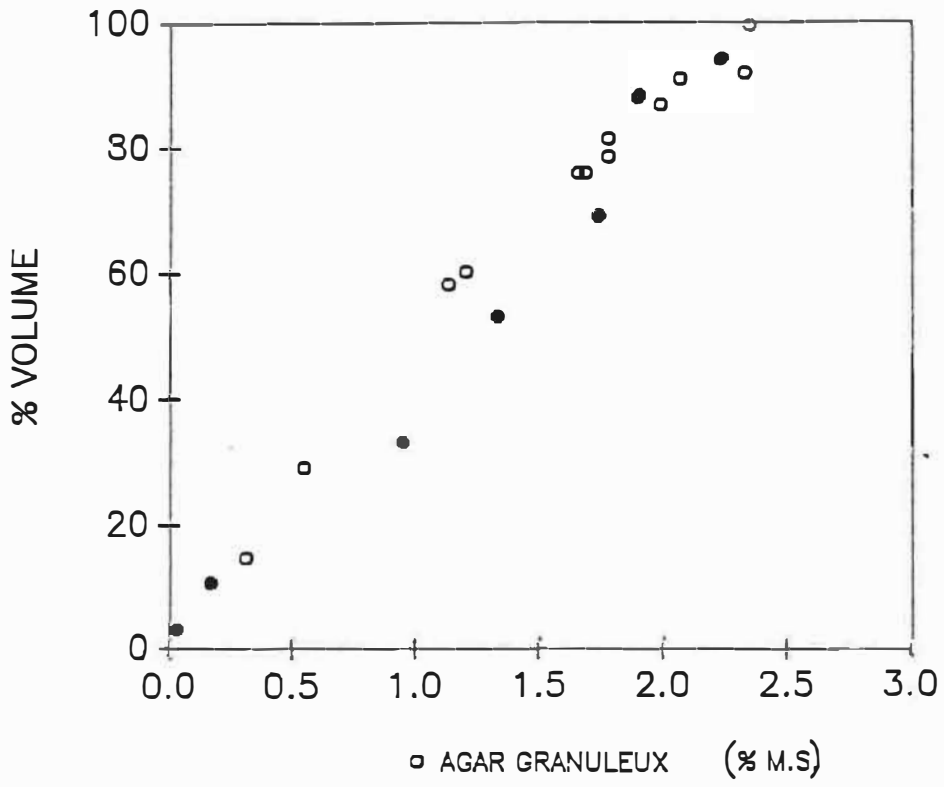


Figure 6 : Volume décantable de l'agar granuleux et des cellules de plantes

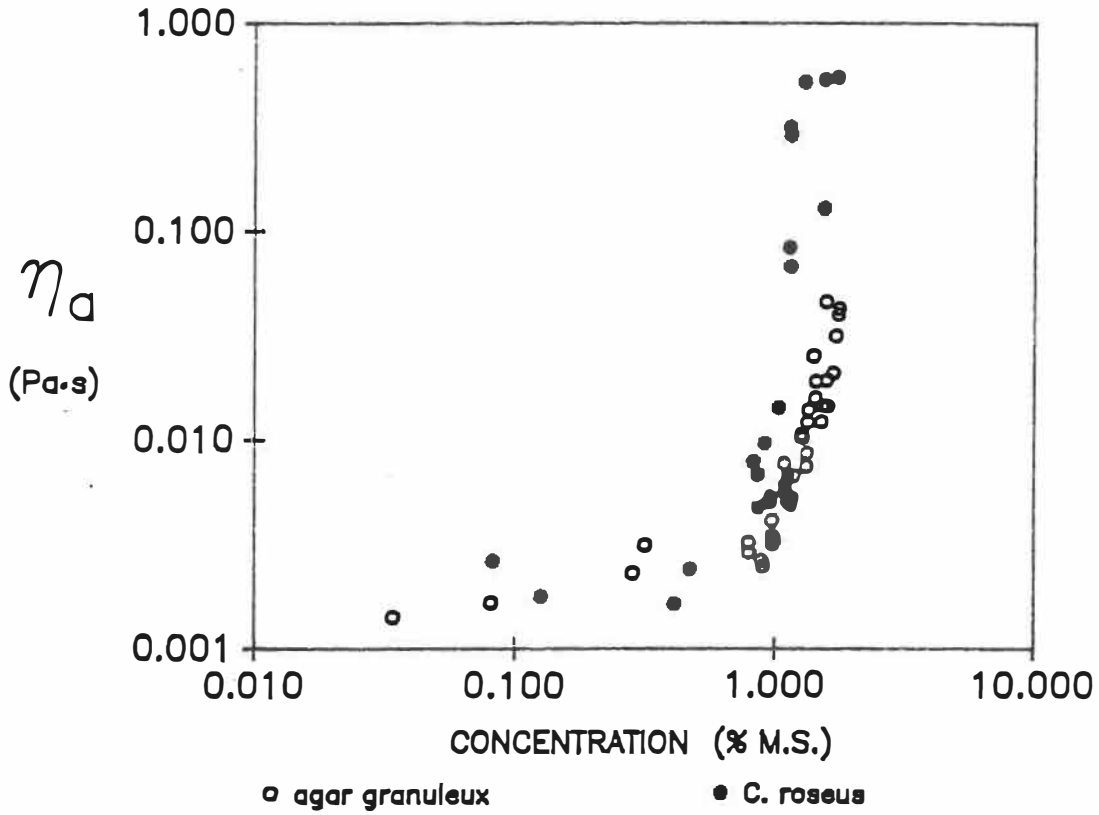


Figure 7 : Courbe comparative de viscosité pour $\dot{\gamma}=33\,s^{-1}$

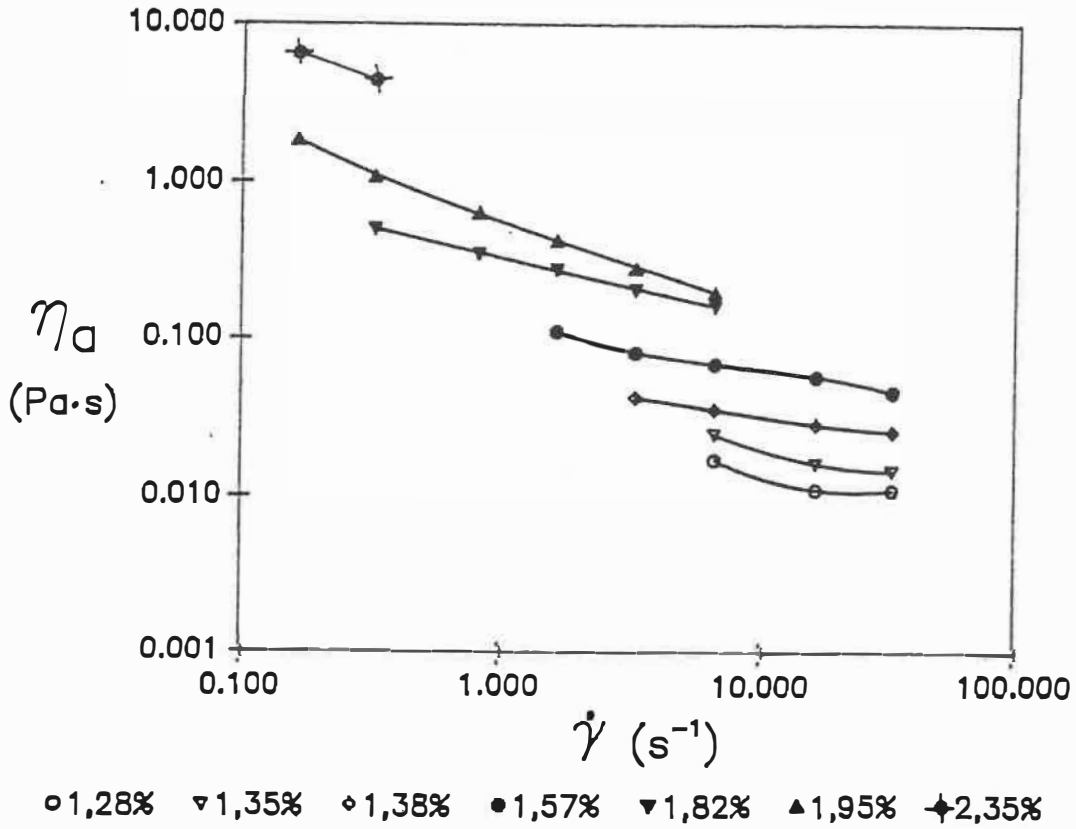


Figure 8 : Courbes de viscosité de suspensions d'agar granuleux

3.3. DISCUSSION

Tel que l'avait démontré Hideo Tanaka (3), l'agar granuleux en suspension dans l'eau se révèle être un système représentatif valable des solutions de cellules de plantes telles C. roseus. La comparaison des données rhéologiques obtenues ainsi que des résultats de décantation, laisse donc prévoir une étroite similarité de comportement hydrodynamique entre ces suspensions.

Du côté du transfert de masse, bien que le milieu liquide de culture contienne des sucres ainsi que certains sels, nous supposons des comportements similaires.

Une limite importante de l'agar granuleux consiste en sa résistance au cisaillement. Il ne donne aucun estimé de la sensibilité au cisaillement.

Le système étudié est donc considéré comme menant à des résultats représentatifs de suspension de cellules de C. roseus mais des essais de cultures sont nécessaires afin de vérifier si les conditions

hydrodynamiques et de transfert de masse satisfaisantes n'entraînent pas un niveau de stress critique pour les cellules.

Ces résultats, en accord avec ceux présentés par Tanaka (3), montrent que le caractère rhéofluidifiant de la suspension pseudo-cellulaire est fonction du contenu en pseudo-cellules.

CHAPITRE 4

CONCEPTION ET CARACTERISATION DU BIOREACTEUR MODELE

4.1. Utilisation d'un agitateur à double ruban hélicoïdal

Le choix d'une agitation mécanique a été établi en raison des problèmes déjà cités pour une agitation par bullage: mauvaise qualité de mélange observée pour de hautes concentrations cellulaires avec C. roseus (>10 g M.S./L).

Avec un fluide ayant un comportement rhéofluidifiant on ne peut baser le mélange sur l'entraînement du fluide par le fluide. Comme la viscosité chute avec le cisaillement, l'énergie fournie au fluide par les pales d'un agitateur se trouve à s'amortir dans le fluide. Il faut donc forcer le plus grand volume de liquide à être mû par contact avec l'agitateur. La surface de contact entre les pales de l'agitateur et le fluide doit donc être grande. Pour ces considérations notre choix s'est arrêté sur la configuration munie de rubans larges présentée par Yap (47).

4.2. Choix d'une aération par la surface libre

Le faible taux de consommation d'oxygène des cellules végétales rend ce type d'aération possible. Une aération de surface permet de contourner l'apparition de mousse et des problèmes qui y sont reliés: diminution du taux de transfert d'oxygène et entraînement des cellules hors du médium liquide. Aussi, une aération par bullage pourrait agir négativement sur l'hydrodynamique d'un réacteur muni de rubans hélicoïdaux (nuire à l'effet de pompage).

4.3. Paramètres de conception

Les contraintes de design sont multiples. Devant servir d'inoculum, les cellules doivent être viables et leur capacité de production d'alcaloïdes ne doit pas être altérée tout au long de leur croissance.

Compte tenu des caractéristiques des cellules de plantes les contraintes de design ont consisté en:

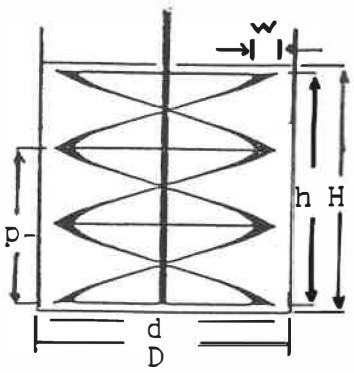
. cisaillement minimal appliqué
. maintien de l'homogénéité de la suspension

- système stérilisable
- maintient fiable de la stérilité
- aération minimisant la production de mousse
- un minimum d'organes internes
- un contrôle efficace de la température
- positionnement des sondes de manière à obtenir un suivi représentatif des cultures
- un volume minimal de suspension de 10 L
- transfert facile de la suspension de ce réacteur au réacteur principal du procédé

4.4. Développement du bioréacteur modèle et résultats

4.4.1. Présentation des configurations de base et améliorations de conception

La configuration de base consistait en un bioréacteur à fond plat équipé d'un ruban hélicoïdal double:



d=0,209 m

h=0,216 m

p=0,143 m

w=0,040 m

D=0,229 m

Figure 9 : Configuration de base du réacteur modèle

L'agitateur a été construit de façon à permettre un pompage ascendant (au mur) pour une rotation de l'axe en sens anti-horaire et un pompage descendant (au mur) pour une rotation de l'axe en sens horaire.

Avec un ratio H/D de 1, le volume utile de ce réacteur modèle est de 9,38 L. Ce rapport de 1 correspond à ce qui est le plus souvent utilisé et cité dans la littérature à titre de référence. Les dimensions de l'agitateur ont été calculées à partir des ratios géométriques les plus performants cités par Carreau et al. (46). Les travaux de Yap et al. (47,53) rapportant un schéma d'écoulement de type pompage, un design à fond plat a semblé problématique quant à une circulation douce et régulière d'une suspension. Aussi ces chercheurs ainsi que Johnson (43) ont mis en

évidence la présence d'une zone morte de forme conique, pour des solutions visqueuses respectivement de 2% C.M.C. et de quadrol, au bas du réacteur centrée sur l'axe de l'agitateur. Certains auteurs (54) proposent l'utilisation d'un fond profilé afin de faciliter la circulation d'un fluide ou d'une suspension et ainsi améliorer la qualité du mélange. Ces études ont porté sur un agitateur de type Rushton. Le réacteur modèle fut modifié comme suit:

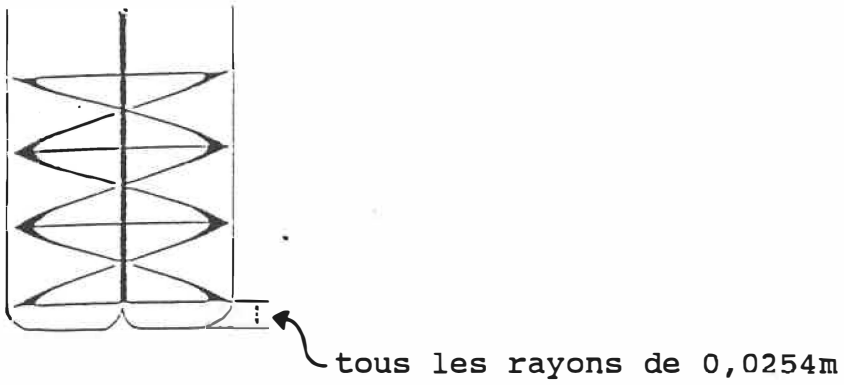


Figure 10 : Réacteur modèle muni d'un fond profilé

Ce type d'agitateur avec des rubans larges et un espacement paroi-rubans faible (d/D > 0.9 (43)) favorise la composante angulaire de la vitesse. Yap (47) a en

effet montré que la composante axiale (V_z) de la vitesse représente moins de 10% de la valeur de la vitesse de l'agitateur (N) et que pour la région $0,167 < z/H < 0,833$ la composante radiale (V_v) est égale à zéro. Bien que pour la zone supérieure du réacteur les composantes axiales et radiales soient non-négligeables, l'effet d'entraînement de la zone médiane ainsi que l'action de la partie supérieure de l'agitateur contribuent à la formation d'un vortex.

Des essais effectués à l'aide de suspensions d'agar granuleux ont permis d'évaluer l'ampleur de la montée du fluide à la paroi. Une vitesse de 60 rpm n'a causé aucun vortex significatif. Pour des vitesses supérieures, la hauteur du liquide est plus importante (à la paroi) pour un pompage vers le haut (rotation anti-horaire) (voir la figure 11). Une augmentation rapide de la viscosité au-delà d'une concentration de 1% M.S. provoque une chute de la montée de liquide au mur. L'effet de pompage à des vitesses supérieures à 90 rpm a permis d'augmenter au-delà de 11,25% la hauteur du liquide pour une concentration de 2,07% M.S. (figure 11). Préconisant une aération par la surface libre uniquement, la présence d'un vortex est

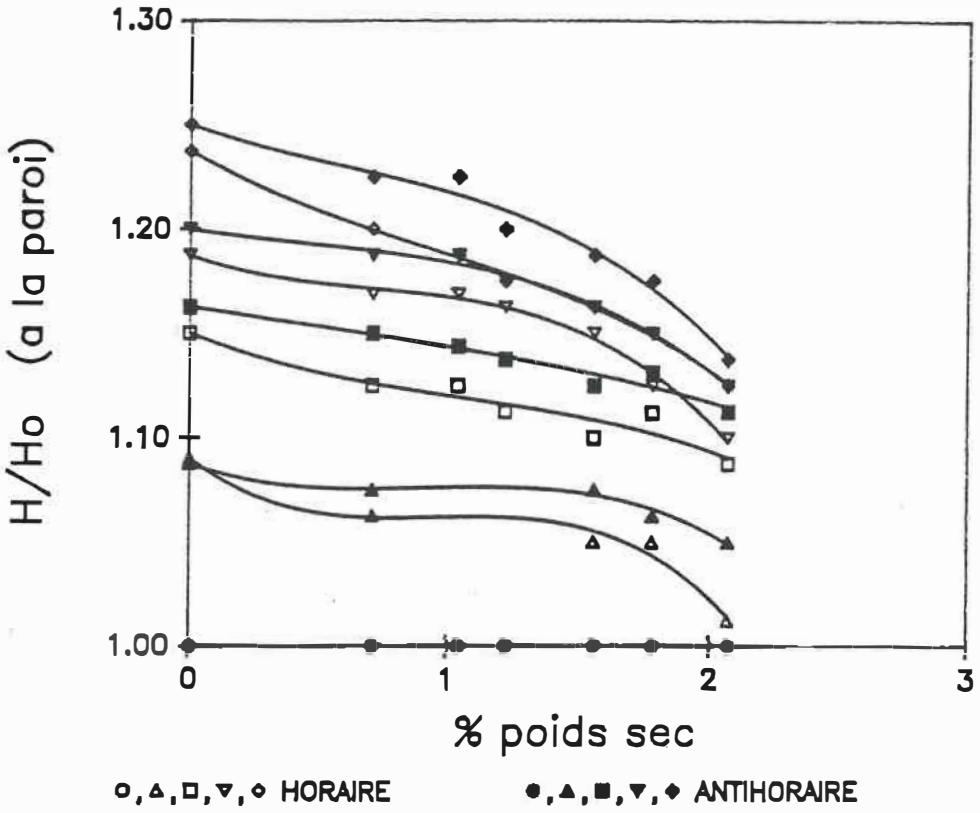


Figure 11 : Hauteur du vortex

intéressante car il y a augmentation de la surface de contact air/liquide.

Dans le cas d'une majorité de bioréacteurs commerciaux agités mécaniquement et aérés par bullage, des chicanes verticales sont placées entre la paroi et les pales de l'agitateur afin d'augmenter la surface d'échange gaz/liquide en fractionnant les bulles de gaz en plus petites bulles. Avec un agitateur à ruban hélicoïdal, l'espace entre la paroi du bioréacteur et les rubans est très petit ($1x10^{-2}$m) et n'est donc pas disponible pour ce type de chicanes. Dans la même optique d'augmenter la surface de contact gaz/liquide, seul l'espace au-dessus des rubans est disponible. Aussi la montée de liquide sur la paroi au-dessus des rubans hélicoïdaux devient disponible pour un nouveau type de chicanes: des chicanes de surface. Le bioréacteur modèle à fond profilé fut muni de chicanes dans le but d'augmenter la surface d'échange air/liquide. Deux designs de chicanes ont été testés tels qu'illustrés au tableau 2.

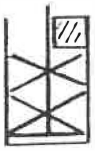
Designs	vue du dessus	vue de côté
I		
II		

Tableau 2 : Designs de chicanes de surface étudiées

De conception simple, un réacteur modèle préliminaire muni de 3 chicanes de surface de type II a été préférentiellement étudié relativement aux mesures hydrodynamiques.

. Un angle de 10 degrés ainsi qu'une longueur de $8x10^{-2}m$ ont permis de diriger le fluide de la paroi vers le centre de la surface libre. D'une hauteur de $10^{-1}m$, les chicanes ont pu rejoindre tout le fluide vorticiel. Le nombre de chicanes a été fixé à trois car cette disposition permet au vortex de se reconstituer entre chacune d'elle. De cette façon on vise une utilisation maximale des chicanes. Il a aussi été observé que l'action des chicanes provoque un bullage naturel à la surface libre par les jets de liquide (figure 12).

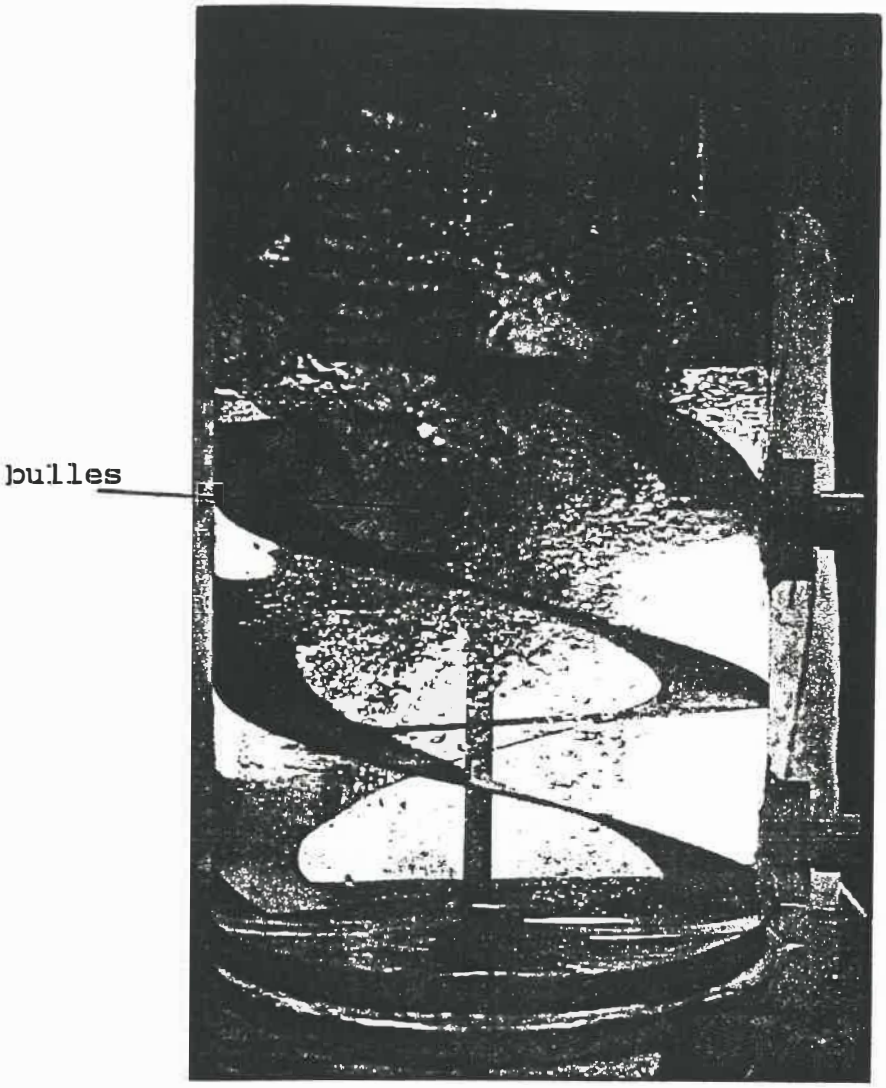


Figure 12 : Planches photographiques montrant l'entraînement gazeux causé par les chicanes

4.4.2. Evaluation de la qualité de mélange

4.4.2.1. Homogénéité

Ayant une densité supérieure à celle de l'eau (≈1.02 contre 1.00 g/mL), les cellules de plantes, soit individuelles ou sous forme d'agrégats, requièrent une agitation minimale pour maintenir la suspension homogène. En plus de rechercher une distribution uniforme des cellules dans le médium, les conditions opératoires (ainsi que le design) doivent aussi assurer des conditions physico-chimiques uniformes (voir le pH, la température et les concentrations en sucres ou éléments nutritifs). Ceci est particulièrement le cas de gaz dissous tel l'oxygène. Les zones dont le mélange s'effectue lentement comparativement à l'ensemble du fluide risquent d'être alimentées à un taux trop faible face à la consommation.

Pour les trois configurations de bioréacteurs modèles, des essais de coloration et de décoloration ont été effectuées avec de l'eau comme fluide. Des planches photographiques de l'évolution du mélange (décoloration) sont présentés en annexe F. Aucune zone

morte n'a pu être observée pour une gamme de vitesses de rotation de 60 à 150 rpm, pour les deux sens giratoires. Excepté pour le réacteur muni de chicanes et agité en sens anti-horaire (pompage vers le haut aux rubans), le mélange s'est effectué en deux étapes distinctes. Suite à l'addition du décolorant une première zone précise s'est décolorée rapidement puis une deuxième zone franche s'est décolorée lentement.

Une série d'expériences ont été menées pour vérifier l'état du mélange pour des fluides plus visqueux. Une solution d'agar granuleux fut utilisée dans le bioréacteur à fond profilé sans chicanes. Etant donné l'opacité de la suspension d'agar granuleux, les essais de coloration et de décoloration n'ont pu donner des informations sur le mélange dans la zone axiale.

Dans l'appréciation de performance des configurations quant au mélange d'une suspension, il a été trouvé que la vitesse d'agitation n'a pas d'influence marquée sur l'homogénéité à long terme de la suspension. Une vitesse supérieure et égale à 60 rpm a pu maintenir l'uniformité de la suspension en

direction axiale (figure 13).

4.4.2.2. Caractérisation par le temps de mélange

La mesure de temps de mélange a permis de discriminer la coexistence d'une zone à mélange rapide (t_{m1}) et d'une zone à mélange lent (t_{m2}) (Tableau 3). Sauf dans le cas du réacteur muni de trois chicanes, des zones bien précises ont révélé un mélange plus lent.

L'évolution du mélange et l'emplacement de ces zones dépendent grandement de la configuration du réacteur ainsi que du sens de rotation de l'agitateur. Une caractéristique générale des configurations sans chicanes ressort de cette étude. Pour une rotation horaire (pompage aux rubans vers le bas), le mélange est plus lent en région axiale et la hauteur de cette zone à mélange lent (face au fond du réacteur) est inversement proportionnelle à la vitesse d'agitation (figure 14). L'influence d'un fond profilé a permis d'accélérer le mélange mais n'a produit aucun effet visible sur l'emplacement des régions à mélange lent. Pour le sens giratoire inverse, le mélange s'est avéré

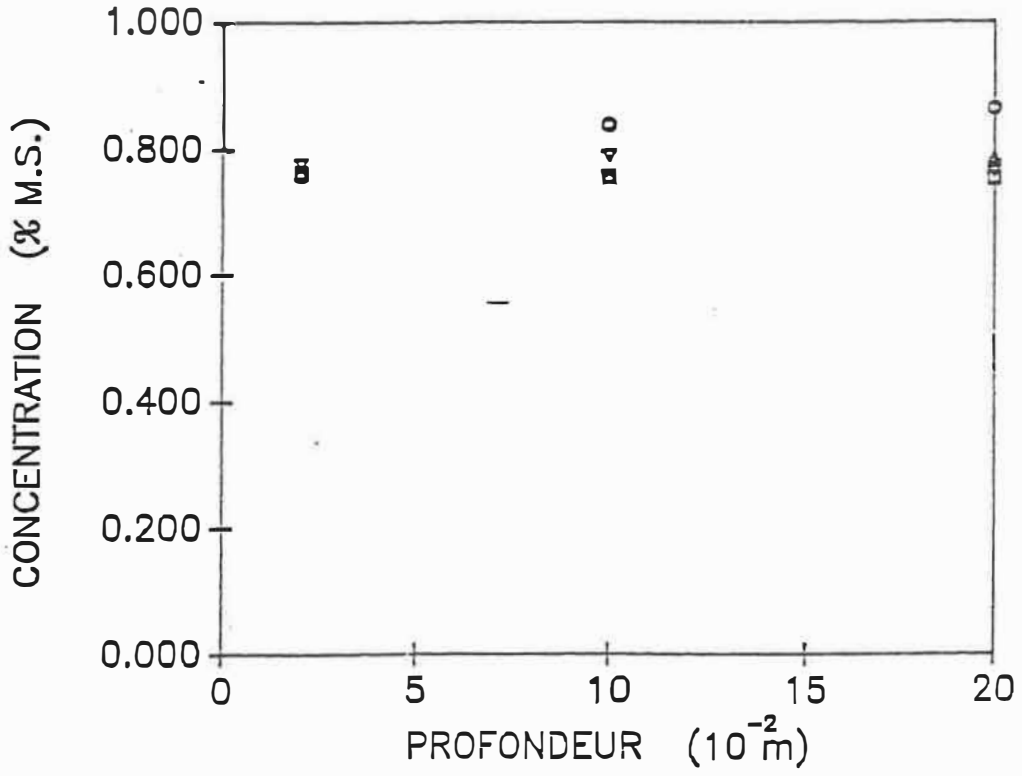
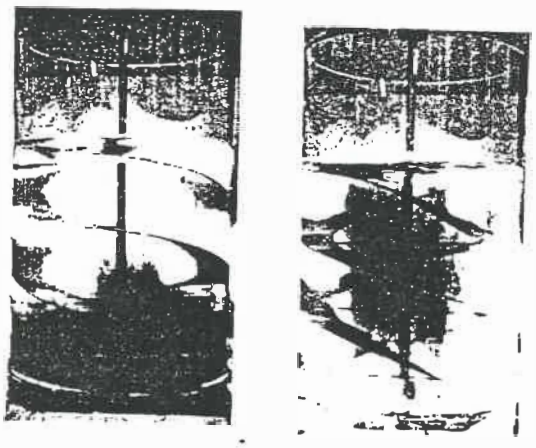


Figure 13 : Mesure de l'homogénéité axiale



anti-horaire horaire

après 32 s
60 rpm; fond plat

Figure 14 : Planches photographiques; zone à mélange lent

plus lent au bas du réacteur dans la zone des rubans (voir l'Annexe H). L'addition d'un fond profilé a déplacé la région à mélange lent vers la zone axiale.

Configuration						
Fond plat			Fond profilé			
			(seul)		(+3 chicanes)	
rpm	(s)		(s)		(s)	
			Rotation			
	H	A	H	A	H	A
60	25+27	25+27	18+14	18+13	*	*
90	18+12	18+12	12+10	15+10,5	*	*
120	15+10	15+10	11+6	12+4	3+7	8,5+0
135	12+8	12+8	11+5	12+3,5	2+5	6,5+0
150	11+9	10+8	11+4,2	12+5	2+4,5	4,5+0

H: rotation en sens horaire (pompage vers le bas aux rubans)

A: rotation en sens anti-horaire

*: pas de montée de liquide aux chicanes

Tableau 3 : Temps de mélange (t_{m1} + t_{m2}) pour les réacteurs modèles

Le réacteur équipé de chicanes de surface a conduit à un mélange rapide et uniforme sans l'apparition de zone à mélange lent. L'ajout de chicanes a permis de dévier le fluide vorticiel vers la région axiale forçant ainsi la circulation du fluide. Dans le cas d'une rotation favorisant un pompage aux rubans vers le haut (rotation en sens anti-horaire) l'effet des chicanes est cohérent avec le parcours normal du fluide. Un pompage ascendant aux rubans implique une circulation descendante du fluide en zone axiale. On peut donc prévoir que l'écoulement du fluide sera moins régulier pour une rotation horaire (pompage vers le bas). Cette configuration munie de chicanes de surface augmente le mélange axial dans la moitié supérieure du réacteur par la turbulence créée par la chute du fluide venant des chicanes. Cet effet d'entraînement diminue le temps de mélange pour un pompage ascendant aux rubans. On a observé une homogénéisation régulière du fluide avec l'avancement de la décoloration.

Pour un pompage descendant aux rubans, l'évolution du mélange s'effectue en deux étapes: tout d'abord, par mélange axial au mur à la moitié supérieure du

réacteur, puis, le mélange s'opère plus lentement pour la zone du fond. Un pompage descendant aux rubans force une circulation ascendante du fluide en région axiale qui entre directement en conflit avec le liquide projeté par les chicanes de surface.

La décoloration totale du fluide dans des conditions de diffusion simple (sans agitation) a nécessité plus de 200 s. L'action du fond profilé intervient principalement en réduisant le temps de décoloration de l'étape lente. Il agit donc là où il se situe sur la zone de mélange lent. Le sens giratoire de l'agitateur n'a provoqué de différences significatives sur le temps de mélange total que pour la configuration munie de chicanes de surface. Une rotation induisant un pompage descendant a entraîné des temps de mélange secondaire (t_{m2}) du même ordre que pour la configuration sans chicane. Alors qu'un pompage ascendant a permis de contrer l'apparition d'une deuxième étape même si les temps de mélange complets ($t_{m1} + t_{m2}$) sont presqu'équivalents.

4.4.3. Comportement face au transfert d'oxygène

Utilisant de l'eau distillée comme medium liquide pour la suspension d'agar granuleux la concentration de saturation en oxygène correspondait à la valeur pour de l'eau sans particule.

Pour les trois configurations proposées comme réacteurs modèles, des essais à 60 rpm et 90 rpm ont mené à des valeurs du $k_L a$ respectivement de l'ordre de 0,5 à 1,5 h^{-1}.

Tous les essais réalisés ont été correlés par l'équation (5) avec un coefficient de corrélation moyen de r^2=99% tel qu'illustré à la figure 15.

Considérant la littérature qui suggère un $k_L a$ supérieur à 5,3 h^{-1}, le reste des travaux n'a porté que sur des vitesses plus élevées. Aussi une attention particulière a été portée sur le réacteur équipé de chicanes compte tenu de sa supériorité quant aux temps de mélange ainsi que de la qualité de mélange observés (section 4.4.2.2).

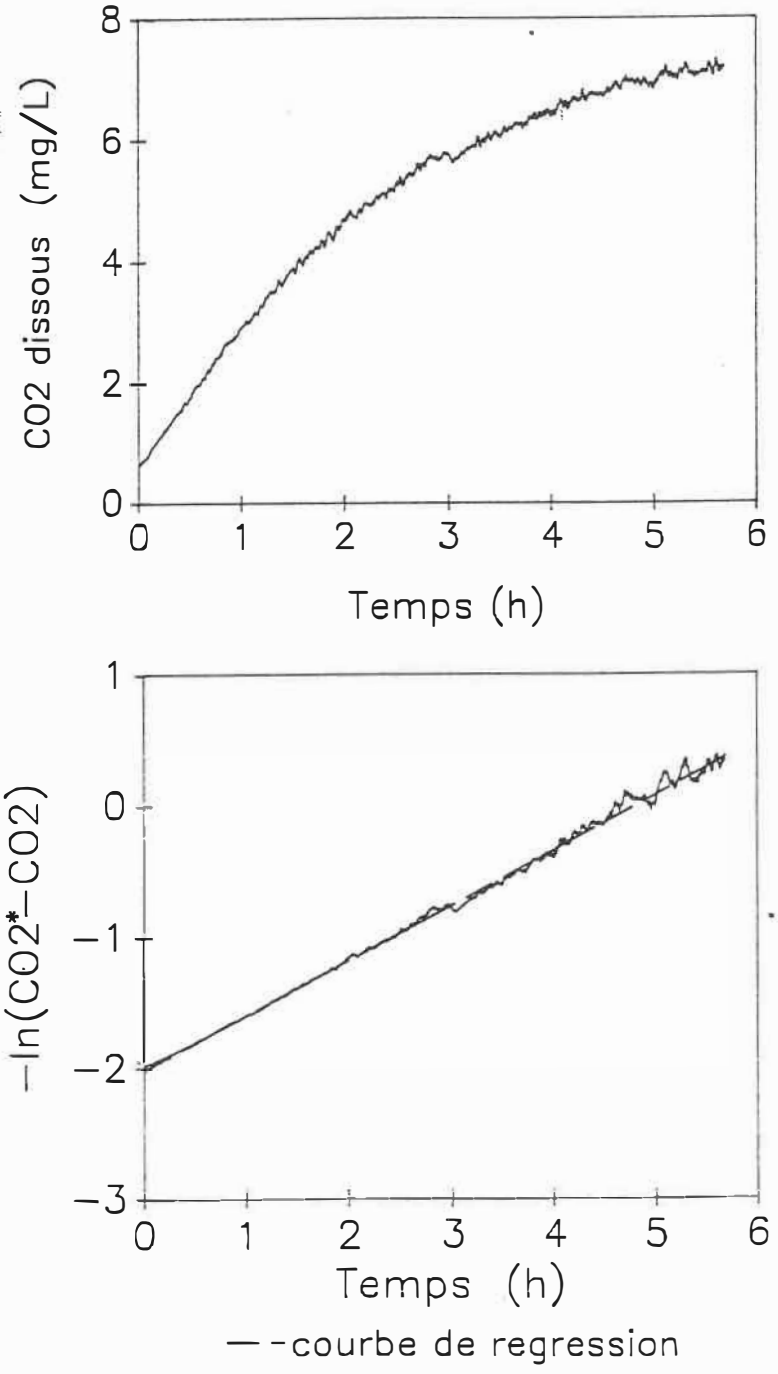


Figure 15 : Courbes de mesure de $k_L a$

Les essais portant sur l'influence du sens de pompage (aux rubans) se révèlent concordants avec les observations de temps de mélange: les valeurs des coefficients de transfert de l'oxygène sont supérieurs pour un pompage ascendant aux rubans (rotation anti-horaire) (tableau 4). De fortes concentrations en agar granuleux furent employées afin de pouvoir estimer l'évolution du $k_L a$ avec la croissance cellulaire. Il est intéressant de constater que l'écart de performance entre les sens de rotation augmente avec la viscosité. La suite de l'étude a porté sur une rotation anti-horaire afin de favoriser un pompage vers le haut.

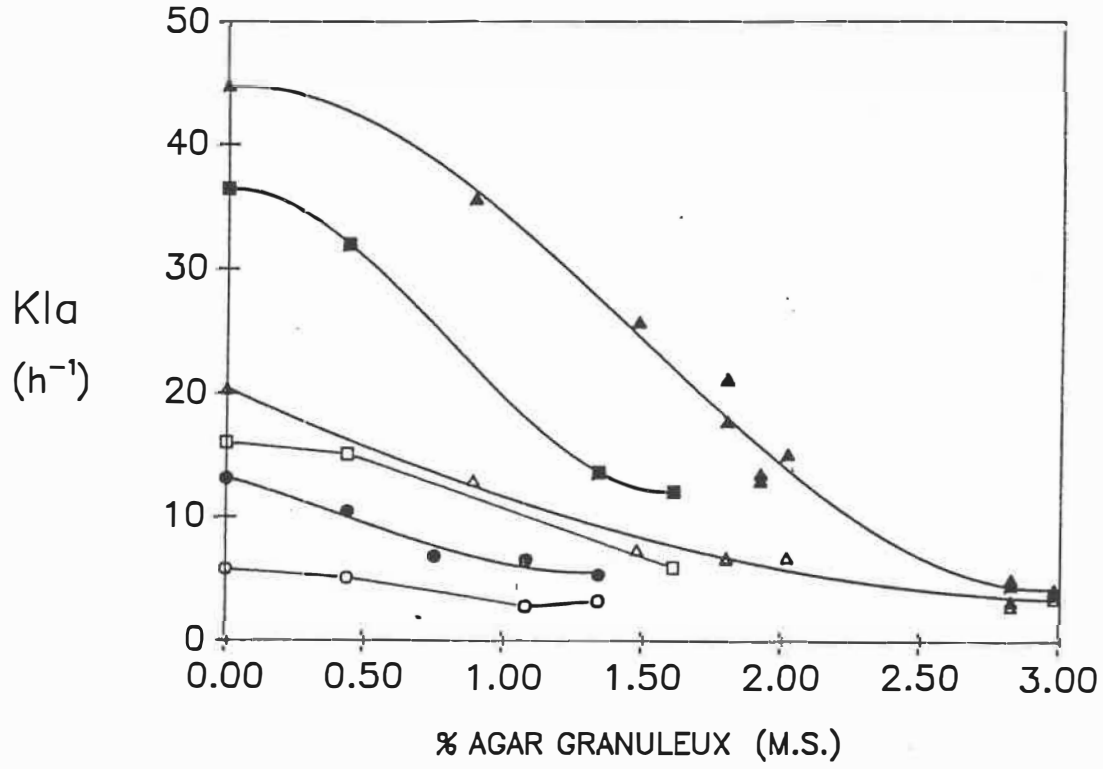
Ce choix s'est imposé selon ces résultats ainsi que d'autres constats: une circulation du fluide plus régulière (section 4.4.2.2.), la présence d'un vortex plus important (en hauteur, figure 11) qui par l'effet des chicanes provoque un appel d'air (bullage) supérieur (en volume total de bulles entraînées) (section 4.4.2.1. et figure 12).

Vitesse d'agitation	Concentration en agar granuleux	
	1,8%	2,98%
	$k_L a$ (h^{-1})	$k_L a$ (h^{-1})
120 rpm		
horaire	4,41	0,93
anti-horaire	6,85	3,59
135rpm		
horaire	9,56	1,27
anti-horaire	11,93	3,92
150rpm		
horaire	16,98	1,63
anti-horaire	21,31	4,38

Tableau 4 : Influence du sens de rotation sur le $k_L a$
3 chicanes: 8×10^{-2}m de hauteur, 10^{-1}m
de longueur, 10° radialement

La longueur horizontale des chicanes s'est avérée très importante. Les résultats obtenus ont montré la supériorité de performance des chicanes longues (figure 16). Les chicanes longues réussissent à dévier plus de fluide vorticiel. L'augmentation, en débit, de ces jets favorise un renouvellement plus rapide de la surface libre. Aussi, parallèlement, l'entraînement de bulles d'air provoqué par les jets de fluide augmente. Ces effets entraînent donc l'accroissement de la surface de transfert ce qui majore le coefficient de transfert d'oxygène.

Des études ont aussi été menées relativement à l'influence de l'angle des chicanes au rayon pour les deux configurations de chicanes choisies; soit le design I formé de rectangles curvilignes et du design II comportant des rectangles rectilignes. Le transfert global d'oxygène ne semble pas être dépendant de l'angle d'inclinaison pour la plage étudiée comprise entre 10 et 30° radialement (figures 17,18,19). Les angles choisis ont permis l'utilisation de tout le liquide vorticiel ainsi que d'en favoriser la projection en région axiale. Aucune différence significative entre les deux designs (chicanes



o,▵,▫ 120 rpm;●,▲,■150 rpm; o ● 1 cm; ▫ ■ 2.5 cm; ▵ ▲ 10 cm

Figure 16 : Influence de la longueur des chicanes sur le $k_L a$

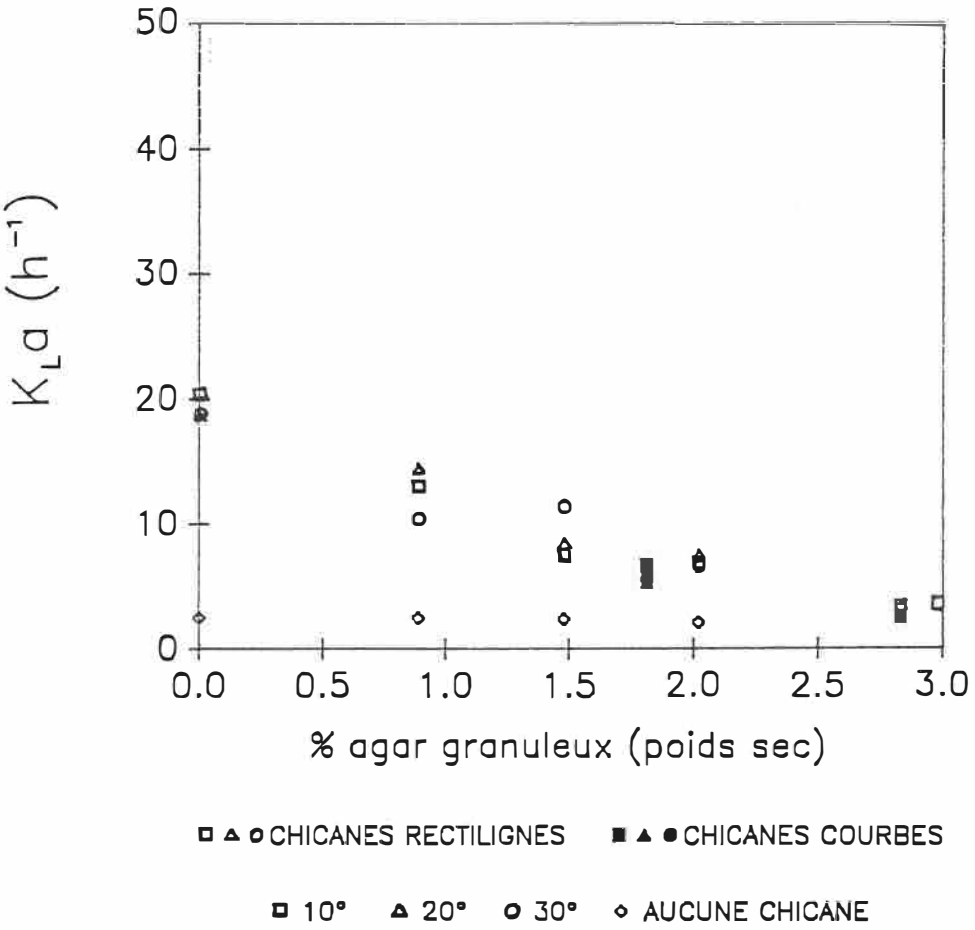


Figure 17 : Etude de l'influence de l'orientation des chicanes à 120 rpm

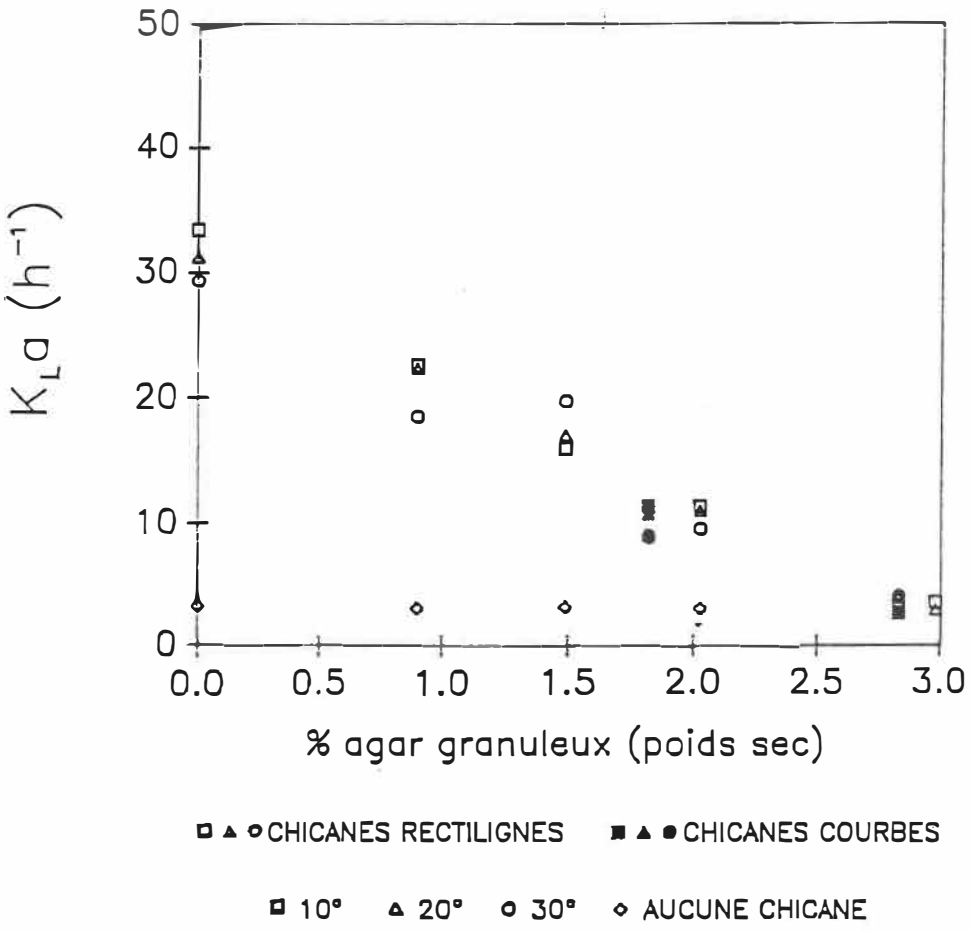


Figure 18 : Etude de l'influence de l'orientation des chicanes à 135 rpm

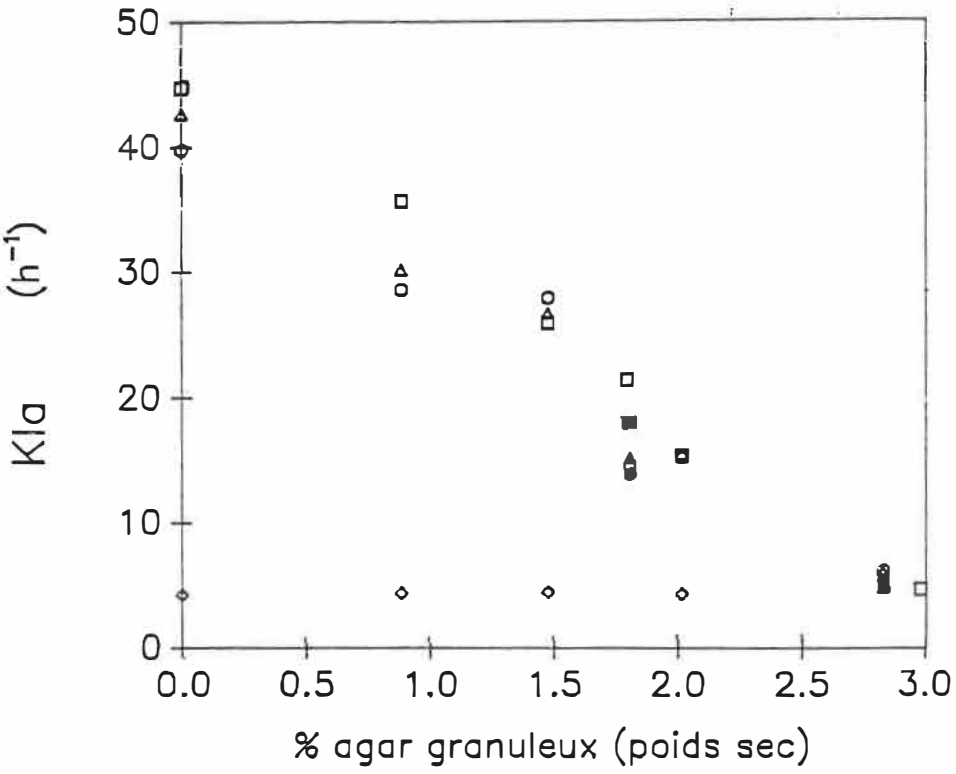


Figure 19 : Etude de l'influence de l'orientation des chicanes à 150 rpm

rectilignes et courbes) n'ont pu être observées. De conception plus simple, le design rectiligne reste plus intéressant par sa facilité de construction.

4.4.4. Puissance consommée à l'agitation

Les courbes de puissance à partir des mesures de couple sont présentées à la figure 20. Tel que pour les courbes de viscosité (figure 7) la puissance consommée augmente à partir d'une concentration en agar granuleux de 1.3% M.S.. La suspension devient alors très visqueuse et ainsi que rhéofluidifiante.

4.5. Discussion des résultats

4.5.1. Temps de mélange

Des valeurs de temps de mélange peut être calculé le nombre de rotations nécessaires à l'agitateur afin d'homogénéiser totalement le fluide.

$$M = N \cdot t_m \qquad (6)$$

Dans la littérature (47,55,56) il est établi que M

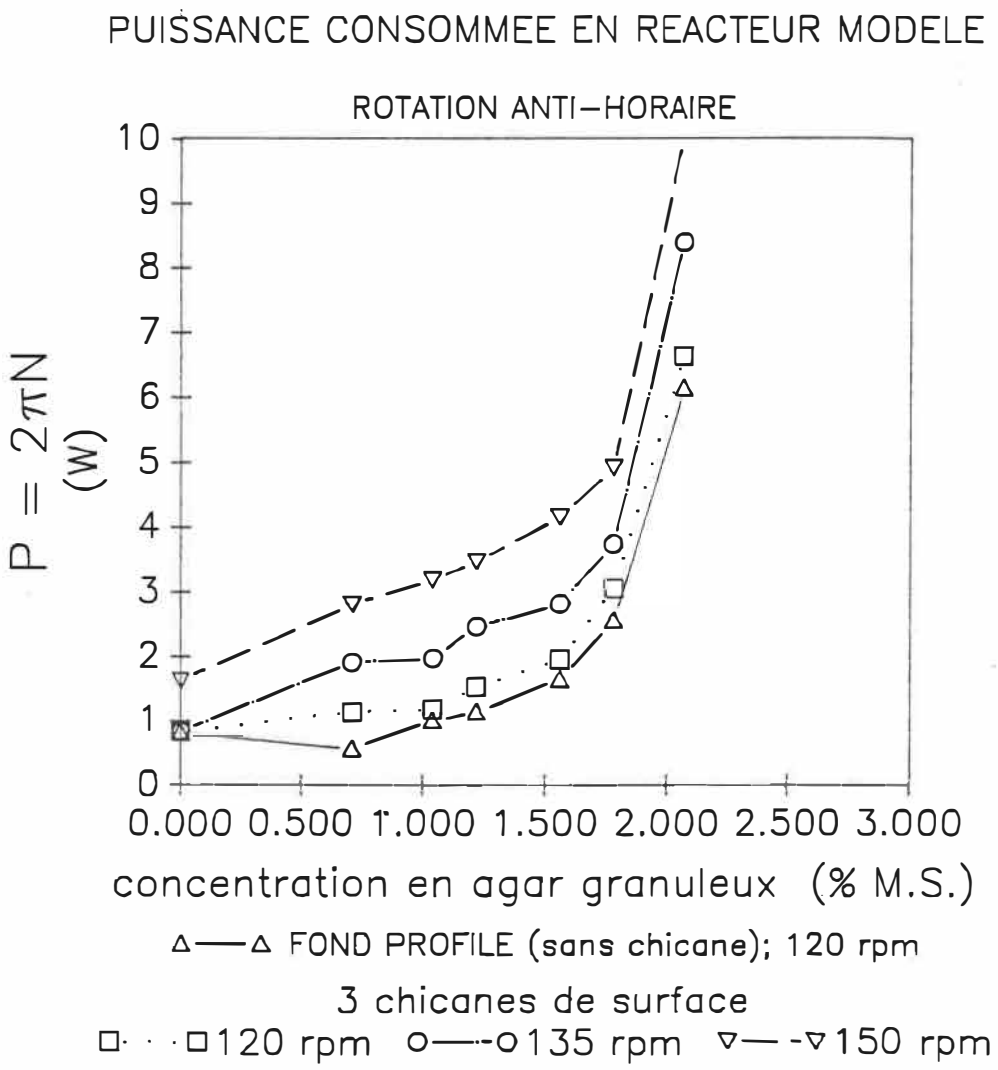


Figure 20 : Puissance appliquée à l'agitateur: rotation anti-horaire, avec et sans chicanes

est fonction de la géométrie de l'agitateur ainsi que des propriétés des fluides (caractère non-newtonien et surtout leur degré d'élasticité). Le modèle suivant entre le temps de mélange et la vitesse d'agitation est proposé (50):

$$t_m = C1 \cdot N^{C2} \qquad (7)$$

où C1 = M pour C2 = -1

et a été validé pour plusieurs fluides.

Traçant les valeurs expérimentales de M face à la vitesse d'agitation, on observe des différences de comportement selon le design (figure 21). Les réacteurs avec chicanes de surface se démarquent nettement des autres configurations quant à une diminution marquée du nombre de rotations nécessaires à l'obtention de l'homogénéisation avec la vitesse d'agitation. L'effet des chicanes sur le temps de mélange total augmente donc avec la vitesse d'agitation. Cet effet est plus marqué avec une

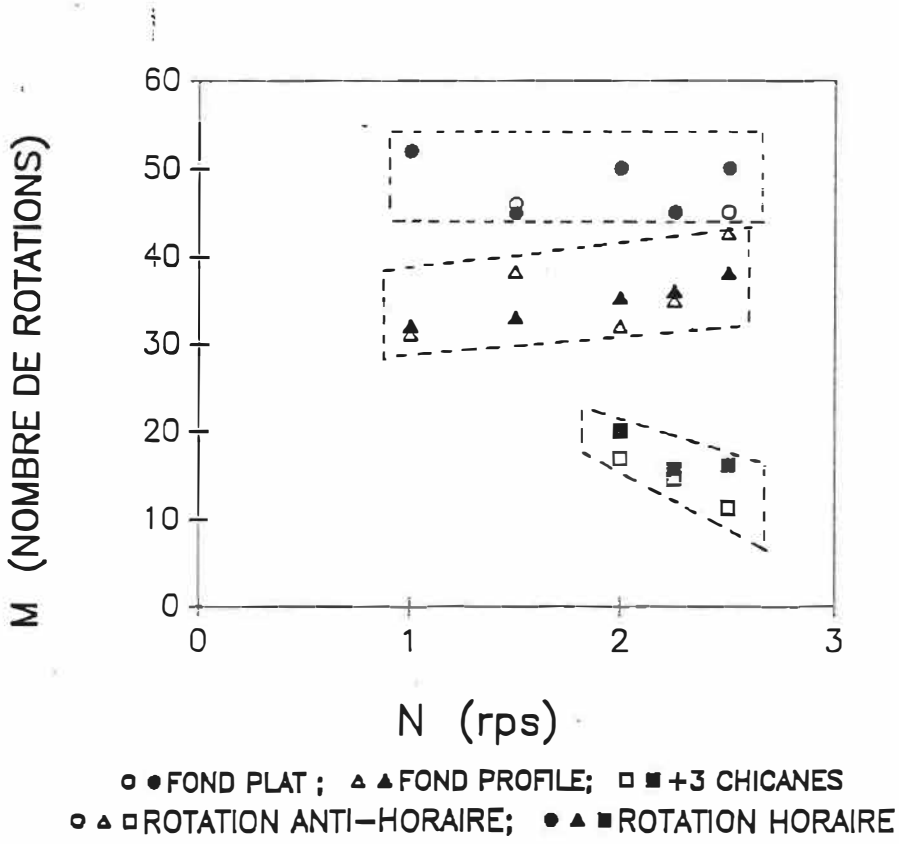


Figure 21 : Nombre de rotations nécessaires à l'homogénéisation selon la vitesse d'agitation

rotation anti-horaire. Déjà avec l'addition d'un fond profilé on note une diminution significative de M d'environ 48 tours à 36 tours. Yap (47) avait trouvé que M était égal à 45 pour un réacteur à fond plat muni d'un agitateur similaire et pour une solution de 85% glycérine dans l'eau. Pour des solutions rhéofluidifiantes de C.M.C., elle a trouvé des valeurs de M de 105 (2,1% C.M.C.) et de 123 (2,5% C.M.C.) alors que pour des solutions de polyacrylamide (caractère élastique) des valeurs de M de 143 (0,5%) et de 258 (1,5%) ont été déterminées.

Les résultats obtenus montrent l'importance du caractère évolutif des chicanes de surface avec l'augmentation de la vitesse d'agitation (évolution de la hauteur du vortex).

4.5.2. Capacité de transfert de l'oxygène

Dans la même logique que les résultats présentés précédemment (section 4.5.1.), l'efficacité des chicanes à dévier un maximum de liquide vorticiel est diminué par l'augmentation de la viscosité jouant sur la hauteur du vortex. Cette déviation additionnée à la

dépendance de M face à la vitesse de rotation indiquent le caractère dynamique de l'efficacité des chicanes. Aussi faut-il noter la tendance généralisée des courbes expérimentales du $k_L a$ (figures 16,17,18 et 19) de tendre vers les valeurs obtenues sans la présence de chicanes pour des concentrations pseudo-cellulaires élevées (≈2%). Ce phénomène s'explique par une forte diminution de l'efficacité des chicanes à mesure que la viscosité du fluide augmente et que le vortex diminue d'intensité. Il est aussi intéressant de noter l'indépendance du $k_L a$ face à la concentration en agar granuleux en absence de chicanes de surface.

Afin de vérifier l'aptitude des bioréacteurs modèles étudiés à fournir de l'oxygène à un taux acceptable, les valeurs de $k_L a$ obtenues expérimentalement doivent être confrontées aux besoins lors de cultures. En approximation du transfert d'oxygène nécessaire aux suspensions de cellules de plantes, considérons le cas idéal d'un équilibre entre l'oxygène transférée et consommée:

$$OUR = OTR \qquad (8)$$

où $OUR = Qo_2 \cdot x$ ("oxygen uptake rate")

$OTR = k_L a \cdot (Co_2^* - Co_2)$ ("oxygen transfer rate")

En supposant que cette concentration est maintenue constante tout au long d'une culture, l'équation (8) permet de déterminer si les conditions expérimentales mènent à un transfert d'oxygène suffisant. Bien que plusieurs auteurs parlent d'un taux de consommation en oxygène évoluant selon l'état de croissance d'une culture, la valeur maximale de Qo_2 rencontrée pour C. roseus fut considérée (15×10^{-3} kg O_2/kg M.S./h (4)). On a dû procéder ainsi par manque de données dans la littérature sur l'évolution de Qo_2. La courbe prédictive a donc été tracée (figure 22) à partir des valeurs suivantes:

$Qo_2 = 15 \times 10^{-3}$ kg O_2/kg M.S./h

$CO_2^* = 7{,}92 \times 10^{-3}$ kg/m^3

CO_2 = 10% de CO_2^* (limite considérée critique à pression atmosphérique (57)).

Nous remarquons que les conditions expérimentales

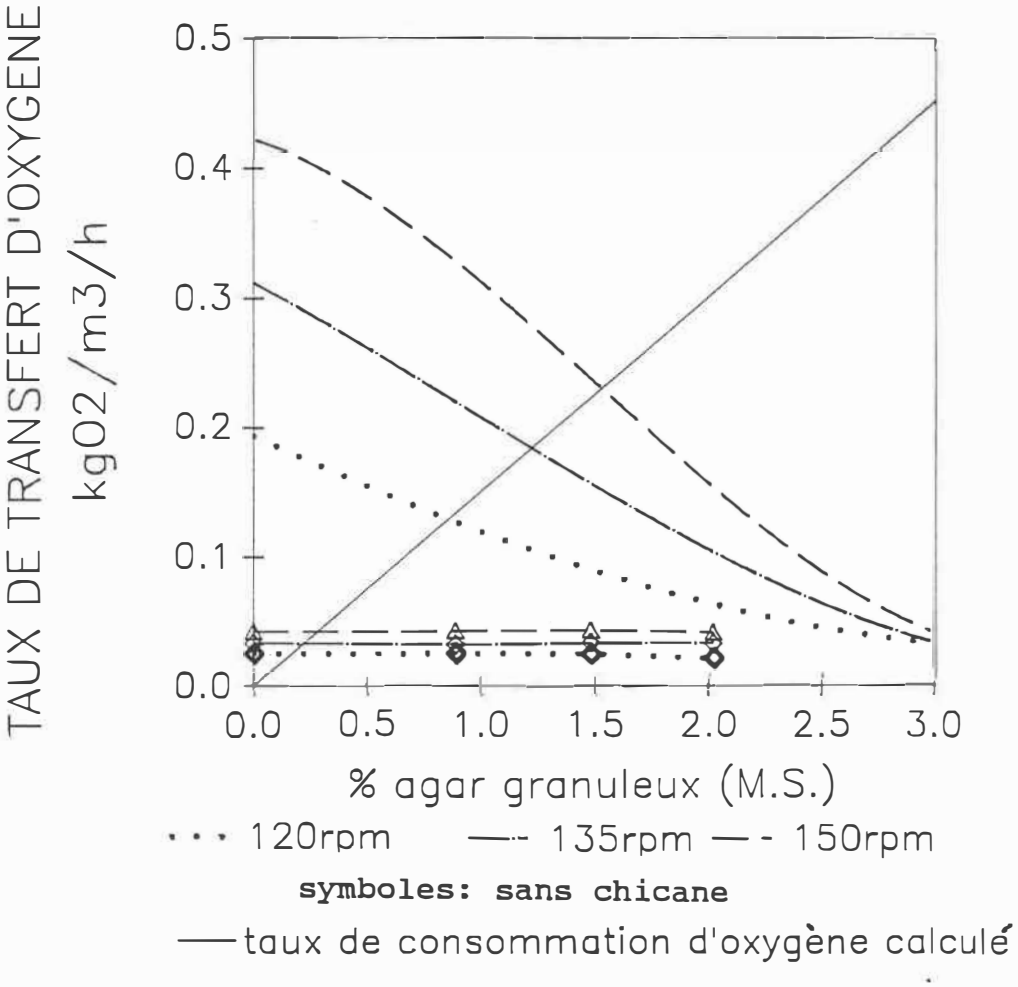


Figure 22 : Taux de transfert de l'oxygène face à une demande cellulaire estimée

(28°C, 120≤N≤150 rpm, avec ou sans chicane de surface, alimentation de surface en air seulement à pression atmosphérique) ne peuvent fournir une oxygénation suffisante tout au long de la croissance. En effet, à partir de concentrations en agar de 0.8% M.S., les taux de transfert expérimentaux deviennent inférieurs aux valeurs prédictives de l'équation (8).

Décidant de ne pas aller vers des vitesses d'agitation supérieures à 150 rpm car le liquide a alors tendance à passer par dessus des chicanes il a été décidé de considérer un enrichissement en oxygène des gaz alimentés. Pour les conditions d'opération étudiées (120 à 150 rpm) les courbes de concentrations en oxygène nécessaire dans les gaz ont été calculées selon les données expérimentales de $k_L a$ (figure 23) à partir du bilan sur l'oxygène ainsi que du Q_{O2} déjà cité. En considérant la loi de Henry: $Co_2^* = P_t \cdot yo_2/He$ on voit que seule une augmentation de la pression totale exercée sur les gaz peut mener aux valeurs estimées de (yo_2) selon les $k_L a$ expérimentaux. Cette solution fut écartée pour des raisons techniques. Aussi selon les résultats de Snape et al. (50) montrant une évolution du taux de consommation avec l'avancement

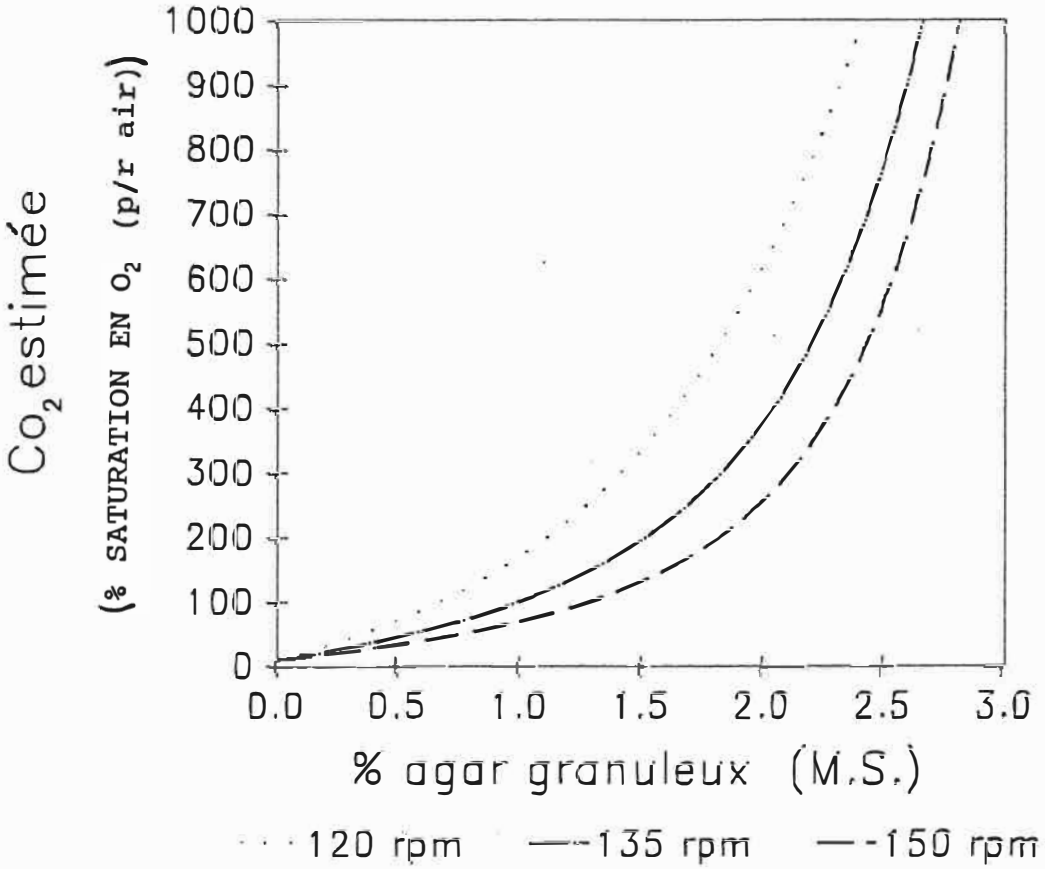


Figure 23 : Concentration estimée en oxygène dans les gaz alimentés

de la culture ainsi que le fait que le Q_{O2} considéré est un des plus élevé de la littérature, il a été décidé de vérifier les performances du bioréacteur en culture.

4.5.3. Relation entre le temps de mélange et le $k_L a$

Le transfert d'oxygène est fonction des conditions hydrodynamiques ainsi que du potentiel du fluide (i.e. C_{O2}^*) à solubiliser l'oxygène. Les corrélations de prédiction du $k_L a$ présentées dans la littérature pour des réacteurs aérés par bullage mettent en cause l'hydrodynamique (vitesse des bulles de gaz). Parallèlement, l'importance des conditions hydrodynamiques est encore plus significative pour une aération par la surface libre car l'oxygénation ne se fait que par un renouvellement de la surface de contact air-liquide.

Les travaux de Carreau et al. (46) ont montré que le temps de recirculation du fluide en réservoir agité par rubans hélicoïdal de géométrie similaire à notre étude était relié au temps de mélange selon:

$$t_m / t_c \approx 4$$

Par ailleurs, pour H/D≈1, avec la théorie de renouvellement de surface et en supposant que la surface d'échange est celle de la section du réacteur, on obtient:

$$k_L \cdot a \approx \sqrt{\frac{4 \cdot D_{O2}}{\pi \cdot t_{exp}}} \cdot \frac{\pi D^2}{4} \cdot \frac{1}{\frac{\pi D^2}{4} \cdot D} \qquad (9)$$

$$k_L \cdot a \approx \sqrt{\frac{4 \cdot D_{O2}}{\pi \cdot t_{exp}}} \cdot \frac{1}{D} \qquad (10)$$

où t_{exp} est le temps d'exposition du fluide à l'aire de surface. Si l'on suppose que la trajectoire d'un élément de fluide peut être approximée par:

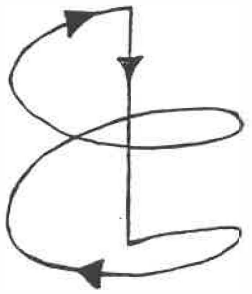


Figure 24: Circuit de circulation du fluide

alors on peut poser que

$$\frac{t_{exp}}{t_c} = \frac{\text{trajectoire de surface}}{\text{trajectoire totale}} \approx \frac{\pi D}{n_s \pi D + D} \qquad (11)$$

$$\frac{t_{exp}}{t_c} \approx \frac{1}{n_s + 1/\pi} \qquad (12)$$

où n_s est le nombre de tours du ruban.

Considérant qu'en moyenne le fluide fera un tour en surface on a donc:

$$t_{exp} \approx \frac{t_m/4}{n_s + 1/\pi} \qquad (13)$$

et

$$k_L \cdot a \approx \sqrt{\frac{16 \cdot D_{02} \cdot (n_s + 1/\pi)}{\pi \cdot t_m}} \cdot \frac{1}{D} \frac{}{D} = 4 \sqrt{\frac{D_{02} \cdot (n_s + 1/\pi)}{\pi \cdot t_m}}$$

i.e. $$k_L \cdot a \approx \frac{4}{D} \cdot \sqrt{\frac{D_{02} \cdot (n_s + 1/\pi)}{\pi}} \; (t_m)^{-1/2} \qquad (14)$$

Pour les essais avec de l'eau ($D_{O_2}=5.76x10^{-6}$ m^2/h) le modèle sous-estime le transfert d'oxygène (figure 25). L'oxygène n'étant renouvelé qu'à la surface libre, il est prévisible que son transfert ($k_L a$) soit relié au temps de recirculation du fluide (le renouvellement de la surface libre). En présence de chicanes de surface dont l'efficacité augmente avec la vitesse d'agitation certaines hypothèses posées ne sont pas valide. Tout d'abord, l'aire interfaciale apparaissant à l'équation (5) correspond au cas d'une surface plane sans vagues. Aussi, l'évaluation du ratio t_{exp}/t_c par le ratio de trajectoires implique des vitesses d'écoulement similaires lors du contact entre le fluide et les gaz et lors de l'écoulement dans le réacteur. Une autre source de déviation provient de l'hypothèse d'un ratio t_m/t_c constant tiré de travaux portant sur des fluides visqueux et non-newtoniens. Carreau et al. (46) ont trouvé que ce rapport était fonction des propriétés du fluide (viscosité et élasticité) ainsi que de la géométrie du réacteur comme dans le cas des études sur le temps de mélange. Ces valeurs de ratio ont varié d'environ 3,50 à 4,27 pour de la glycérine et une solution de 2% C.M.C. respectivement, pour la même géométrie d'agitateur que

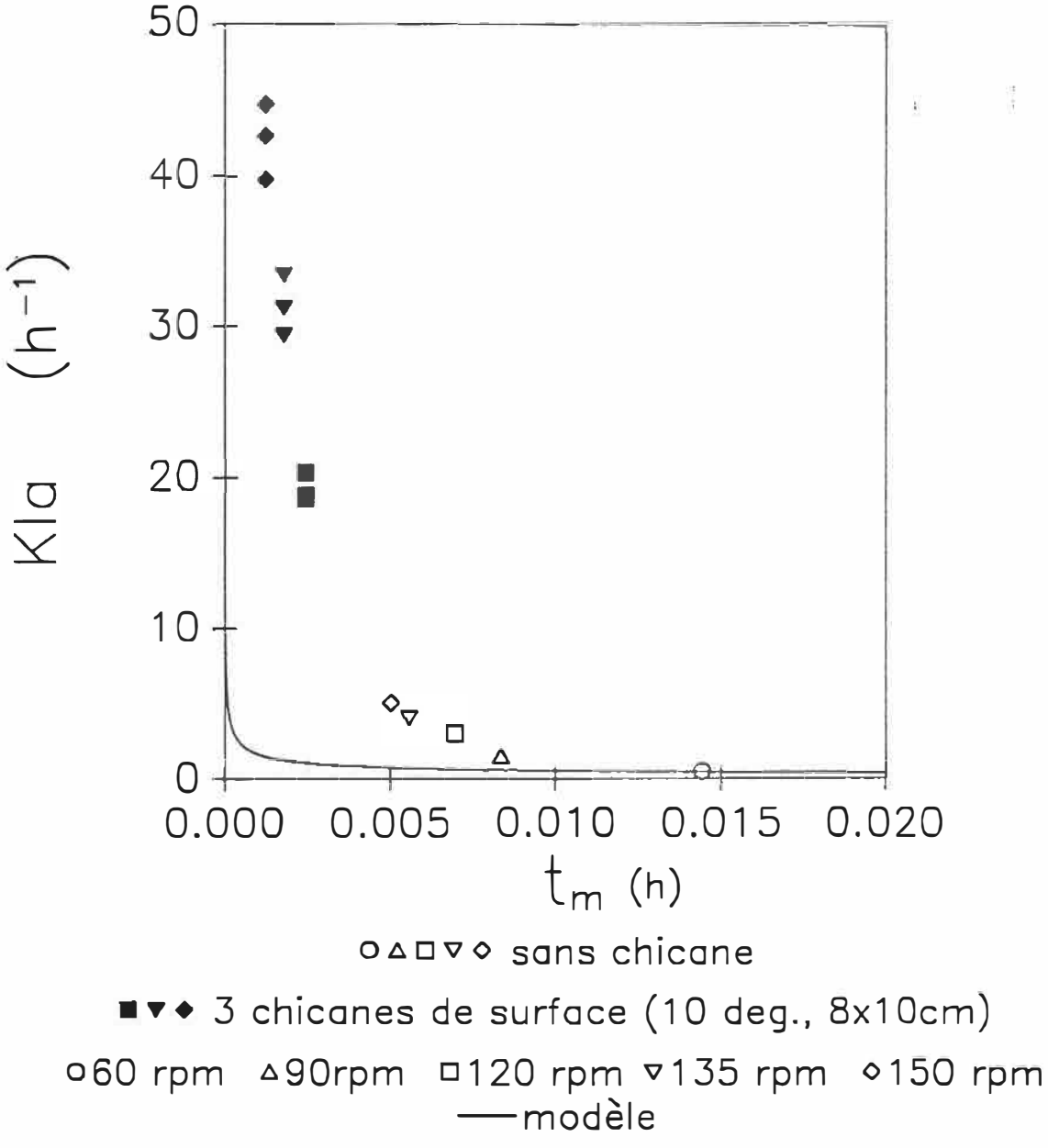


Figure 25 : Relation entre le $k_L a$ et le temps de mélange total; rotation anti-horaire

celle utilisée dans notre étude.

Pour de faibles vitesses d'agitation (60 et 90 rpm), sans vortex significatif, les valeurs de $k_L a$ expérimentales sont similaires aux valeurs prédites par le modèle. Ceci s'explique par des conditions expérimentales plus près des hypothèses posées.

4.5.4. Relation entre la puissance consommée à l'agitateur, le $k_L a$ et la concentration en pseudo-cellules

Les données expérimentales des $k_L a$ selon la puissance nécessaire à l'agitation sont présentées à la figure 26. On observe un changement de comportement (un changement de pente) à une concentration de 1,56% M.S.. A partir de cette concentration la viscosité augmente rapidement avec la concentration (figure 7). Pour des concentrations inférieures, le $k_L a$ est dépendant de la puissance alors que pour des concentrations supérieures une augmentation de la puissance nécessaire n'a plus d'effet significatif sur le $k_L a$. On décèle donc le même comportement en deux étapes observé lors des mesures rhéologiques avec

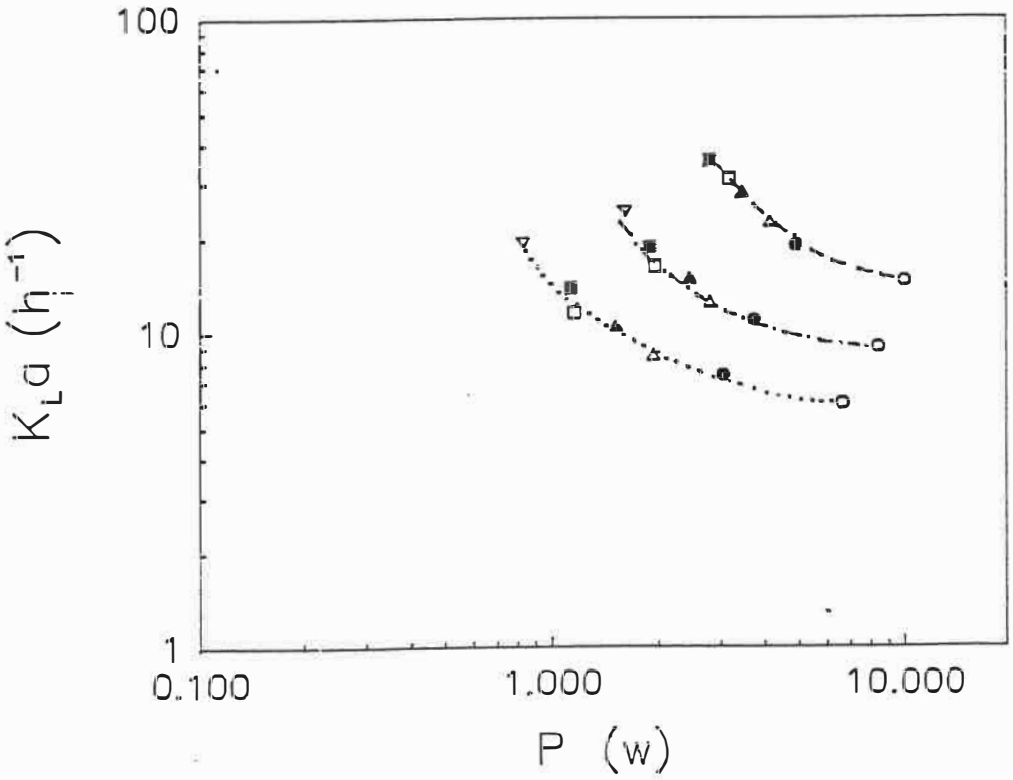


Figure 26 : Relation entre le $k_L a$ et la puissance développée à l'agitateur

l'augmentation de la concentration en agar granuleux. Les courbes présentées permettent d'estimer le $k_L a$ ainsi que la concentration cellulaire par la mesure de la puissance consommée à l'agitateur.

4.5.5. Potentiel de mise à l'échelle

Du bilan sur l'oxygène (8) à l'équilibre le volume maximum du bioréacteur permettant un transfert suffisant peut être estimé. De l'aire interfaciale écrite en terme du volume pour une surface plane l'équation (8) devient:

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot \left[\frac{(k_L \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2})}{Q_{O_2} \cdot x} \right]^3 \qquad (15)$$

Evaluant le k_L par les données de $k_L a$ à 120 rpm on obtient un volume de 102 L pour une alimentation en gaz composée d'oxygène pur ($C_{O_2}^*$=39.5 mg/L @ 1 atm), une concentration en oxygène dans la suspension de 10% de la saturation avec de l'air, un Q_{O_2} de 15×10^{-3} kg O_2/kg M.S./h et une concentration cellulaire de 14 g M.S./L (phase de croissance exponentielle pour 5% sucrose).

CHAPITRE 5

CULTURES EN BIOREACTEUR

5.1. Choix de croissances comparatives en flacons agités

Les flacons agités sont de bons systèmes de référence car ils offrent des conditions mécaniques douces et uniformes (15,31,57). A volume constant, on peut cependant douter de l'uniformité des conditions mécaniques et chimiques pour de fortes concentrations en cellules (>10 g M.S./L) et des viscosités élevées. Avec des prises d'échantillons répétées d'environ 25 mL aux 2 ou 3 jours, le volume de suspension (initialement de 200 mL) diminue progressivement. L'effet négatif de viscosités élevées sur le transfert d'oxygène ainsi que sur le mélange est donc contrecarré. Pour une variation de volume de 200 à 100 mL de milieu dans un Erlenmeyer de 250 mL, Snape et al. (50) ont observé que le taux de transfert d'oxygène augmente de $9.6x10^{-3}$ à $2.2x10^{-2}$ $gO_2/L/h$.

5.2. Résultats des cultures

5.2.1. Observations et résultats de croissance

Cinq cultures ont été opérées en bioréacteur avec des cellules de Catharanthus roseus (souche MCR17). Une première culture fut tentée avec une concentration initiale en sucrose de 2% suivi de quatres autres à 5% sucrose.

La première croissance s'est déroulée sur une période totale de 7 jours jusqu'à l'épuisement des nutriments (figures 27 et 28). Malgré le fait qu'aucun contrôle sur le niveau de l'oxygène dissous n'ait été effectué (électrode à oxygène hors d'usage à ce moment), une concentration maximale de 11 g M.S./L a été atteinte. Cette concentration correspond à ce que présente la littérature pour la même concentration initiale en sucrose.

Une deuxième expérience fut entreprise avec comme cible une concentration finale en cellules de 30 g M.S./L (limite pratique). Avec une concentration initiale en sucrose de 5% et plusieurs ajouts de milieu

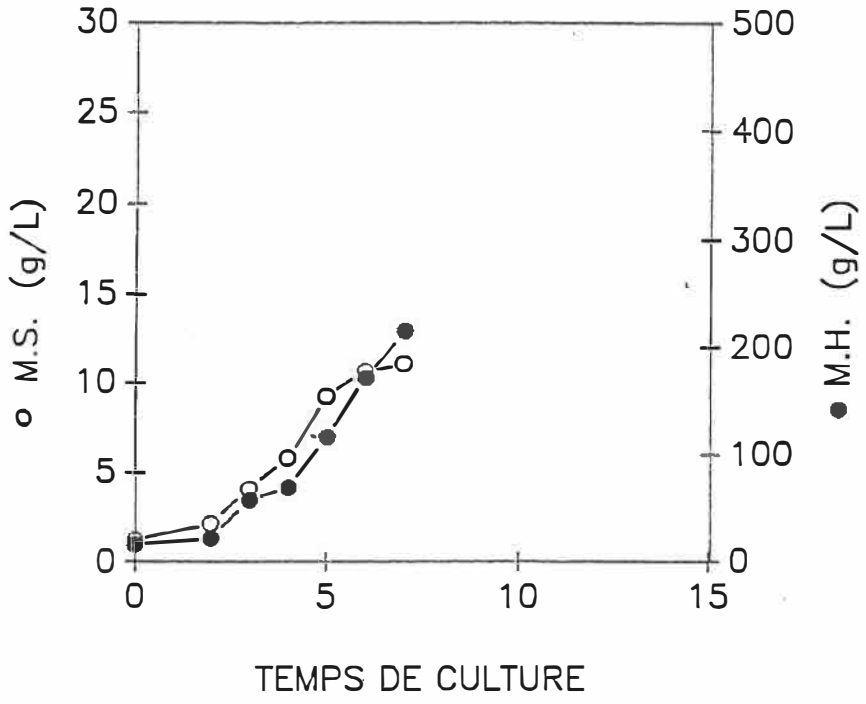


Figure 27 : Courbe de croissance: culture 1 en bioréacteur

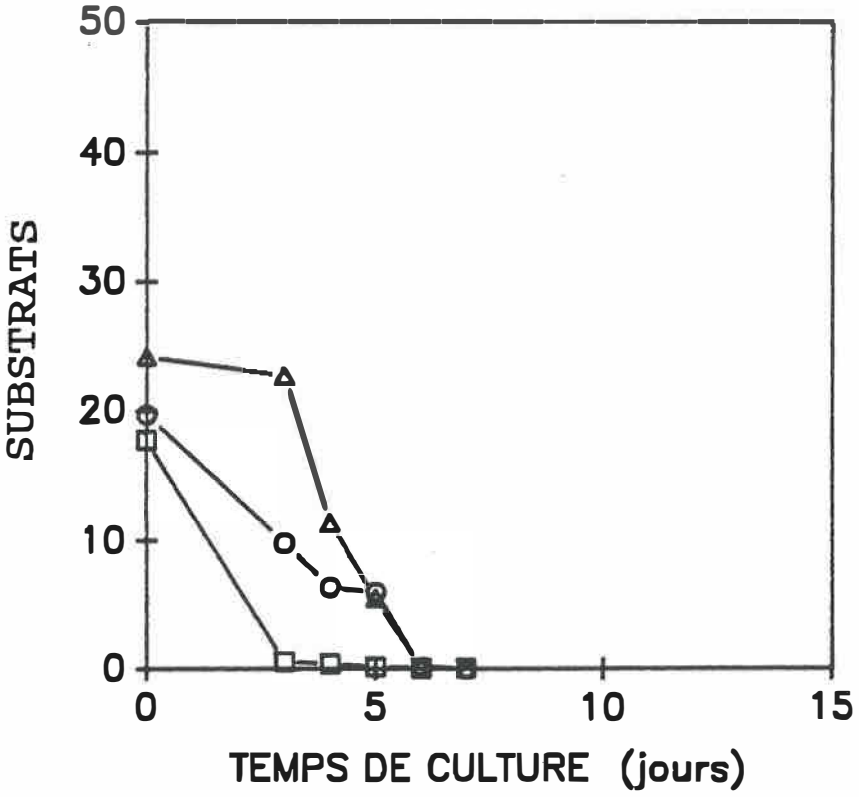


Figure 28 : Courbe des substrats: culture 1 en bioréacteur

frais pour combler des volumes non-négligeables d'échantillons prélevés (l'augmentation de la concentration en sucrose illustré à la figure 29 correspond à ces ajouts) le rendement en cellules fut largement inférieur aux cultures subséquentes. Un inoculum déficient ainsi que les conditions opératoires variables décrites ci-dessous peuvent être responsables de ces contre-performances. Malgré ces résultats cette culture permit néanmoins certaines constatations très utiles. Dès le 5^{e} jour les conditions d'opérations (120 rpm, alimentation en air) ne suffisaient plus à maintenir l'oxygène dissous à un niveau acceptable ($\geq$20% de la saturation) (figure 30). La vitesse d'agitation fut alors augmentée de 120 rpm à 135 puis à 150 rpm afin d'améliorer le transfert d'oxygène. A 135 rpm l'effet fut positif pour une très courte période, mais à 150 rpm l'effet s'est déclaré négatif. L'imposition de cette dernière vitesse a immédiatement provoqué la formation d'une épaisse couche de mousse sur toute la surface supérieure du liquide et la concentration en oxygène dissous s'est mis à décroître. Cette culture n'a pas atteint les objectifs visés après plus de 30 jours en bioréacteur. Par ailleurs, l'aptitude du bioréacteur à maintenir des conditions de

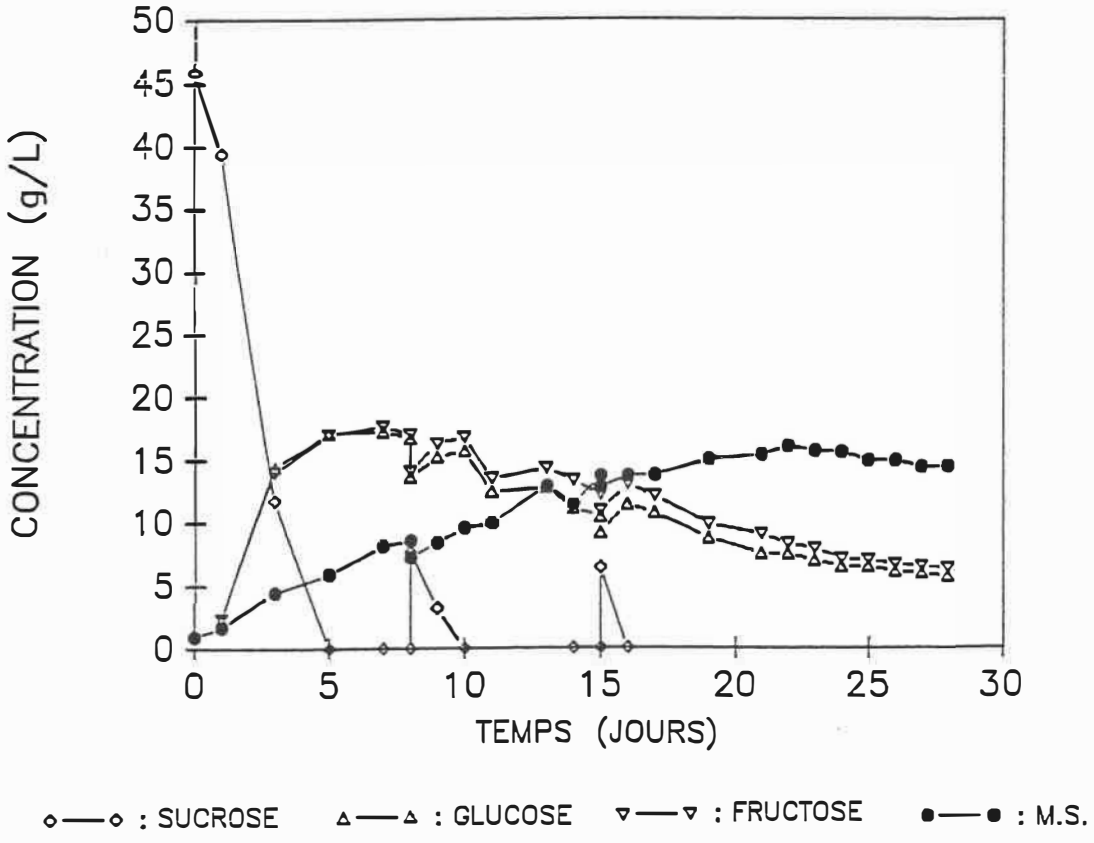


Figure 29 : Courbes de croissance et des substrats: culture 2 en bioréacteur

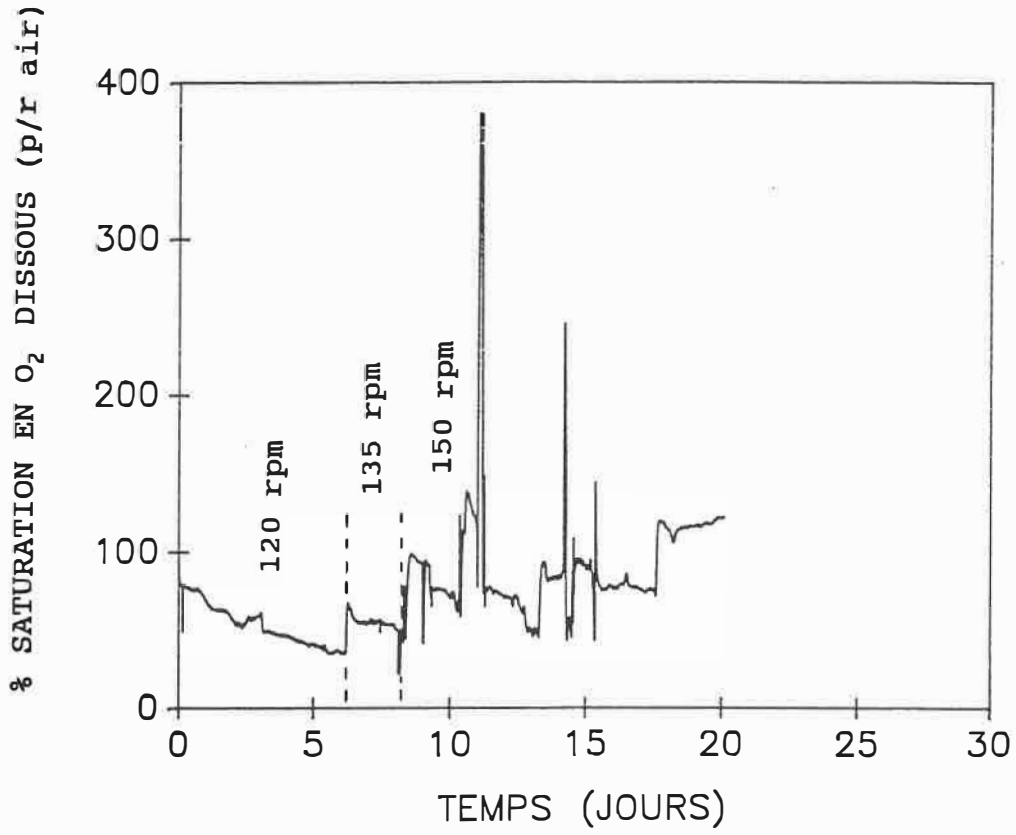


Figure 30 : Courbe de suivi de l'oxygène:
culture 2 en bioréacteur

stérilité ont été démontrées sur 30 jours de croissance consécutifs sans contamination.

Se basant sur ces résultats, trois autres cultures avec un contenu initial de 5% en sucrose ont été effectuées à une vitesse d'agitation de 120 rpm. Les résultats pour la culture 5 en bioréacteur ainsi qu'en flacon agité sont illustrées aux figures 31, 32, 33 et 34. Les résultats pour les cultures 3 et 4 étant similaires ont été regroupés en Annexe H.

Tous les résultats de croissance sont résumés au tableau 5. Le suivi du pH est illustré à la figure 35. La croissance rapide fut de type exponentielle. Le calcul du taux de croissance spécifique s'est fait à partir de régressions linéaires sur la zone de croissance exponentielle à partir du bilan sur le contenu cellulaire:

$$dx/dt = \mu \cdot x \qquad (16)$$

qui, une fois intégrée devient une fonction du premier ordre:

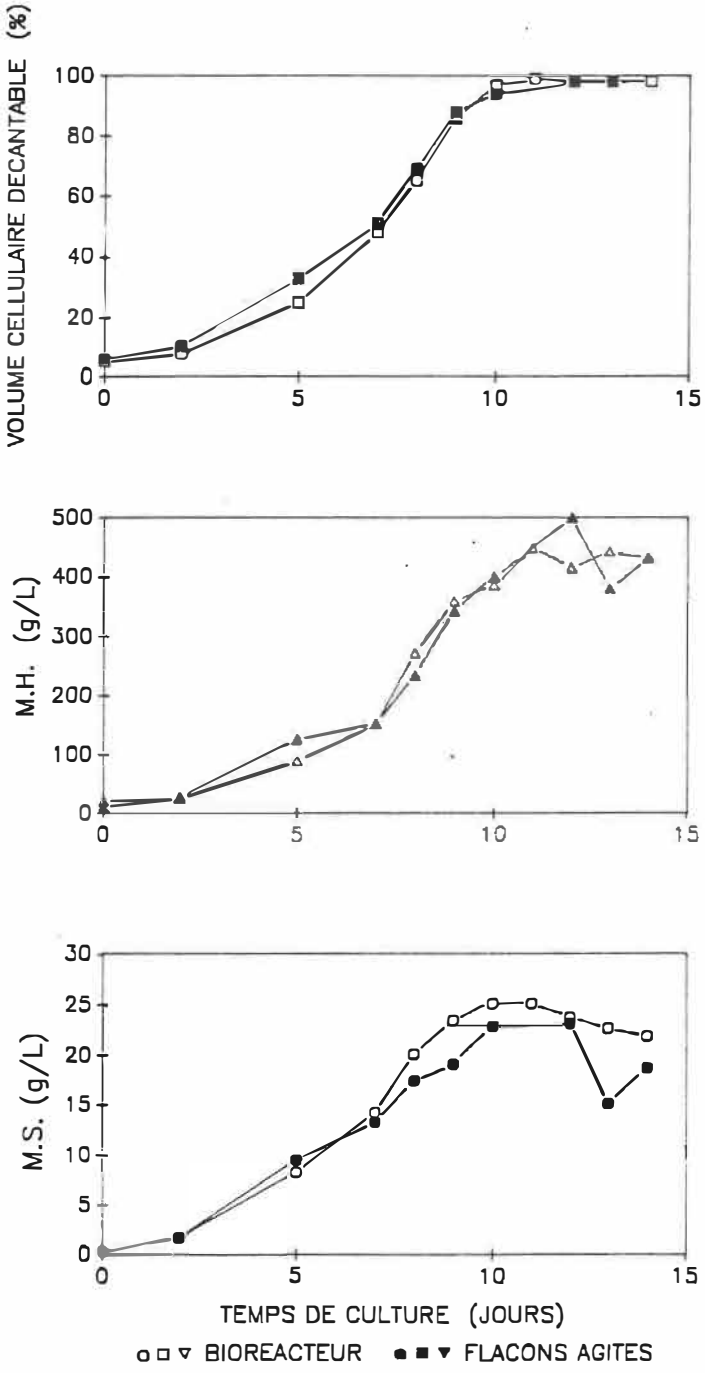


Figure 31 : Courbes de croissance: culture 5 en bioréacteur et flacon agité

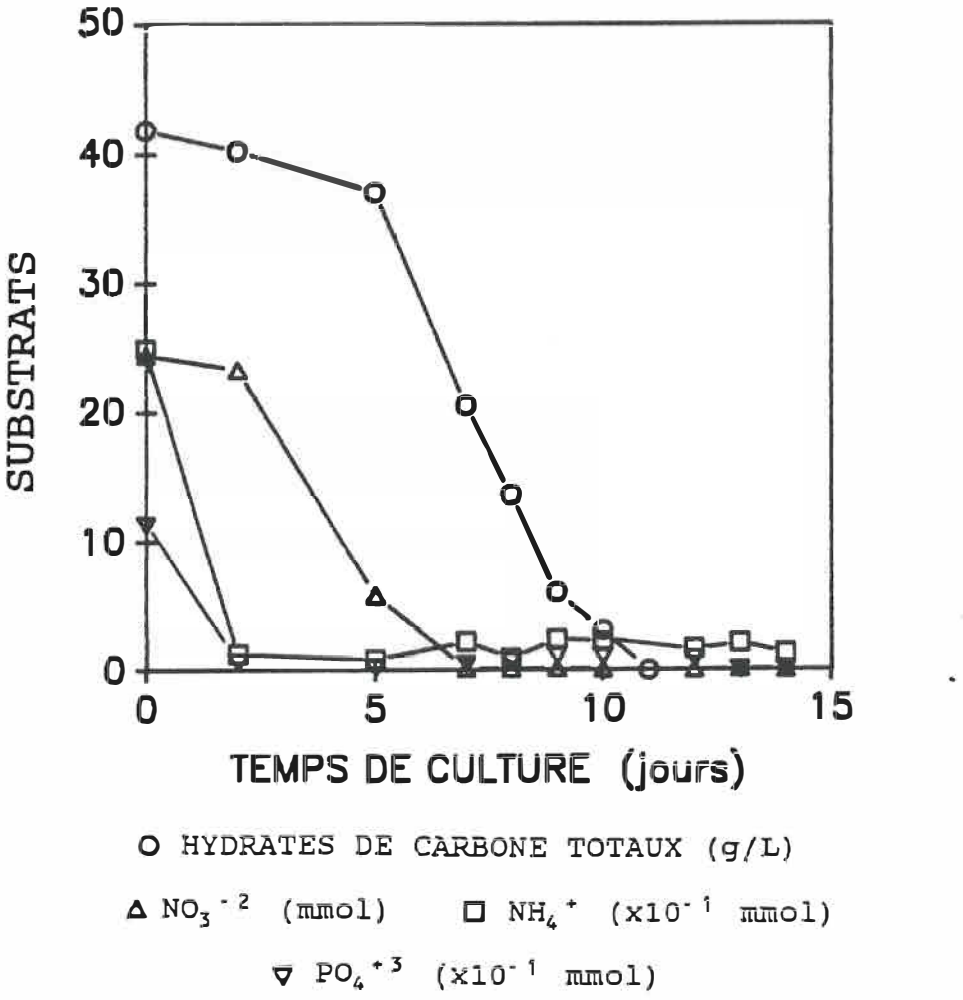


Figure 32 : Courbe de suivi des substrats:

culture 5 en bioréacteur

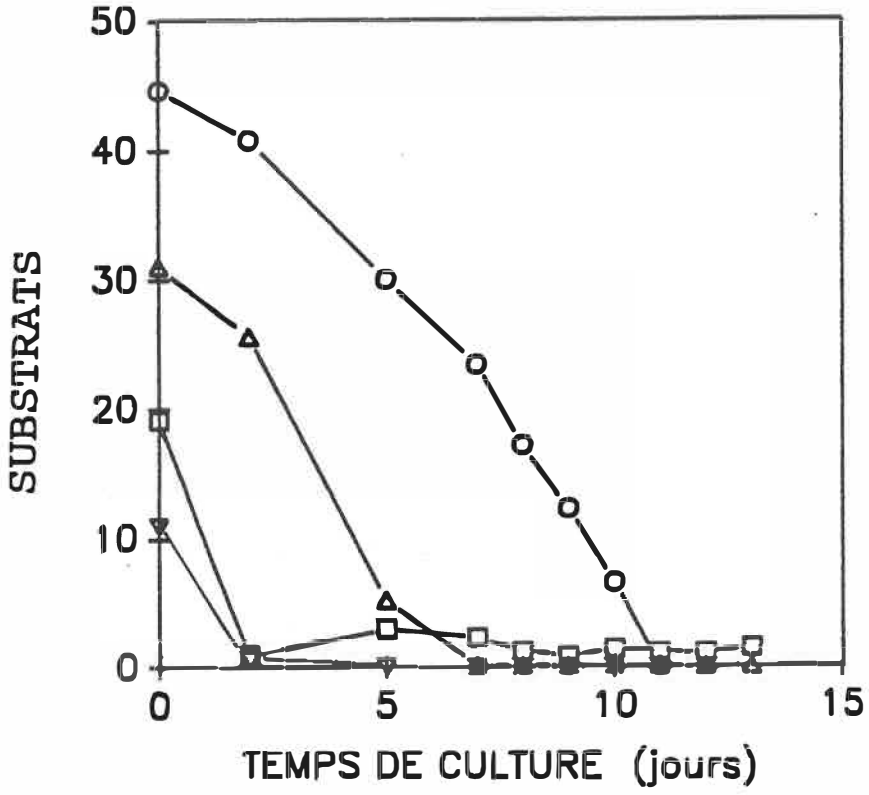


Figure 33 : Courbe de suivi des substrats:
culture 5 en flacon agité

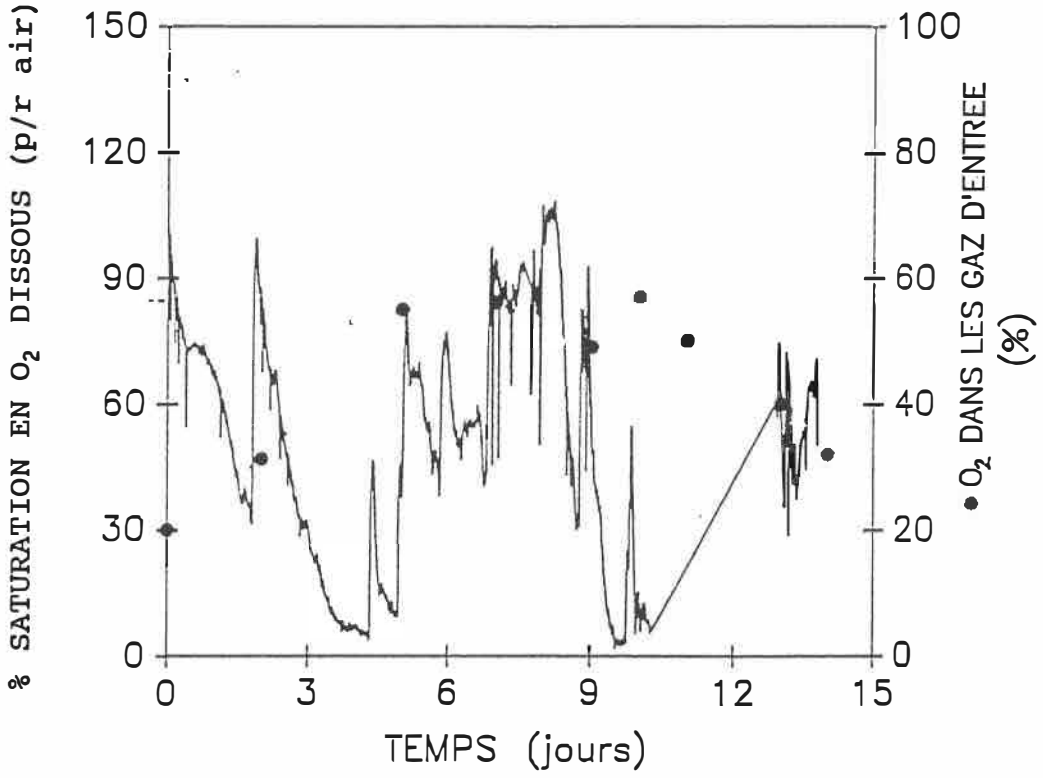


Figure 34 : Courbe de suivi de l'oxygène: culture 5 en bioréacteur

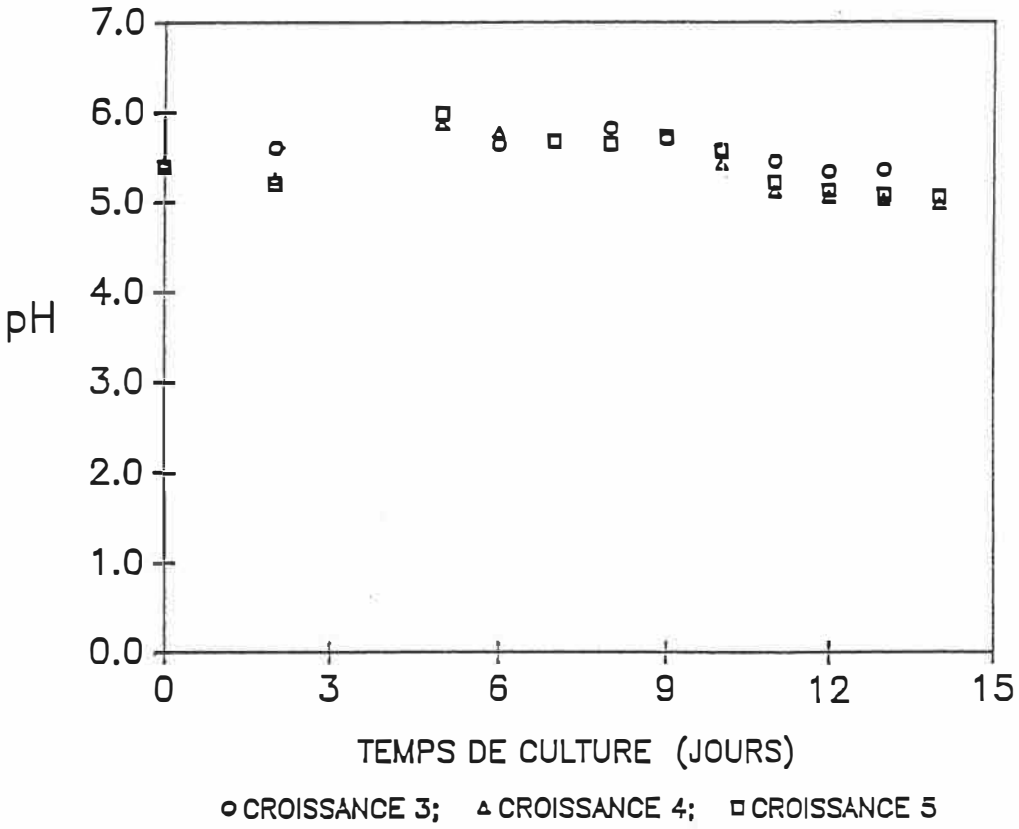


Figure 35 : Courbe de suivi du pH: cultures en bioréacteur

Culture	S_0 (%mass)	$Y_{X/S}$ (j^{-1}) (M.S.)	(M.H.)	Vol. (%)	μ (j^{-1})	tg (h)	r_{NO} (mmol)/(L·j)	r_S (g)/(L·j)
1 B.	1,97	0,56	10,9	--	0,42	39,9	5.9	3.4
3 B.	4,35	0,62	11,1	100	0,36	46,8	5.9	5.1
F.T.	4,50	0,50	10,7	98	0,40	41,6	5.6	4.8
4 B.	4,68	0,54	9,1	97	0,41	40,4	5.4	5.4
F.T.	4,46	0,57	8,8	92	0,44	37,8	5.7	7.7
5 B.	4,72	0,57	10,7	98	0,41	40,8	5.7	7.7
F.T.	4,55	0,52	10,4	96	0,42	39,6	5.8	5.6

B.: bioréacteur

F.T.: flacons agités témoins

Tableau 5 : Paramètres de croissance

$$\ln(x) = \ln(x_0) + \mu \cdot t \qquad (15)$$

$$\text{ou } \log(x) = \mu \cdot t/2.3 + \log(x_0) \qquad (16)$$

La valeur de taux de croissance a été évaluée avec un coefficient de corrélation (r^2) supérieur ou égal à

$$\ln(x) = \ln(x_o) + \mu \cdot t \qquad (17)$$

$$\text{ou } \log(x) = \mu \cdot t/2.3 + \log(x_o) \qquad (18)$$

La valeur de taux de croissance a été évaluée avec un coefficient de corrélation (r^2) supérieur ou égal à 0,97.

Il a été possible, grâce aux parois centrales en verre, de constater la circulation régulière des cellules aux rubans. Aucune zone morte n'a été décelée à la paroi.

Observées au microscope tout au long des croissances, les suspensions de cellules de Catharanthus roseus étaient composées d'une grande distribution de tailles allant des cellules uniques aux agrégats de plus de 20 cellules. Excepté pendant la phase de croissance stationnaire, peu de débris cellulaires ont été décelés. A ce stade, on a noté la présence de grosses cellules.

La facilité avec laquelle les cellules adhèrent aux surfaces a été constatée par le dépôt, dès les

premiers jours, d'une bande de cellules à la paroi de verre à la limite du vortex. Par la suite, avec la prise successive d'échantillons, la bande de cellules s'est élargie à mesure que le niveau de liquide a baissé. Les cellules déposées se sont alors mises à croître jusqu'à couvrir presque complètement la surface de verre qui surmonte le niveau de la suspension. Le tableau 6 présente l'importance du poids sec cellulaire issu de cette croissance sur les parois en proportion du contenu cellulaire total récolté en fin de culture.

Cultures	% du poids sec total de la suspension		
	paroi en verre	arbre de l'agitateur	total
3 4,5			
4	5,6	0,9	6,5
5	4,9	0,8	5,7

Tableau 6 : Importance de la croissance sur les parois non-mouillées du bioréacteur

Certaines appréhensions quant à l'effet des chicanes de surface se sont révélées justes: le gradient de pression entre le liquide en amont et en aval d'une chicane provoque des tourbillons générateurs de mousse. Celle-ci est stationnaire à l'arrière de la chicane (en aval de l'écoulement). La turbulence causée par la chute du liquide projeté des chicanes vers la région axiale produit aussi un peu de mousse qui colle tout autour de l'arbre de l'agitateur à la ligne de flottaison. Pour une vitesse d'agitation de 120 rpm la quantité de mousse a toujours été négligeable.

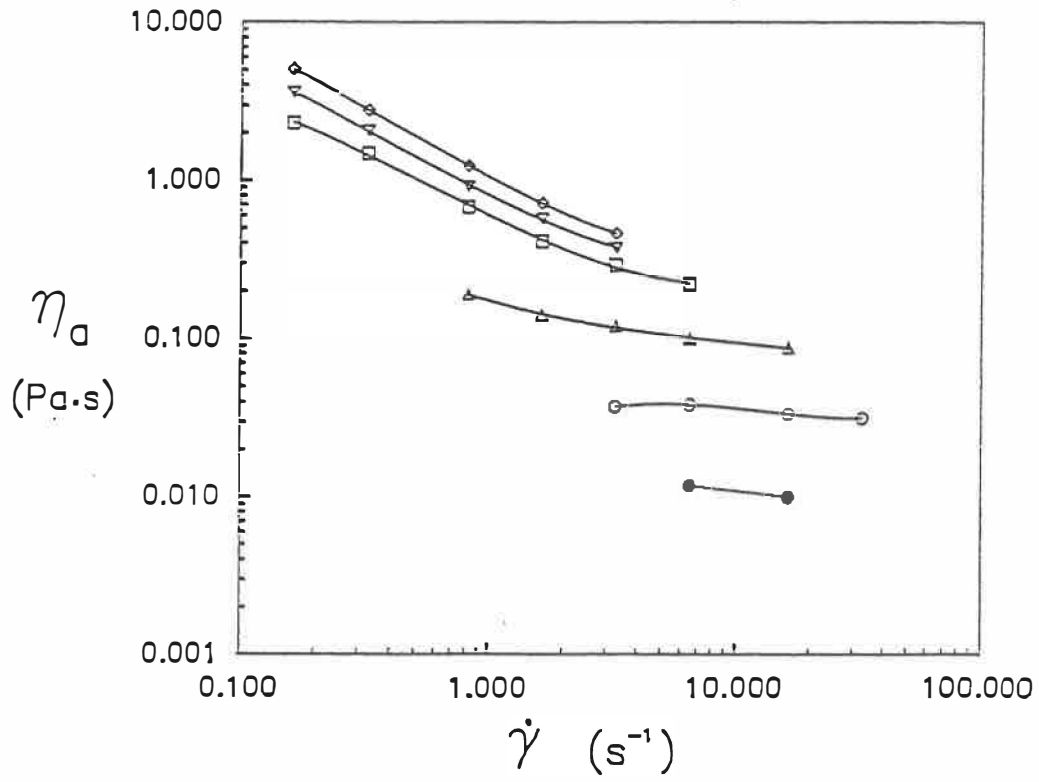
En fait la quantité de mousse a diminué avec l'augmentation progressive de la viscosité avec l'avancement de la croissance. Malgré ce point positif, l'apparition de la mousse en début de culture a entraîné des cellules hors du liquide qui ont réussit à se coller aux parois des chicanes (à l'arrière) ainsi qu'à l'arbre de l'agitateur. Ces cellules se sont développées et ont constitué une perte, car elles ne sont pas récupérables lors de la récolte de la suspension.

5.2.2. Suivi du comportement rhéologique

Avec l'accroissement de la concentration en cellules, la forte augmentation de la viscosité qui était prévue a été confirmée (figures 36 et 37). Les résultats des cultures 3 et 4 sont illustrés en Annexe H.

5.2.3. Evaluation du taux de consommation en oxygène: Qo_2

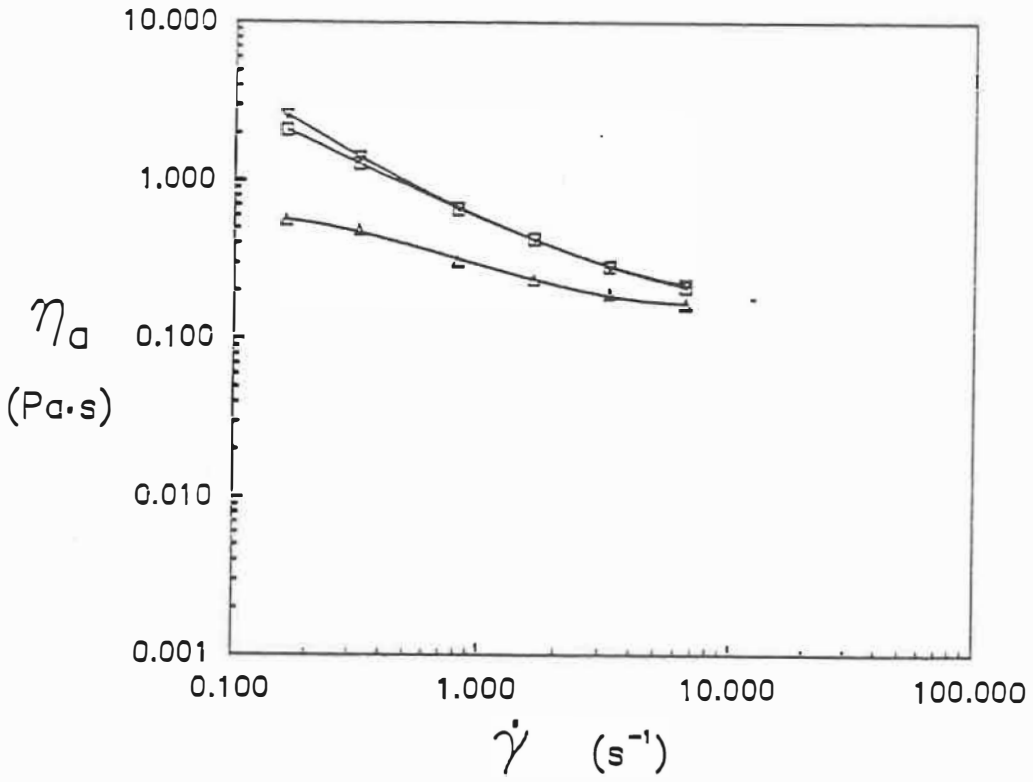
Le tableau 8 présente les valeurs expérimentales de Qo_2 après 6 et 14 jours de croissance des cultures 4 et 5. Ces temps de mesure semblaient les plus opportuns, car au sixième jour les cellules étaient au milieu de leur phase exponentielle, et le quatorzième jour correspondait à la phase de déclin. Une seule mesure fut entreprise au jour 6 afin de limiter les effets négatifs possibles dus aux variations brusques du niveau d'oxygène dissous sur les cellules. Le coefficient de corrélation des régressions linéaires a été de $r^2 = 0,99$ et plus pour l'ensemble des valeurs. Une courbe typique est présentée à la figure 38. Les courbes expérimentales se retrouvent en Annexe I.



●JOUR 8 2,00% M.S.; ○JOUR 9 2,35% M.S.; △JOUR 10 2,52% M.S.; □JOUR 11 2,51% M.S.

▽JOUR 13 2,25% M.S.; ◇JOUR 14 2,18% M.S.

Figure 36 : Courbe de viscosité: culture 5 en bioréacteur



▲JOUR 9 2,49% M.S.; □JOUR 11 2,14% M.S.; ▽JOUR 13 1,85% M.S.

Figure 37 : Courbe de viscosité: culture 5 en flacon agités

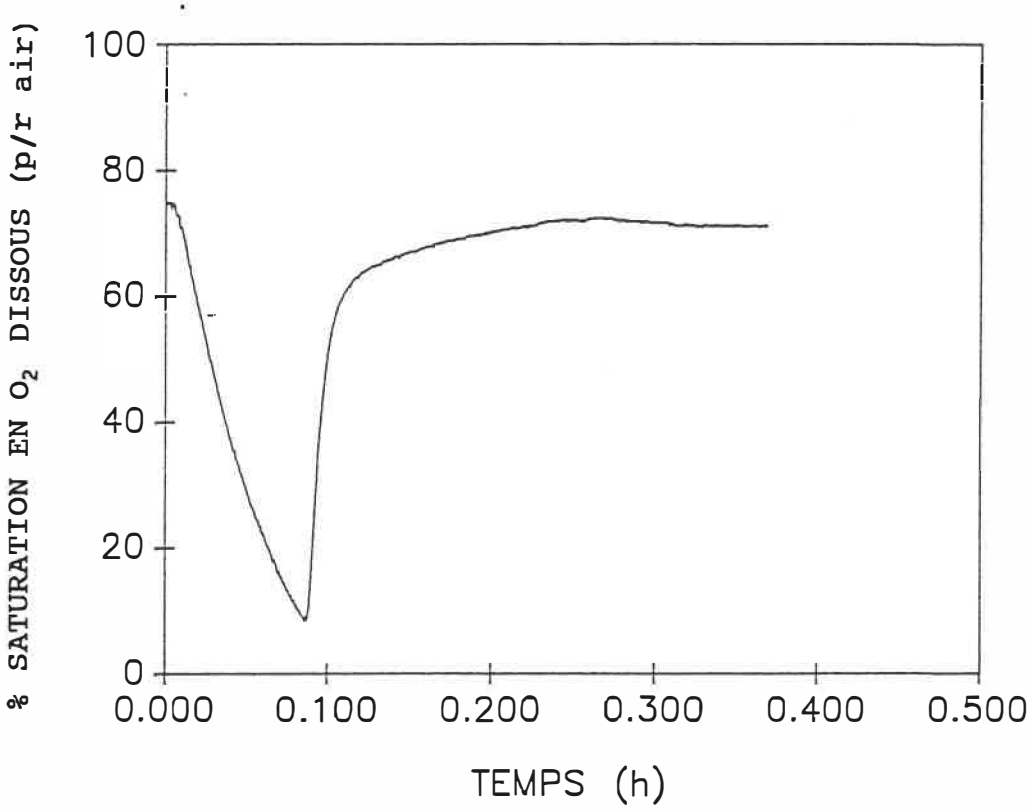


Figure 38 : Courbe d'évaluation du Qo_2 :
culture 4 en bioréacteur,
6ième jour

Croissance	Jour	Qo_2 (10^{-3} kgO_2 /kgM.S./h)
4	6	7,952
	14	2,271
		2,141
		2,152
		2,216
		2,061
		2,062
5	14	2,533
		2,591
		2,726

Tableau 7 : Taux de consommation en oxygène

5.3. Discussion sur les résultats de cultures

5.3.1. Rhéologie des suspensions cellulaires

Les courbes de viscosité montrent un caractère non-newtonien s'accentuant avec l'augmentation de la

concentration en cellules (figures 35, 36, H5, H10 et H11). Il s'agit d'un comportement rhéofluidifiant dont parlent plusieurs auteurs (3,13,14). On y voit que l'augmentation de viscosité n'est pas affectée par la diminution du contenu cellulaire en terme de matières sèches. Parallèlement à la disparition des sucres le ratio M.H./M.S. a augmenté pour les deux systèmes de culture (figures 31, H1 et H6). Drapeau et al. (12) expliquent ces résultats par une diminution progressive de la pression osmotique entraînant le gonflement des cellules. Ce phénomène qui peut aussi être associé à une différenciation cellulaire possible en phase stationnaire fait en sorte que les cellules sont de tailles plus volumineuses. C'est ce qui explique que le volume décantable ne diminue pas et qu'il en est de même pour la viscosité.

Proposant un modèle de type loi de puissance entre la viscosité et le taux de cisaillement:

$$\eta = m \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (1)$$

on obtient des paramètres du modèle montrant une évolution significative du comportement rhéologique lors des cultures (figures 39 et 40). L'augmentation du caractère rhéofluidifiant est très marqué: "n" passe de 1 (0 g M.S./L) à 0.1 (25 g M.S./L). La courbe pour l'indice de consistance "m" correspond aux résultats présentés par Tanaka (3) alors qu'il avait trouvé un indice du comportement en écoulement (n) relativement constant de 0,53. Cette divergence peut provenir de la différence entre les souches utilisées ainsi que de l'état physiologique des cellules (57).

5.3.2 Performances du bioréacteur

Bien que le niveau de cisaillement n'ait pas été mesuré dans le bioréacteur, plusieurs résultats indiquent qu'il ne fut pas destructif pour les cellules. Tout d'abord le pH est demeuré constant en fin de la période de croissance alors que plusieurs auteurs y ont noté une augmentation du pH (d'environ 6 à 6.3) (15) qu'ils ont associée à la lyse cellulaire et ainsi à la libération d'ions dans le milieu. De plus, MacCarthy et al. (56) ont noté que les concentrations en ions NH_4^+ et PO_4^{3-} augmentaient avec le phénomène de

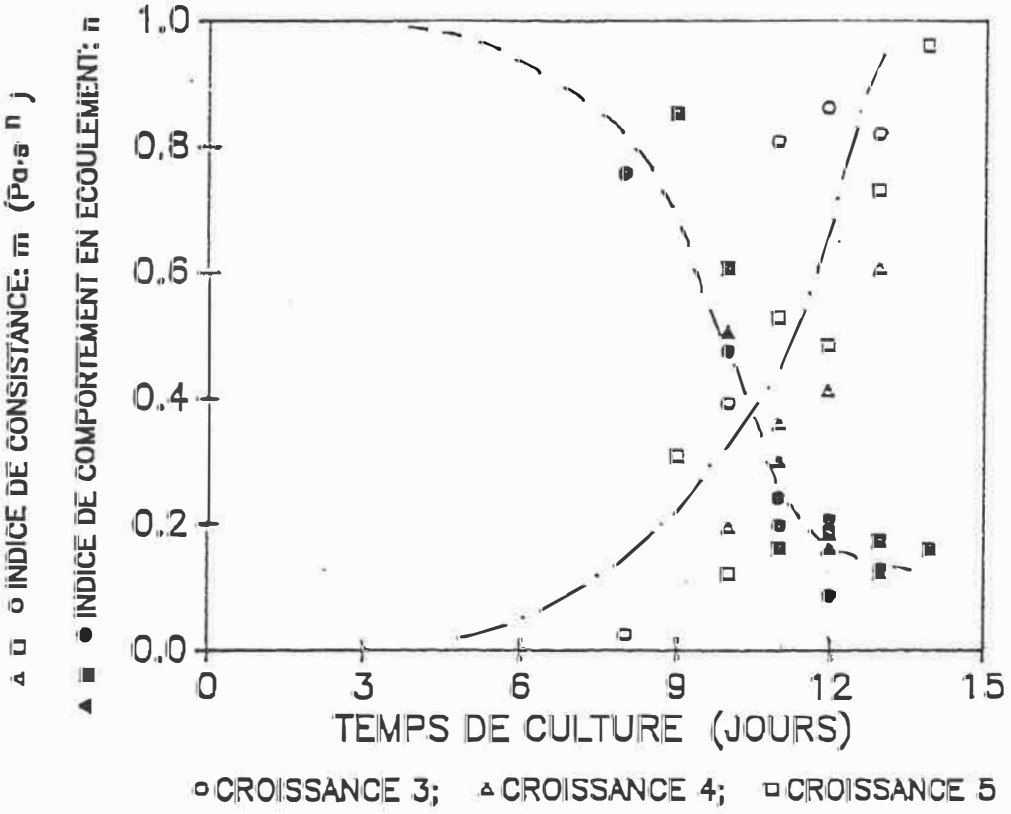


Figure 39 : Courbe de suivi des paramètres de la loi de puissance: cultures en bioréacteurs

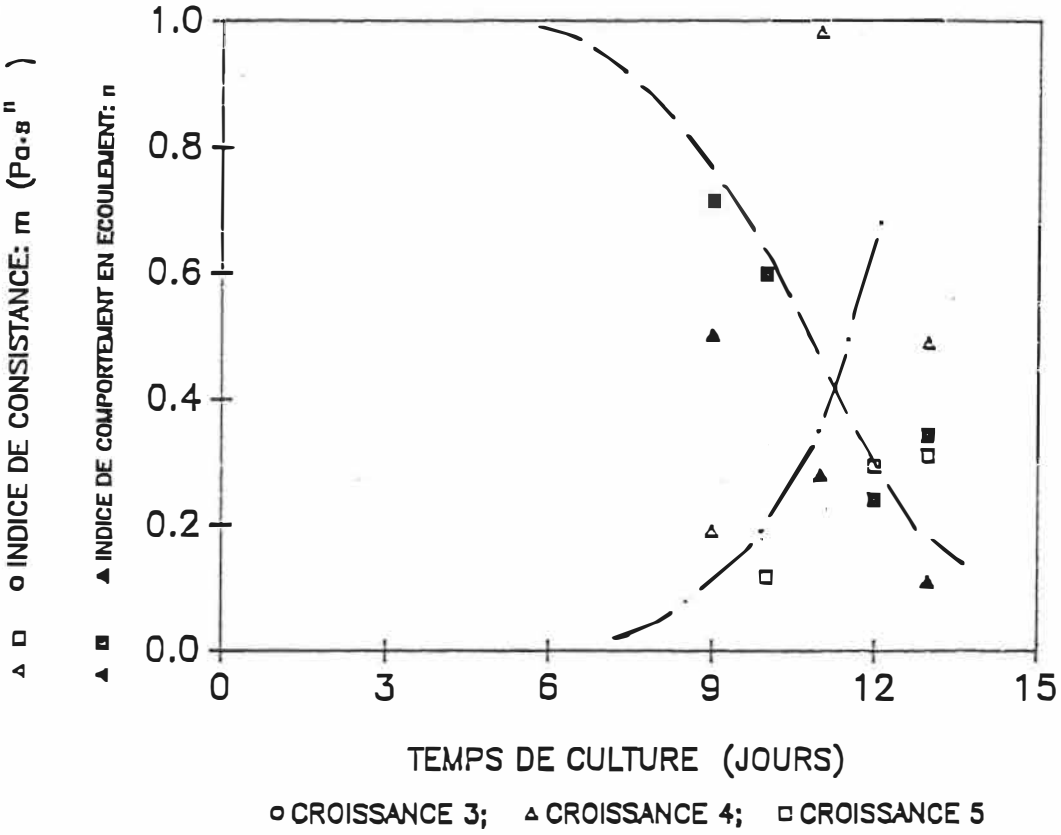


Figure 40 : Courbe de suivi des paramètres de la loi de puissance: cultures en flacons agités

lyse cellulaire ce qui n'a pas été observé dans notre étude. Les observations au microscope ont aussi montré des quantités de débrits cellulaires négligeables tant pour les cultures en bioréacteur qu'en flacons agités. Pour ces deux systèmes aucune diminution du contenu cellulaire en terme de poids sec ne fut observée avant l'épuisement des sucres (figures 31, H1 et H5) tel qu'observé par Scragg et al. (17) lors d'essais à cisaillement élevé (γ=297s^{-1} durant 5 min).

Pour des cultures de C. roseus, les taux de croissance cités dans la littérature varient avec les souches étudiées ainsi qu'avec les réacteurs utilisés. Pour des cultures en flacons agités, Snape et al. (50) ont montré que le taux de croissance augmente avec la période d'agitation d'environ de 7 à 15 g M.H./j pour des fréquences d'oscillation de 60 à 140 rpm. Ils expliquent ces résultats par l'augmentation du transfert d'oxygène. Pour ces raisons, les valeurs de taux de croissance permettent de comparer des systèmes de culture face à une lignée cellulaire. Examinant les valeurs expérimentales de taux de croissance, on doit d'abord remarquer la répétitivité des résultats (Tableau 5). De plus la culture #1 (s_o=2% sucrose) a

permis d'obtenir un taux de croissance similaire aux autres cultures plus concentrées en cellules: μ=0.42 j^{-1} contre de 0.36 à 0.41 j^{-1} malgré que cette culture ait atteint une concentration finale bien inférieure aux autres cultures (11 contre 27 g M.S./L). Les taux de croissance en bioréacteur et en flacons agités sont aussi similaires: de 0.36 à 0.42 j^{-1} contre de 0.40 à 0.44 j^{-1}. Les valeurs calculées selon les données en bioréacteur ne tiennent pas compte des cellules présentes sur les parois. Avec moins de 6.5% du contenu total final en terme de matières sèches les taux de croissance sont donc légèrement supérieurs aux taux calculés. Ils passent des valeurs déjà citées à de 0.38 à 0.44 j^{-1} si on considère que la croissance aux parois s'est effectuée en parallèle avec celle de la suspension.

Les taux d'assimilation des nitrates ont été similaires (≈5.7 mmol/L/j). Pour les hydrates de carbone de légères différences sont apparues entre les cultures mais aucune tendance ne peut être remarquée relativement au mode de culture.

Le bioréacteur conçu a démontré sa capacité de

produire des suspensions de haute densité avec un volume décantable de 100% ainsi qu'une concentration finale de 27 g M.S./L. Les systèmes montrant des performances similaires avec des cellules de C. roseus, tels les ballons agités par un barreau magnétique et aérés par bullage (26 g M.S./L) (26), semblent être difficilement extrapolables à l'échelle industrielle face à un taux de transfert d'oxygène suffisant.

5.3.3. Transfert d'oxygène

Maintenant une quantité négligeable de mousse tout au long des cultures, l'aération par la surface libre permet au bioréacteur de se démarquer de la plupart des bioréacteurs utilisés précédemment: "airlift" et tous les bioréacteurs aérés par bullage.

Au niveau du transfert d'oxygène la concentration en oxygène dissous a pu être facilement maintenue au-delà de la concentration critique citée de 10% de la saturation (4). Les points expérimentaux situés en-dessous de cette concentration (ainsi que les grandes fluctuations) viennent du fait que l'augmentation en oxygène des gaz d'entrée a été

effectuée manuellement et non par contrôle continu. Néanmoins un suivi tel qu'illustré à la figure 33 a permis d'observer au jour 4 le passage en situation de concentration critique en oxygène à partir d'environ 10% de la saturation en accord avec la littérature. Au-delà de cette concentration, on observe une diminution du taux de consommation en oxygène (un changement net de pente) alors que les cellules sont en phase de croissance rapide.

Tel que l'on s'attendait après les essais à froid (figures 22 et 23), une alimentation en air à la surface est devenue rapidement insuffisante. L'augmentation de la concentration en oxygène dans les gaz alimentés (jusqu'à 60% du total comparativement à 21% pour de l'air) a permis de maintenir des niveaux acceptables en oxygène dissous et a démontré la capacité de la configuration du bioréacteur développé à transférer l'oxygène à des taux suffisants.

Par un bilan sur l'oxygène dissous, des coefficients de transfert en oxygène de 8 et 4 h^{-1} ont été calculés aux jours 6 et 14 pour la culture 4 à partir des données de suivi de l'oxygène ainsi que des

taux de consommation en oxygène déterminés expérimentalement.

Au jour 6 la valeur de Qo_2 obtenue correspond aux valeurs présentées dans la littérature: soit $8x10^{-3}$ kg O_2/kg M.S./h contre de $4,8x10^{-3}$ (14) à $15x10^{-3}$ kg O_2/kg M.S./h (4) alors que les valeurs expérimentales du $14^{ième}$ jour, une moyenne de $2.3x10^{-3}$ kg O_2/kg M.S./h, sont plus faibles. Se situant au milieu de la phase de croissance exponentielle au jour 6, la valeur obtenue peut être considérée comme un estimé de la consommation maximale en oxygène. Des variations apparaissent dans la littérature dépendemment de la souche cellulaire utilisée ainsi que de l'état de croissance de la culture. Pour des étapes de croissance similaires Snape et al. ont noté une décroissance du Qo_2 d'un facteur 4.45 d'un maximum de 0.49 au jour 4 à 0.11 mmol O_2/g M.H./h au jour 14 (épuisement des substrats) pour une culture à 2% sucrose (50). Pour cette dernière raison il n'a pas été possible d'évaluer des valeurs de $k_L a$ à d'autres temps de culture.

Avec une concentration de 14 gM.S./L au $6^{ième}$ jour de la culture 4, les résultats des essais à

froid prédisaient plutôt un $k_L a$ d'environ 10 h^{-1}. Au jour 14 la concentration était de 21 gM.S./L correspondant à une valeur d'environ 5 $\cdot h^{-1}$ obtenue avec de l'agar granuleux. Les différences entre les valeurs expérimentales en culture et avec la suspension pseudo-cellulaire sont faibles compte tenu qu'il s'agissait d'une suspension modèle. Aussi la baisse de niveau entraînée par la prise successive d'échantillons a diminué l'efficacité des chicanes.

CONCLUSIONS

Cette étude a porté sur la conception ainsi que l'essai de performance d'un nouveau bioréacteur pour la culture en suspension à haute densité de cellules de plantes. Dans le but de tenir compte de la haute sensibilité des cellules au cisaillement et d'assurer l'homogénéité de la suspension, un agitateur à ruban hélicoïdal double a été utilisé. Voulant éviter la production de mousse, une aération par la surface libre seulement a été imposée.

L'agar granuleux en suspension dans de l'eau distillée fut choisi comme système pseudo-cellulaire afin de vérifier les performances du bioréacteur modèle. Des mesures rhéologiques ont démontré la similarité de viscosité ainsi que de volume décantable entre l'agar et des suspensions de C. roseus cultivées en flacons agités pour une plage de concentrations allant jusqu'à 30 g M.S./L. Pour les mesures de viscosité, on a développé et caractérisé un agitateur à ruban hélicoïdal simple qui a été couplé à un rhéomètre Brookfield. Ces mesures ont démontré le caractère rhéofluidifiant d'une suspension d'agar granuleux ainsi

qu'une augmentation rapide de la viscosité à partir d'une concentration pseudo-cellulaire de 10 g M.S./L. La similarité a aussi été démontrée au niveau de la distribution de tailles (de 5 à 375 μm) ainsi que du volume décantable face au poids sec. Pour les deux systèmes, un volume décantable de 100% a été atteint pour une concentration cellulaire au-delà de 25 g M.S./L.

L'étude à froid du bioréacteur modèle a fait ressortir que:

- l'agitateur produit un vortex dont la hauteur augmente avec la vitesse et est supérieure pour une rotation en sens anti-horaire (pompage vers le haut aux rubans) et diminue avec l'augmentation du contenu en pseudo-cellules;

- l'homogénéité axiale est maintenue en présence d'agar pour des vitesses d'agitation supérieures à 60 rpm;

- le mélange en présence d'eau uniquement se produit en deux étapes, une rapide et une lente, sauf en présence de chicanes de surface et avec une rotation en sens

anti-horaire (pompage vers le haut aux rubans);

- sans les chicanes, le nombre de rotations nécessaires à l'homogénéisation est constant face à la vitesse et égal à 48, peu importe le sens de rotation;

- la présence d'un fond profilé abaisse cette valeur à 36;

- l'action des chicanes de surface est fonction de la vitesse: M passe de 17 à 11,25 (rotation anti-horaire) et de 20 à 16,25 pour des vitesses respectives de 120 et de 150 rpm;

et lors des mesures du coefficient de transfert de l'oxygène ($k_L a$):

- en absence de chicanes, le $k_L a$ est insuffisant pour toute la plage de concentration en agar granuleux (en deçà de 1,5 h^{-1} à 60 et 90 rpm, de 3 à 5 h^{-1} pour des vitesses de 120 à 150 rpm);

- la longueur des chicanes est très significative sur le $k_L a$: plus elles sont longues et qu'elles utilisent

le fluide vorticiel, plus leur action est important sur le transfert d'oxygène;

- en présence de chicanes de 10 cm de longueur par 8 cm de hauteur, une rotation en sens anti-horaire a produit des valeurs de $k_L a$ supérieures à une rotation horaire;

- pour une déviation de l'orientation radiale des chicanes de 10 à 30° aucun effet de l'angle sur le $k_L a$ n'a été décelé.

On a aussi observé que malgré le rôle positif des chicanes de surface, le $k_L a$ a chuté avec la concentration en agar jusqu'à atteindre les valeurs sans chicanes.

Un modèle a été proposé pour relier le temps de mélange global dans l'eau au $k_L a$:

$$k_L \cdot a \approx \frac{4}{D}\sqrt{\frac{D_{O2} \cdot (n_s + 1/\pi)}{\pi}}\ (t_m)^{-1/2}$$

Le $k_L a$ ainsi que la concentration en pseudo-cellules ont été reliées à la puissance

consommée à l'agitateur. Son comportement a concordé avec les courbes de viscosité; une tendance du $k_L a$ a être indépendant de la puissance pour des concentrations pseudo-cellulaires supérieures à 1,22% M.S..

En approximation du potentiel de mise à l'échelle du bioréacteur un volume maximum de 102 L a été calculé pour des ratios géométriques constants et une alimentation en oxygène pur des gaz alimentés.

Suite à ces résultats un bioréacteur fut construit pour la culture en suspension de cellules de plantes avec une aération par la surface libre uniquement. Les cultures effectuées avec des cellules de C. roseus ont démontrées que:

- les croissances en bioréacteur sont similaires à celles observées en flacons agités et convergent vers une valeur moyenne du taux de croissance de 0,41 j^{-1};

- le rendement cellulaire a été similaire pour les cultures en bioréacteur (27 g M.S./L) et en flacon agité (26 g M.S./L) et le bioréacteur conçu a démontré

sa capacité de mener à de hautes densités cellulaires par l'atteinte d'un volume décantable de 100% du volume total;

- le cisaillement entraîné par l'agitation mécanique ainsi que par la présence de chicanes a provoqué un niveau de bris cellulaire négligeable et similaire aux cultures en flacons agités;

On a aussi prouvé au travers ces cultures que par un apport d'appoint en oxygène dans les gaz alimentés au besoin, l'aération de surface réussi à transférer de l'oxygène à la suspension cellulaire à un taux suffisant.

RECOMMANDATIONS

Suite à l'étude de comportement du bioréacteur modèle, nous recommandons:

- de poursuivre les mesures de temps de mélange pour des suspensions concentrées en agar afin de pouvoir vérifier la relation obtenue entre le $k_L a$ et t_m ;

- de caractériser l'écoulement en systèmes concentrés en agar ainsi que d'en évaluer la qualité de mélange.

- d'étudier le rôle des chicanes et le niveau de cisaillement qu'elles imposent aux cellules.

Lors de cultures de cellules de plantes en bioréacteur:

- un suivi du couple à l'agitateur permettrait d'estimer l'évolution du contenu en cellules et ainsi d'éviter la prise systématique d'échantillons réduisant le volume de suspension et ainsi l'efficacité des

chicanes de surface;

- les besoins en oxygène pur (enrichissant les gaz alimentés) pourraient être réduits en agitant à des vitesses supérieures (<150 rpm afin d'éviter une production de mousse) et en augmentant la pression dans le bioréacteur (<200 kPa);

- un contrôle de l'oxygène dissous est nécessaire;

- il est aussi recommandé d'interchanger les ports de sonde à oxygène et d'échantillonnage afin de permettre à l'utilisateur de prélever des échantillons sans encombrement.

Le potentiel du bioréacteur à permettre la culture de plusieurs catégories de cellules de plantes doit être vérifié:

- par la culture de suspensions de cellules qui atteignent des viscositées très élevées telles des suspensions de cellules de Nicotiana tabacum ou qui sont sensibles au cisaillement telles les suspensions de cellules de Sanguinaria canadensis, cellules

problématiques pour la majorité des bioréacteurs commerciaux

Suite à deux cultures réussies de cellules d'insectes (S.F.9) à titre exploratoire (non mentionnées dans ce Mémoire) le bioréacteur conçu se doit d'être considéré pour la culture de cellules fragiles posant des problèmes aux bioréacteurs conventionnels.

REFERENCES

1. SAHAI, O. et KAATH, M., "Commercializing plant tissue culture processes: economics, problems and prospects", Biotechnol. Prog., 1, No.1, 1-9 (1985).

2. CURTIN, M.E., "Harvesting profitable products from plant tissue culture", Biotechnol., 649-659 (Octobre 1983).

3. TANAKA, H., "Some properties of pseudocells of plant cells", Biotechnol. Bioeng., 24, 2591-2596, (1982).

4. PAREILLEUX, A. "Technologie et stratégies de mise en oeuvre des cultures en masse de cellules végétales", Ann. Pharm. Fr., 45, No. 2, 155-162, (1987).

5. PETIARD, V., "La culture végétale in vitro: originalité et utilisations", Ann. Pharm. Fr., 45, No.2, 111-119, (1987).

6. FOWLER, M.W., "The large-scale cultivation of plant cells", Prog. Ind. Microbiol., 16, 207-229, (1982).

7. SMART, N.J. et FOWLER, M.W., "Mass cultivation of Catharanthus roseus using a monmechanically agitated bioreactor", Appl. Biochem. Biotechnol., 9, 209-216, (1984).

8. SCRAGG, A.H., ALLAN, E.J. et LECKIE F., "Effect of shear on the viability of plant cell suspensions", Enzyme Microbiol. Technol., 10, 361-367, (1988).

9. GAMBORG, O.L., "Callus and cell culture", Chapitre 1, Plant tissue culture methods, Second Revised Edition, L.R. Wetter and F. Constabal Editeurs, National Research Council of.Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatchewan, (1987).

10. TANAKA, H., "Oxygen transfer in broths of plant cells at high density", Biotechnol. Bioeng., 24, 425-442, (1982).

11. HEGARTY, P.K., SMART, N.J., SCRAGG, A.H.et FOWLER, M.W., "The aeration of Catharanthus roseus L.G.D. on suspension cultures in airlift bioreactors: the inhibitory effect at high aeration rates on culture growth", J. Exp. Bot., 37, No. 185, 1911-1920, (1986).

12. DRAPEAU, D., BLANCH, H.W., et WILKE, C.R., "Growth kinetics of Dioscorea deltoidea and Catharanthus roseus in batch culture", Biotechnol. Bioeng., 28, 1555-1563, (1986).

13. COURTOIS, D.et GUERN, J., "Temperature response of Catharanthus roseus cells cultivated in liquid medium", Plant Sci. Lett., 17, 473-482, (1980).

14. TANAKA, H., "Large-scale cultivation of plant cells at high density: a review", Process Biochem., (August 1987).

15. WAGNER, F. et VOGELMANN, H., "Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites", Plant tissue culture and its biotechnological application, BURY, W.,

REINHART, E. et ZENK, V.H., Springer-Verlag, New York, 245-252, (1977).

16. KATO, A., KAWAZOE, S. et SOH, Y., "Viscosity of the broth of tobacco cells in suspension culture", J. Ferment. Technol., 56, No.3, 224-228, (1978).

17. SCRAGG, A.H., ALLAN, E.J., BOND, P.A. et SMART, N.J., "Rheological properties of plant cell suspension cultures", Cambridge University Press, Cambridge (U.K.), (1986).

18. TANAKA, H., SEMBRA, H., JITSUFUCHI, T. et HARADA, H., "The effect of physical stress on plant cells in suspensions cultures", Biotechnol. Lett., 10, No.7, 485-490, (1988).

19. PAYNE, G.F., SHULER, M.L. et BRODENIUS, P., "Large scale plant cell culture", B.K. Lydersem, Hanser Publish., Munick, (1987).

20. BAILEY, J.E., et OLLIS, D.F., "Biochemical Engineering fundamentals", 2e édition, McGraw Hill, (1986).

21. MARTIN, S.M., "Plant tissue culture as a source of biochemicals", Chap. 6, "Environmental factors: Temperature, aeration and pH", Staba, E.J. Edit., CRC Press, Florida (USA), 144-145, (1980).

22. SMART, N.J. et FOWLER, M.W., "An airlift bioreactor suitable for large-scale cultivation of plant cell suspensions", J. Exp. Bot., 35, No. 153, p.531-537, (1984).

23. Maurel, B., Pareilleux, A., "Effect of carbone dioxide on the growth of cell suspensions of Catharanthus roseus", Bitech. Letters, 7, No. 5, 313-318, (1985).

24. KATO, A., SHIMIZU,Y. et NAGAI S., "Effect of initial $k_L a$ on the growth of tobacco cells in batch cultures", J. Ferment. Technol., 53, No.10, 744-761, (1975).

25. WILSON, S.B., KING, P.J. et STREET, H.E., "Studies on the growth in culture of plant cells", J. Exp. Bot., 22, No. 70, 177-207, (1971).

26. VELIKY, I.A., et MARTIN, S.M., "A fermenter for plant cell suspension cultures", Can. J. Microbiol., 16, 223-226, (1970).

27. PAREILLEUX, A. et VINAS, R., "A study on the alkaloid production by resting cell suspensions of Catharanthus roseus in a continuous flow reactor", Appl. Microbiol. Biotechnol., 316-320, (1984).

28. MARTIN, S.M., "Mass culture systems for plant cell suspension", Plant tissue cultures as a source of biochemicals, chapitre 7, Staba, E.J. Edit., CRC Press, Florida (USA), 149-166, (1986)

29. KATO, A., KARVAZOE, S., MASAHAM, I. et SHIMIZU, Y., "Continuous culture of tobacco cells", J. Ferment. Technol., 54, No.2, 82-87, (1976).

30. PIEHL, G.-W., BERLIN, J., MOLLENSCHOTT, C. et LEHMANN, J., "Growth and alkaloid production of a cell suspension culture of Thalictrum rugosum in shake flasks and membrane-stirrer reactors with bubble free aeration ", Appl. Microbiol. Biotechnol., No. 29, 456-461, (1988).

31. TANAKA, H. "Technological problems in cultivation of plant cells at high density", Biotechnol. Bioeng., 23, 1203-1218, (1981).

32. ULBRICH, B., WIESNER, W. et ARENS, H., "Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell culture of Coleus blumei Benth", "Primary and secondary metabolism of plant cell cultures", Ed. by Neumann et al., Spring-Verlag, Berlin, (1985).

33. FOWLER, H.W., "Process systems and approches for large scale plant cell culture", Plant Biol., 3, 459-471, (1982).

34. CHAPMAN, C.M., NIENOW, A.W. et MIDDLETON, J.C., "Surface aeration in a small, agitated and sparged vessel", Biotech. and Bioengineering, 22, 981-993, (1980).

35. TANAKA, H., NISHIJIMA, F.,SUWA, M. et IWAMOTO, T., "Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures", Biotechnol. Bioeng., 25, 2359-2370, (1983).

36. HU, W.S. et WANG, D.I.C., "Mammalian cell technology", "Mammalian cell culture technology: a review from an engineering perspective", Thilly W.G. Edit., Butterworths, 167-197, (1986).

37. SU WEI-WEN, HUMPHREY, A.E., Studies on the different oxygenation methods for enhencing oxygen transfer in high cell density tissue cultures, 1989 AIChE Annual Meeting, Nov. 9, San Francisco (CA), (1989)

38. SMART, N.J. et FOWLER, M.W., "Effect of aeration on large-scale cultures of plant cells", Biotechnol. Lett., 3, No. 4, 171-176, (1981).

39. SMART, N.J., BARNARD, J.A., FOWLER, M.W., "Mass cultivation of plant cells using air-lift systems", Second European Congress of Biotechnology, Eastbourne (England), (1981).

40. FUKUSHIMA, S. et UYAMA, A., "Cocurrent bubble column with sintered plate for incubation of plant-tissue culture", J. Chem. Eng. Jap., 16, No. 6, 531-533, (1983).

41. THOMAS, N.H.et JANES, D.A., "Fluid dynamic considerations in airlift and annular vortex bioreactor for plant cell culture", Ann. New York Acad. Sci., 506, 171-188, (1987).

42. MOO-YOUNG, M., TICHAR, K., et DULLIEN, F.A.L., "The blending efficiencies of some impellers in batch mixing", AIChEJ., 18, No.1, 178-182, (1972).

43. JOHNSON, R.T., "Batch mixing of viscous liquids", IEC Process Des. Dev., 6, No.3, 340-345, (1967).

44. COYLE, C.K., HIROCHLAND, H.E., MICHEL, B.J. et OLDSHUE, J.Y., "Mixing in viscous liquids", AIChEJ., 16, No.6, 903-906, (1970).

45. NAGATA, S., NISHIKAWA M., TADA, H. et GOTOH, S. "Power consumption of mixing impellers in pseudoplastic liquids", J. Chem. Eng. Jap., 4, No.1, 72-76, (1971).

46. CARREAU, P.J., PATTERSON, I. et YAP, C.Y., "Mixing of viscoelastic fluids with helical ribbon agitators", Can. J. Chem. Eng., 54, 135-142,

(1976).

47. YAP, C.Y., "Mixing of viscoelastic fluids with helical ribbon agitators", Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique, Montréal, (1976).

48. TAKAHASHI, K. YOKOTA, T. et KONNO, H., "Mixing of pseudoplastic liquid in a vessel equipped with a variety of helical ribbon impellers", J. Chem. Eng. Jap., 21, No.1, 63-68, (1988).

49. MOSER, A., Bioprocess technology, kinetics and reactors, Springer-Verlag, New-York, (1981).

50. SNAPE, J.B., THOMAS, N.W., CALLOW, J.A., HOW suspension cultures of Catharanthus roseus respond to oxygen limitation: small-scale tests with applications to larger scale cultures, Biotechnol. Bioeng., 34, 1058-1062, (1989).

51. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 16^{e} éd., pp. 437-438, (1985).

52. WEATHERBURN, M.W., "Phenol-hypochlorite for determination of ammonia", Anal. Chem., 38, No. 8, 971-974, (1980).

53. YAP, C.Y., PATTERSON, W.I. et CARREAU, P.J., "Mixing with helical ribbon agitators; Part III: Non-newtonian fluids", AIChEJ., 25, No.3, 516-521, (1979).

54. CHUDACEK, M.W., "Does your tank bottom have the right shape?", Chem. Eng., 79-83, (Octobre 1984).

55. HOOGENDOORN, C.J. et DEN HARTOG, A.P., " Model studies on mixers in the viscous flow region", Chem. Eng. Sci., 22, 1689-1699, (1967).

56. NAGATA, S., YANAGMOTO, M. et KODOYAMO, T., Chem. Eng. Jap., 21, 278, (1957).

57. CRC: Critical reviews in biotechnology, "Non-newtonian fermentation systems", Vol. 4, No. 2, CRC Press, pp. 133-185, (1986).

58. ZRYD, J.-P., "Culture de cellules, tissus et organes végétaux", Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, (1988).

59. MITARD A. et RIBA, J.P., "Rheological properties of Aspergillus niger pellet suspensions", Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 245-249, (1986).

60. REUSS, M., DEBUS, D. et ZOLL, G., "Rheological properties of fermentation fluids", German Biochem. Eng., 233-236, (1982).

61. METZNEER, A.B. et OTTO, R.E., "Agitation of non-newtonian fluids", AIChEJ., 3, 3, (1957)

62. MAGNUSSON, K., "Agitators for viscous liquids and two-phase systems", IVA, 23, NO.2, 86, (1952).

63. ULBRECHT, J.J. et CARREAU, P., "Mixing of viscous non-newtonian liquids", in Mixing of liquids by mechanical agitation, Editeurs J.J. Ulbrecht et G.K. Patterson, Gordon and Breach Science Publishers, (1985).

64. HALL, K.R., GOGGREY, J.C., Trans. Instn. Chem. Engrs., 48, 201, (1970).

ANNEXE A

PREPARATION DES REACTIFS ET DESCRIPTION DE LA METHODE DE COLORATION ET DE DECOLORATION

La coloration du liquide est obtenue suite à l'addition de 1,08 mL d'une solution d'amidon ainsi que de 0,54 mL d'une solution d'iode 2N par litre de liquide. Le liquide prend alors une couleur bleu foncé.

La solution d'amidon est préparée en ajoutant 4 g d'amidon d'abord à quelques millilitres d'eau pour former une pâte qui est ajoutée à 100 mL d'eau bouillante. Le mélange doit être porté à ébullition durant une minute.

La solution d'iode s'obtient par dissolution progressive dans 100 mL d'eau distillée, à l'aide d'un mortier, de 25,4 g de cristaux d'iode et de 80 g de KI_3. Le mélange doit être filtré à la laine de verre puis reposé 12 h.

La décoloration est produite par l'addition de 1,51 mL d'une solution 1N de thiosulfate de sodium ($5H_2O$) par litre de liquide. Une réaction d'oxydo-réduction se produit:

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

ANNEXE B

TEMPS DE REPONSE DES SONDES A OXYGENE

Les sondes utilisées (YSI et Ingold) ont été caractérisées par la même méthode. Celle-ci nécessite deux bassins: soit un premier dans lequel un bullage d'azote maintient des conditions d'anaérobie et un deuxième gardé saturé en oxygène par un bullage permanent en air. Du bassin sans oxygène, l'électrode est rapidement transférée dans le deuxième. Le temps nécessaire pour atteidre une lecture à l'électrode de 67% de la saturation correspond au temps caractéristique de l'électrode. Tel qu'illustré par les courbes expérimentales présentées aux figures B1 et B2 les résultats suivants ont été obtenus.

sondes	temps de réponse (s)
YSI	8
Ingold	17

Tableau B1 : Temps de réponse des sondes à oxygène

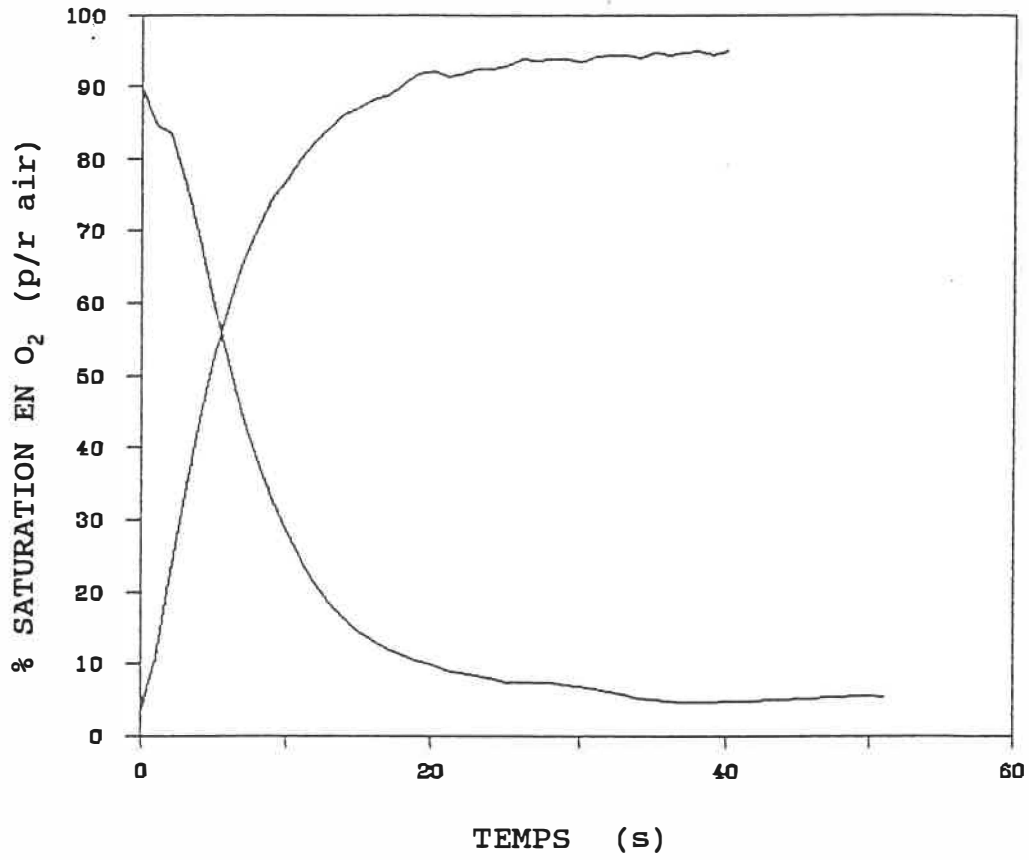


Figure B1 : Courbe de réponse de la sonde à oxygène YSI

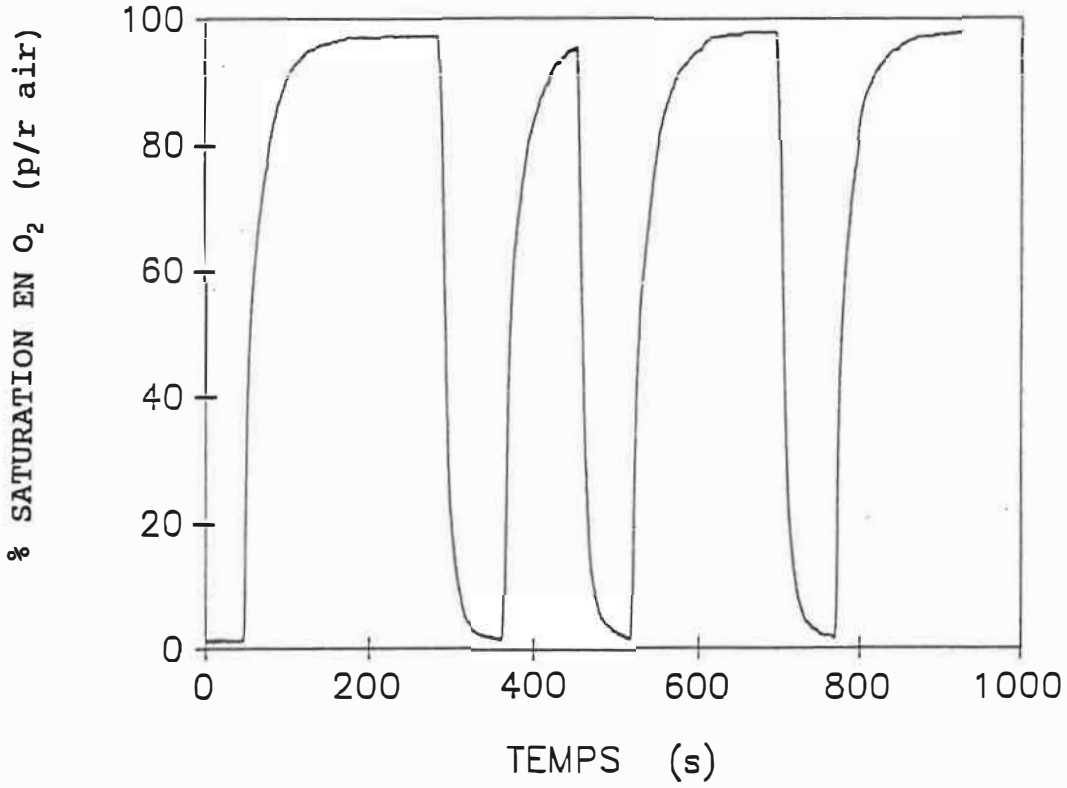


Figure B2 : Courbe de réponse de la sonde à oxygène Ingold

ANNEXE C

PLANS TECHNIQUES DU BIOREACTEUR

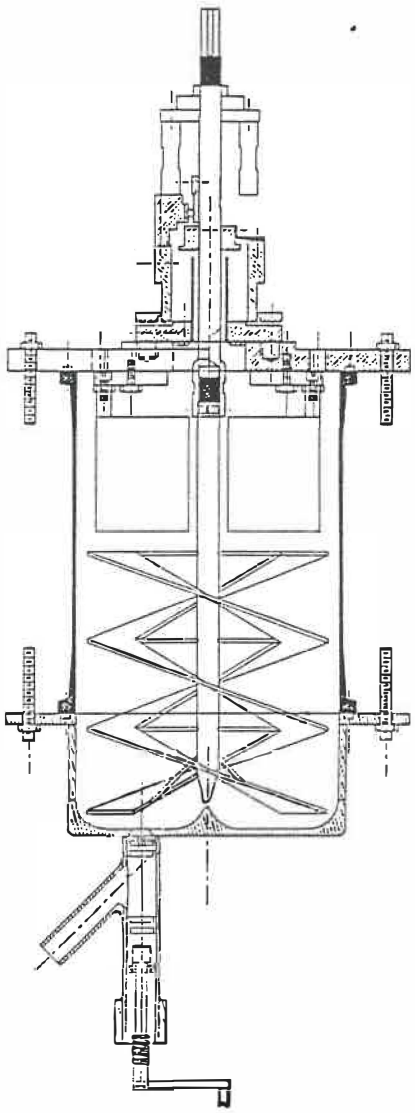


Figure C1 : Bioréacteur de croissance

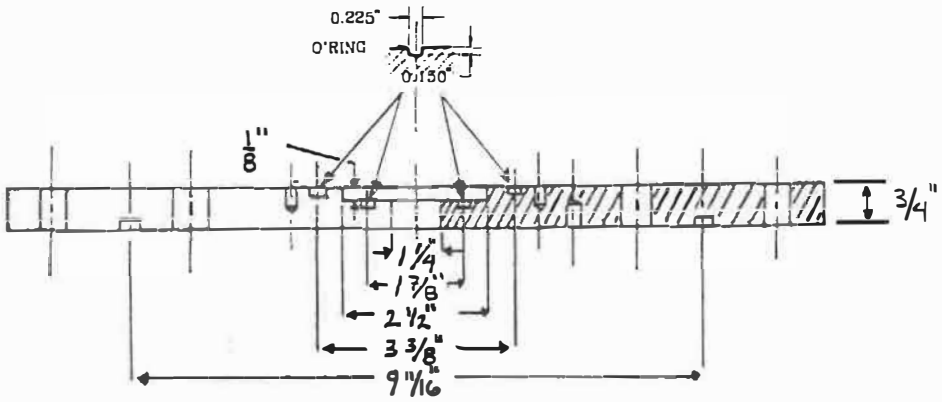


Figure C2a: Vue de coupe

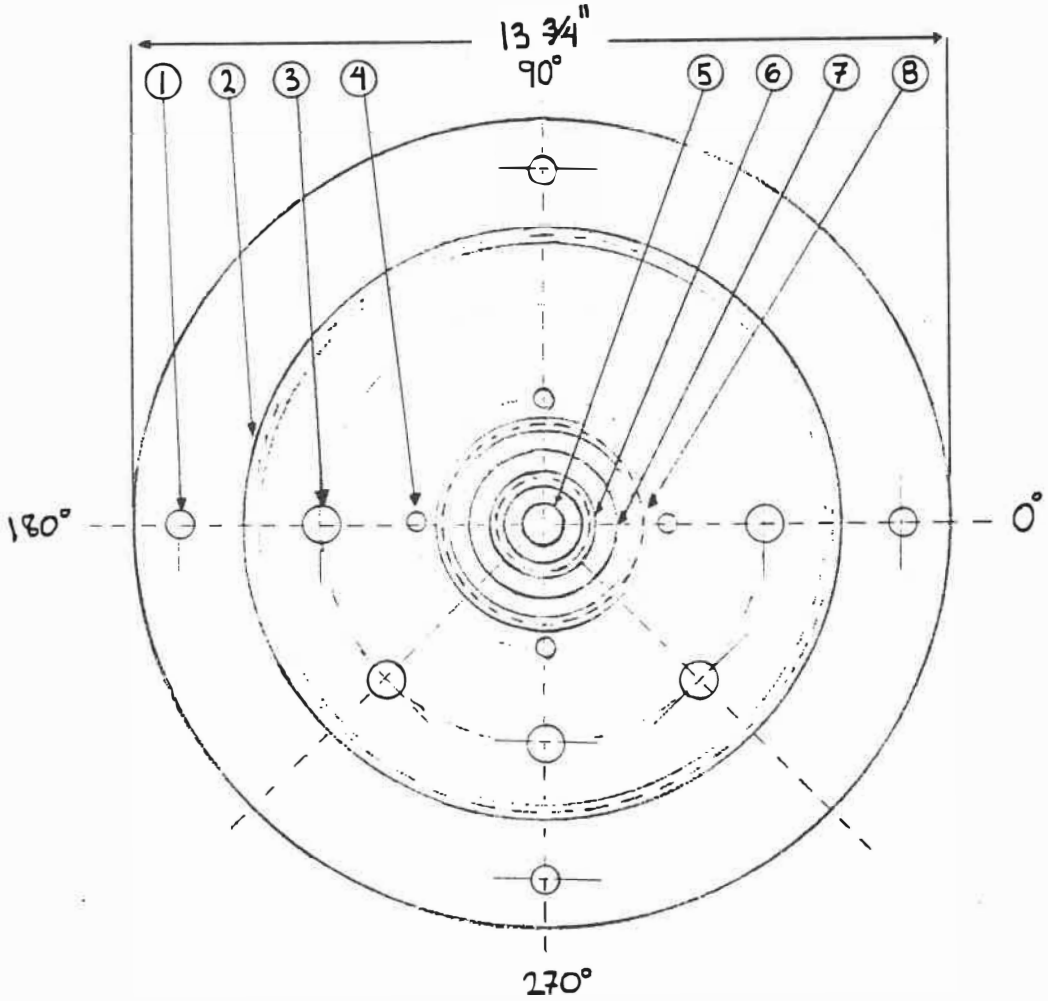


Figure C2b: Vue du dessus

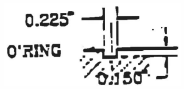
Figure C2 : Couvercle du bioréacteur

1. percer 4 trous 7/16"

   espacement de 90^0

   diamètre de perçage: 12.18"

2. gorge à joint d'étanchéité (surface du dessous)



3. percer et tarauder 5 trous 1/2" NPTF (du dessus)

   espacement de 45° à partir de 180°

4. percer et tarauder 3/8"-16 UNC

   profondeur:1/2"

   4 trous d'emplacement de 90°

   diamètre de perçage: 4.25"

5. percer un trou de diamètre 1 1/4"

6. gorge à joint d'étanchéité

7. machiner une cavité de profondeur 1/8"

   à l'intérieur d'un diamètre de 2 1/2"

8. gorge à joint d'étanchéité

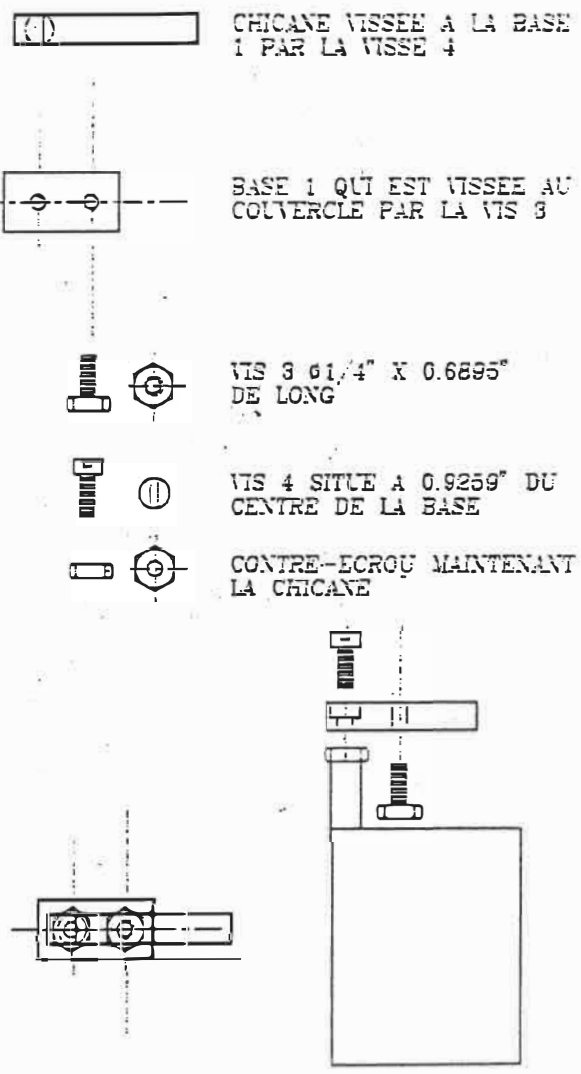


Figure C3 : Chicanes de surface

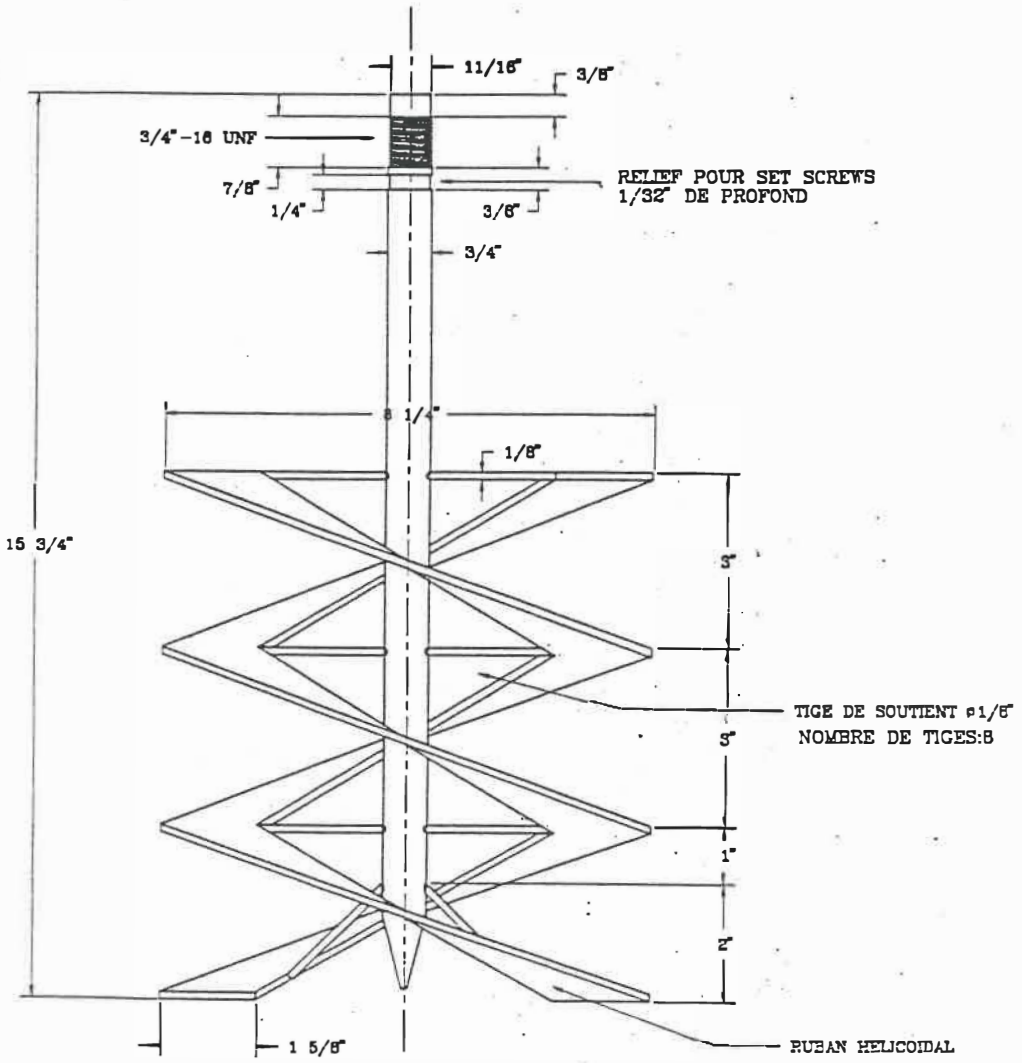


Figure C4 : Agitateur à rubans hélicoïdaux double

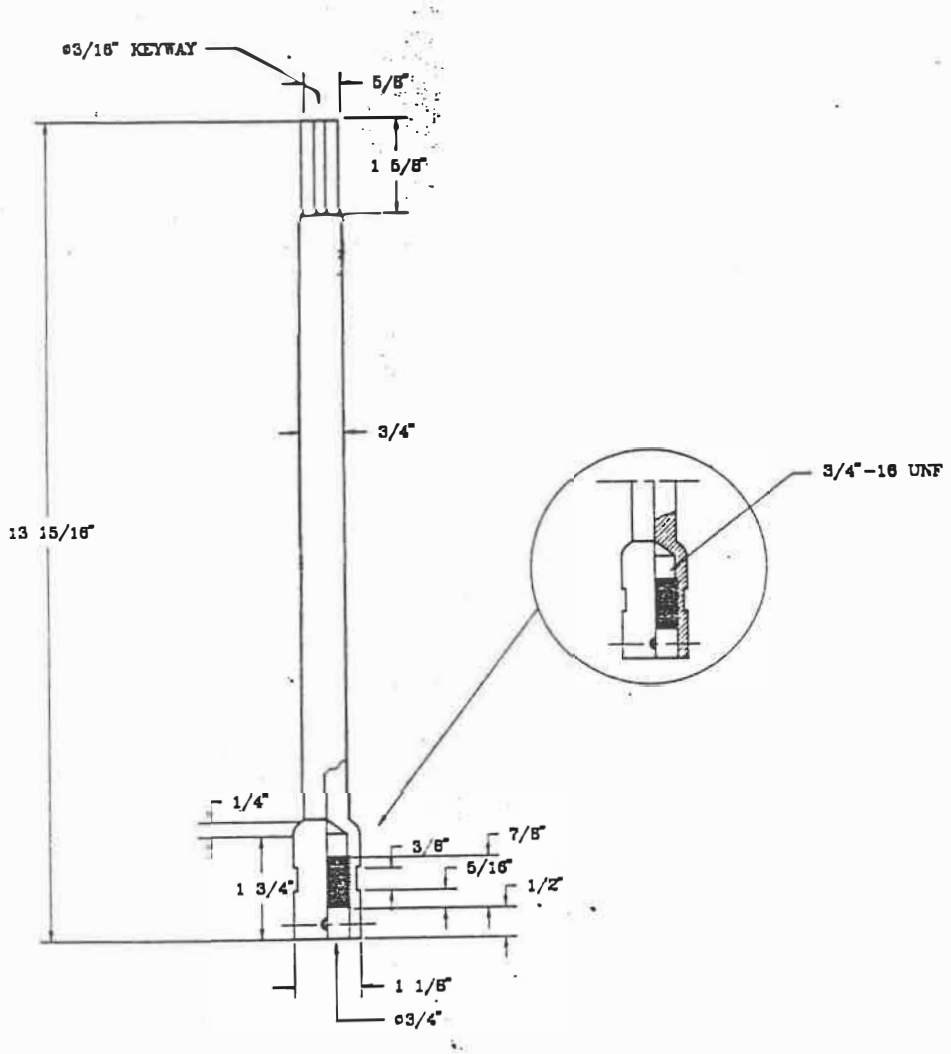


Figure C5 : Arbre supérieur de l'agitateur

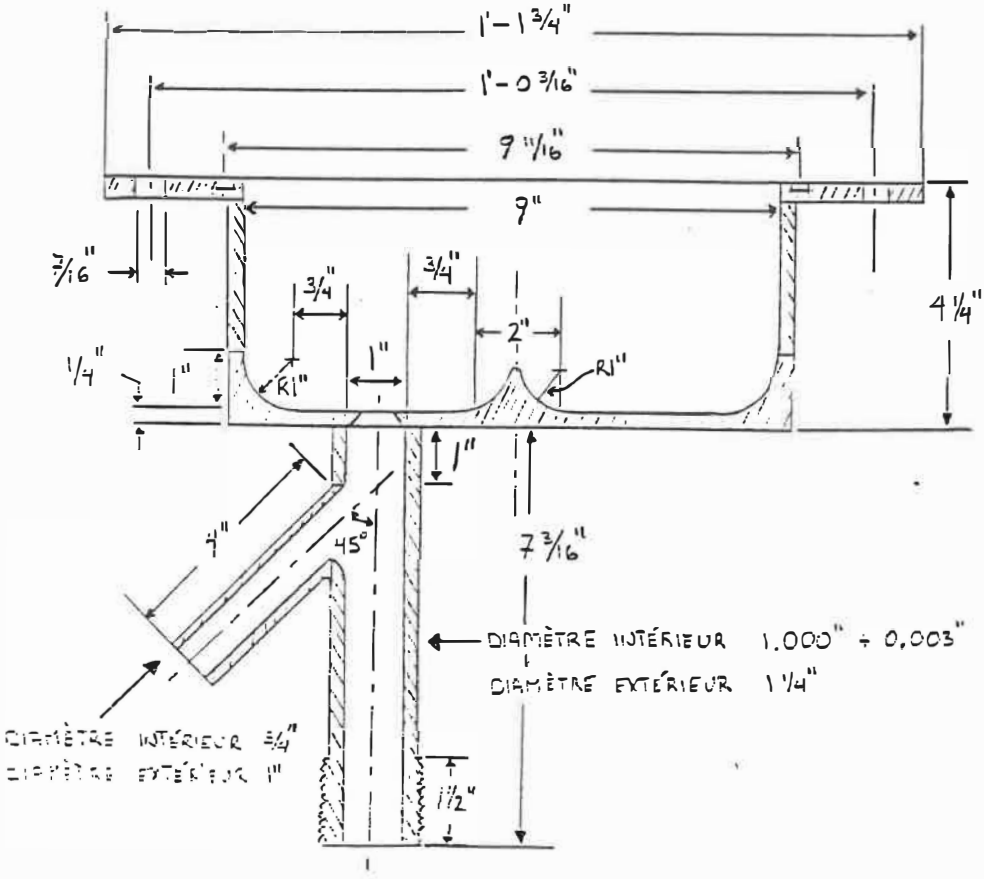


Figure C6 : Base du bioréacteur: vue de coupe

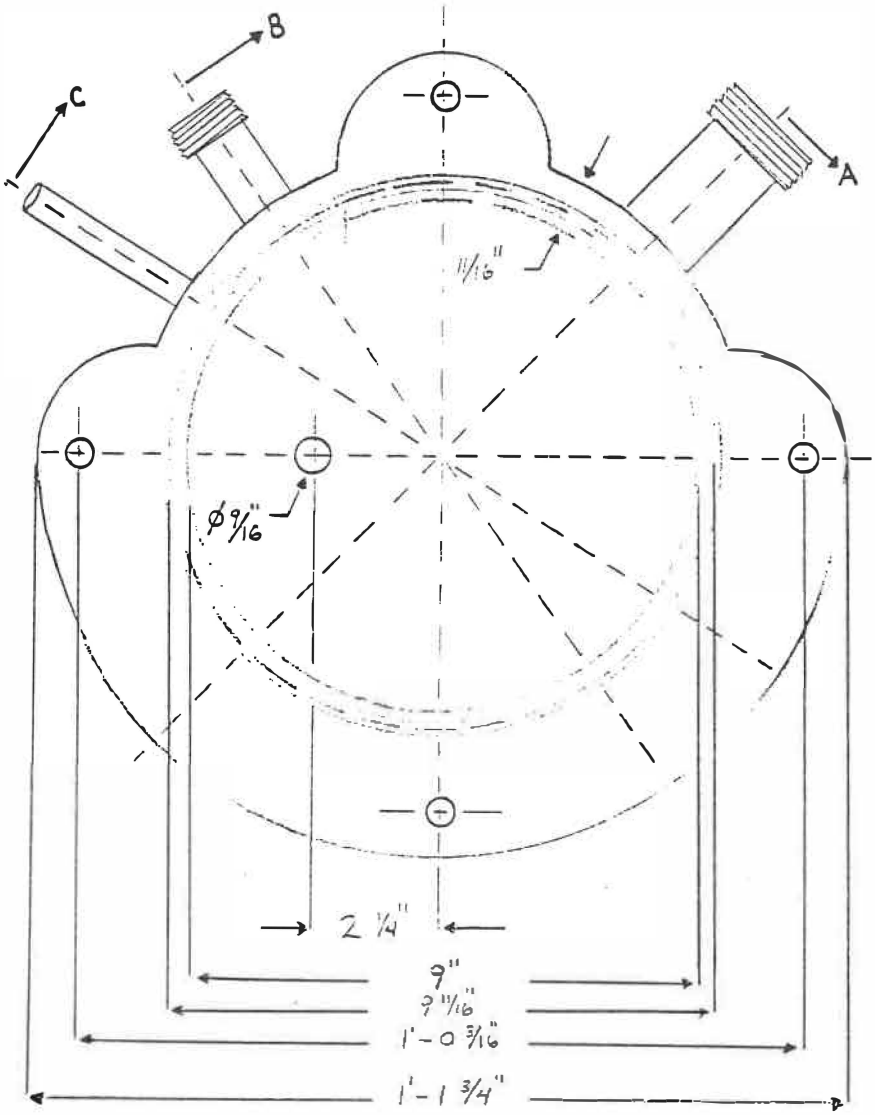


Figure C7 : Base du bioréacteur: vue du dessus

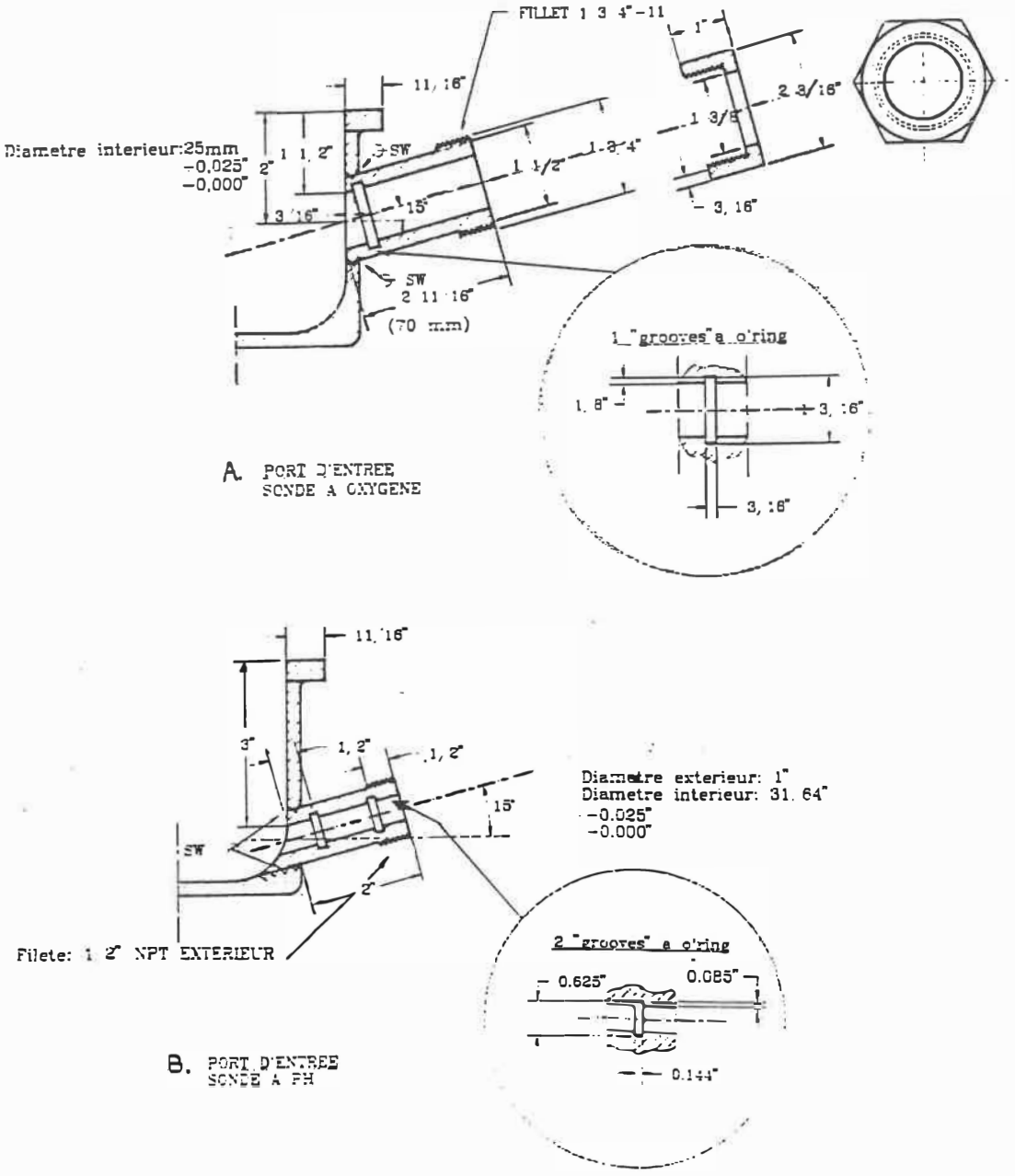


Figure C8 : Base du bioréacteur: ports d'entrée

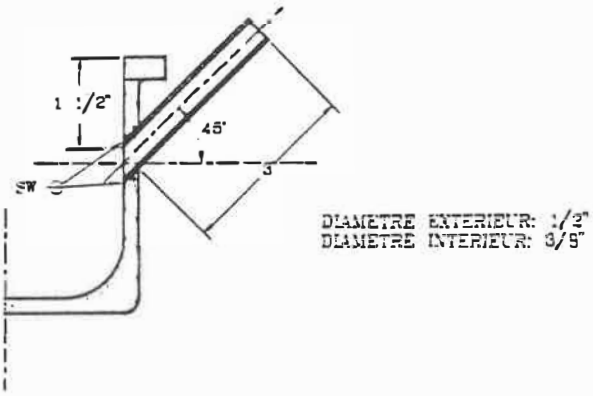


Figure C8c: Port d'échantillonnage

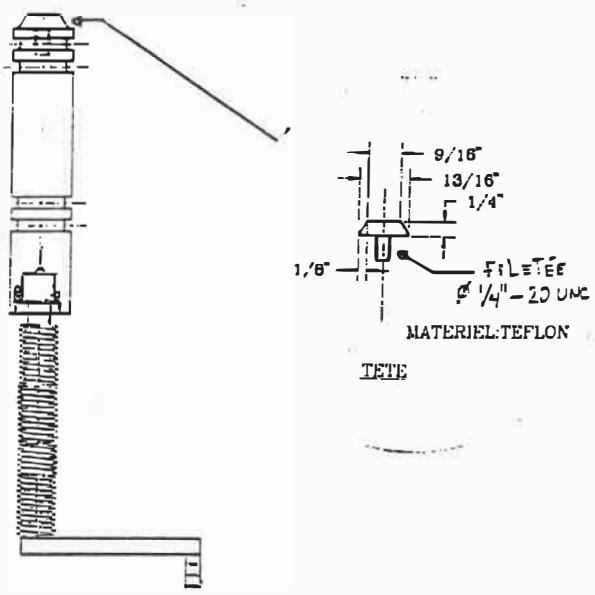


Figure C9a: Vue complète de côté

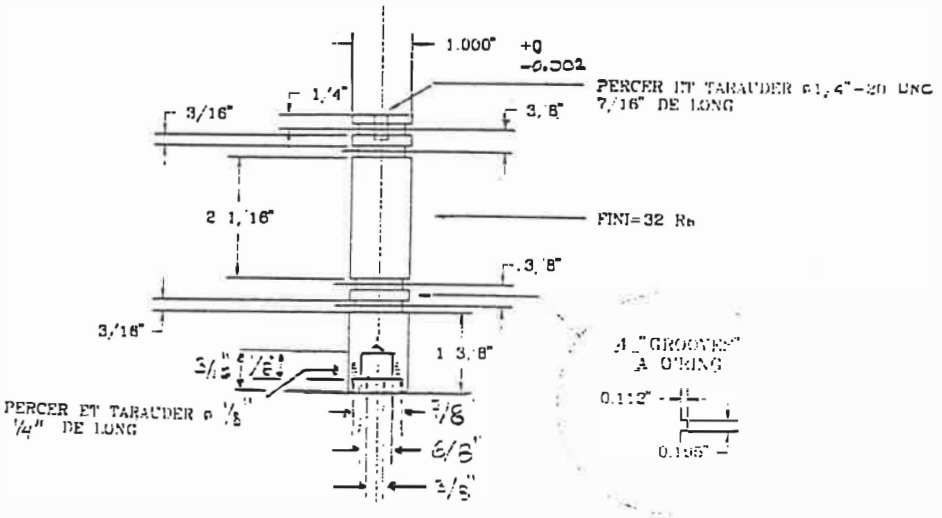


Figure C9b: Corps du bélier

Figure C9 : Bélier de la vanne de sortie

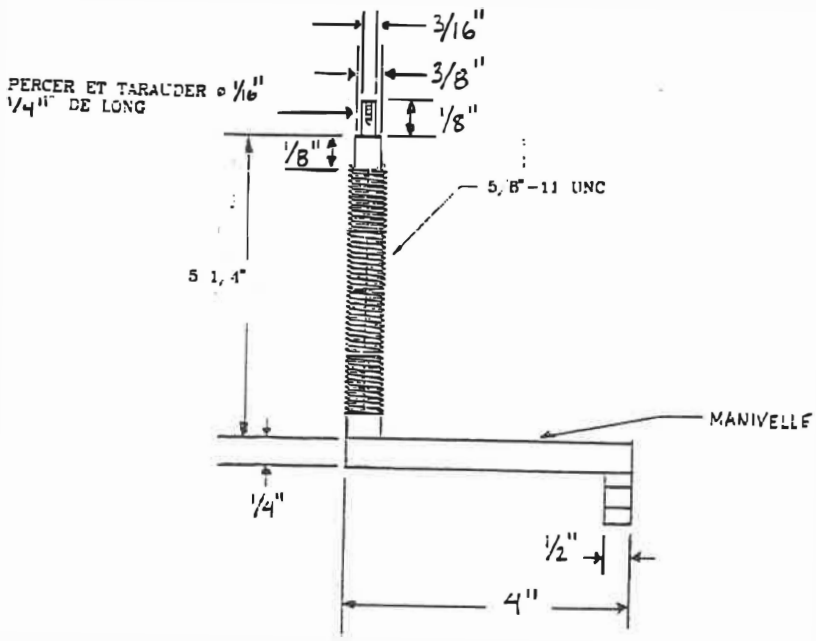


Figure C9c: Manivelle

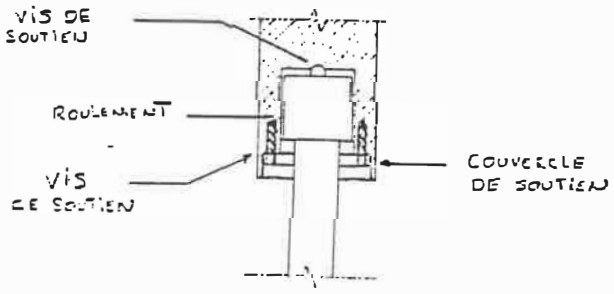


Figure C9d: Système de roulement de la manivelle

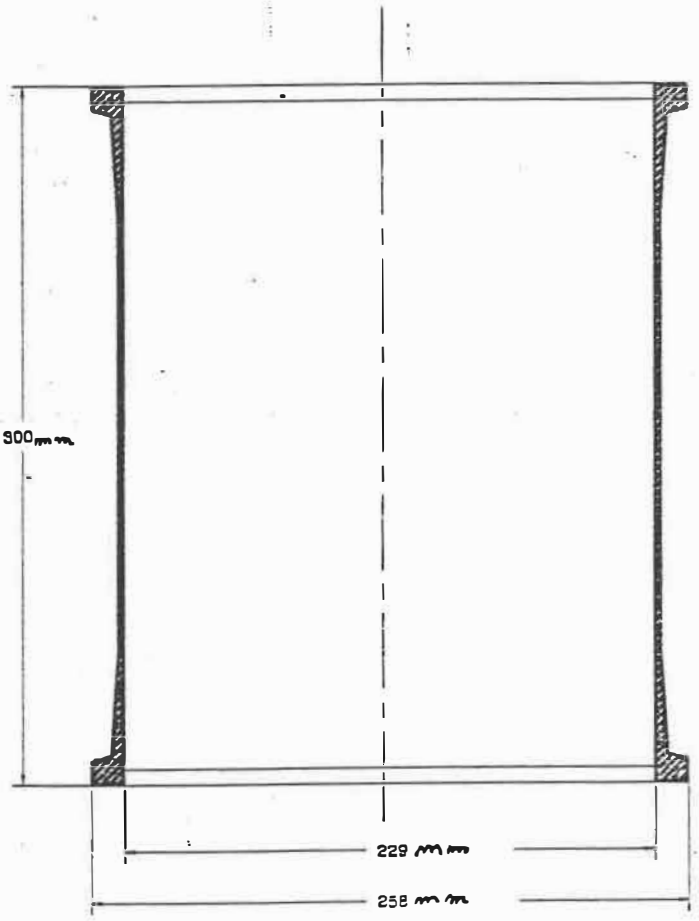


Figure C10: Tube de verre central

ANNEXE D

TECHNOLOGIE DE MISE EN SUSPENSION DES CELLULES DE PLANTES

Technologie de mise en suspension

Les étapes à suivre afin d'obtenir une suspension cellulaire à partir d'une plante sont les suivantes (14,59):

- prélever une section de tige ou de feuille de la plante d'intérêt;
- stériliser en surface l'explant à l'éthanol 70%
- le déposer sur une gélose nutritive stérile ajoutée d'une hormone de croissance, généralement l'IAA (acice acétique indole);
- lorsque le cal (amas de cellules) est formé, on en transfère un fragment dans un flacon contenant du milieu liquide stérile;
- on garde à agiter le flacon et on repique la culture à intervalle régulier.

Les cellules de l'explant sont différenciées car elles y ont des fonctions différentes. Lors de la mise sur gélose nutritive il s'opère une dédifférenciation cellulaire sous la gouverne du caractère totipotent des cellules. En fait comme les cellules sont soumises au même environnement chimique (gélose nutritive) leur

physiologie tend vers un équilibre commun. Puis, par croissance en milieu liquide agité on obtient des cellules en suspension non-différenciées en autant que les conditions physico-chimiques homogènes soient maintenues.

ANNEXE E

MILIEU DE CROISSANCE 1B5

Présenté par O.L. Gamborg (9), le milieu de croissance 1B5 se compose comme suit:

Composés	Concentration
$NaH_2PO_4 * H_2O$	150 mg/L
KNO_3	2500 "
$(NH_4)_2SO_4$	134 "
$MgSO_4 * 7H_2O$	250 "
EDTA ferrique	43 "
Sucrose	20 et 50
Solution de $CaCl_2 * 2H_2O$	1,0 mL/L
" de micro-éléments	1,0 "
" d'iodate de potassium	1,0 "
" de vitamines	1,0 "
" de 2,4-D	2,0 "

Tableau E1: Milieu de culture 1-B5

Solution de $CaCl_2 * 2H_2O$

$CaCl_2 * 2H_2O$	15g/100 mL

Solution de micro-éléments

$MnSO_4 * H_2O$	1000 mg/L
H_3BO_3	300 "
$ZnSO_4 * 7H_2O$	200 "
$Na_2M_0O_4 * 2H_2O$	25 "
$CuSo_4 * 5H_2O$	2,5 "
$C_0Cl_2 * 6H_2O$	2,5 "

Solution d'iodate de potassium

KI	75 mg/100 mL

Solution de vitamines

acide nicotinique	100 mg/100 mL
thiamine*HCl	1000 "
pyridoxine*HCl	100 "
myo-inositol	10000 "

Solution de 2,4-D

2,4-dichlorophénoxyacétique acide 2,2 mmol

Le 2,4-D est préparé en ajoutant 50 mg à 2,5 mL d'éthanol que l'on chauffe doucement et que l'on ajoute graduellement à 100 mL d'eau distillée. Les solutions stock sont conservées au congélateur (-20^{0}C). En ce qui concerne les micronutriments ainsi que les vitamines et les autres solutions, ils ont été gardés au réfrigérateur (4^{0}C). La solution d'iodate de potassium doit être conservée dans un récipient protégé de la lumière. Le pH doit être ajusté à 5,5 par des solutions de 0,2 N KOH ou 0,2 N HCl.

ANNEXE F

CARACTERISATION D'UN AGITATEUR A RUBAN HELICOIDAL SIMPLE A TITRE D'ELEMENT DE MESURE D'UN VISCOSIMETRE

F.1. Introduction

L'utilisation d'éléments de mesure de géométries conventionnelles tels les cylindres concentriques couplés à un rhéomètre ne donnent pas de lectures stables avec le temps car la suspension décante lorsqu'elle n'est pas agitée efficacement (5,12). Certains chercheurs ont plutôt orienté leurs recherches du côté de géométries pouvant maintenir les particules ou les cellules en suspension. Ainsi Mitard et Riba (59) ont caractérisé la rhéologie d'une suspension de flocons d'Aspergillus niger en utilisant un ruban hélicoidal double comme agitateur. Reuss et al. (60) ont utilisé un système similaire pour des levures, des cellules de Penicillium chrysogenum, d'Aspergillus niger, une solution de xanthane ainsi que pour du pullulane. Ces systèmes alliant une agitation adéquate à une mesure stable semblent être les plus aptes pour déterminer le comportement rhéologique des suspensions cellulaires fortements décantables.

Le choix d'un agitateur pour fin de caractérisation rhéologique dépendait donc entre autres de sa capacité de maintenir une suspension homogène.

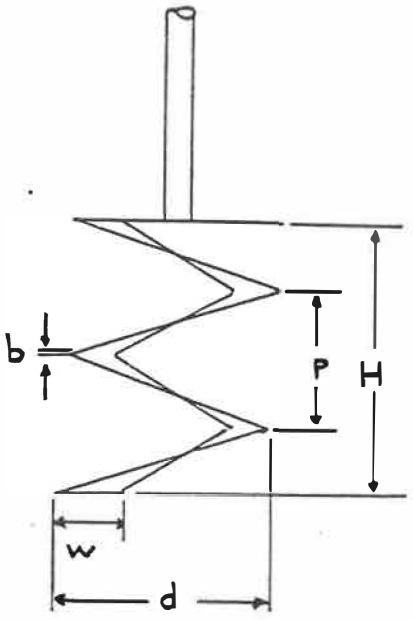
Le système se devait d'être simple, de ne requérir que de faibles volumes d'échantillons et de couvrir une plage suffisante de taux de cisaillement à la caractérisation des suspensions. Dans la même logique du bioréacteur modèle, un agitateur à ruban hélicoïdal fut utilisé pour sa capacité de maintenir des conditions d'homogénéité quel que soit la concentration cellulaire ainsi que l'intensité du caractère rhéofluidifiant de la suspension. L'emploi d'une configuration à un seul ruban fut dicté par des difficultés de construction d'un agitateur à deux rubans compte tenu des faibles dimensions visées. Un rhéomètre Brookfield fut utilisé pour sa facilité d'y adapter plusieurs types d'éléments de mesure.

L'objectif premier de ces travaux était de caractériser l'agitateur à ruban hélicoïdal afin de l'utiliser pour le suivi rhéologique des suspensions de cellules de plantes. Une relation entre la viscosité apparente des fluides étudiés et la lecture au rhéomètre a du être déterminée. Le ratio entre le taux de cisaillement apparent imposé par l'agitateur et la vitesse de rotation a aussi du être évaluée expérimentalement.

F.2. Méthodologie expérimentale

F.2.1. Configuration du système

Monté directement au rhéomètre, l'agitateur dont les dimensions sont présentées à la figure suivante était plongé dans un volume de 25 mL de suspension. Seul le ruban hélicoïdal est en contact avec le fluide.



Dimensions

$b = 2{,}00 \times 10^{-3}$ m

$d = 2{,}81 \times 10^{-2}$ m

$D = 3{,}22 \times 10^{-2}$ m

$h = 2{,}80 \times 10^{-2}$ m

$H = 5{,}00 \times 10^{-2}$ m

$p = 0{,}90 \times 10^{-2}$ m

$w = 1{,}00 \times 10^{-2}$ m

Figure F1 : Configuration du ruban hélicoïdal simple

F.2.2. Solutions non-newtoniennes pour fin de caractérisation du ruban hélicoïdal

Des solutions aqueuses de xanthane ont été choisies pour caractériser l'agitateur. L'intérêt de ce polymère réside dans son comportement en loi de puissance pour une grande plage de taux de cisaillement.

Pour la grande majorité des polymères, le mode employé pour leur mise en solution dans l'eau est critique; il doit mener à une solution homogène dont les molécules polymériques ne sont pas altérées. Ce dernier critère exige parfois des conditions de préparation très douces. Les solutions de xanthane furent préparées selon la procédure suivante: incorporer par petites quantités le polymère en poudre (Aldrich) à de l'eau, puis, laisser le flacon bouché sur une plaque oscillante (60 s^{-1}) pour une période de dix jours.

La viscosité des solutions de xanthane a été déterminée par une géométrie à cylindres coaxiaux sur un rhéomètre Bohlin. Une fois caractérisé, un ruban

hélicoïdal simple monté sur un rhéomètre Brookfield a aussi été utilisé pour fin d'évaluation de la viscosité de ces solutions.

Les solutions utilisées avaient les caractéristiques suivantes (calculées à partir des résultats présentés à la figure F2):

% xanthane	n	m
0,1	0,43	0,15
0,2	0,33	0,44
0,3	0,26	0,91
0,35	0,24	0,85

Tableau F1 : Caractéristiques des solutions de xanthane

La plage de vitesses couverte par le Brookfield a menée à des viscosités correspondant à la zone de loi de puissance. Ces solutions ont servi à la

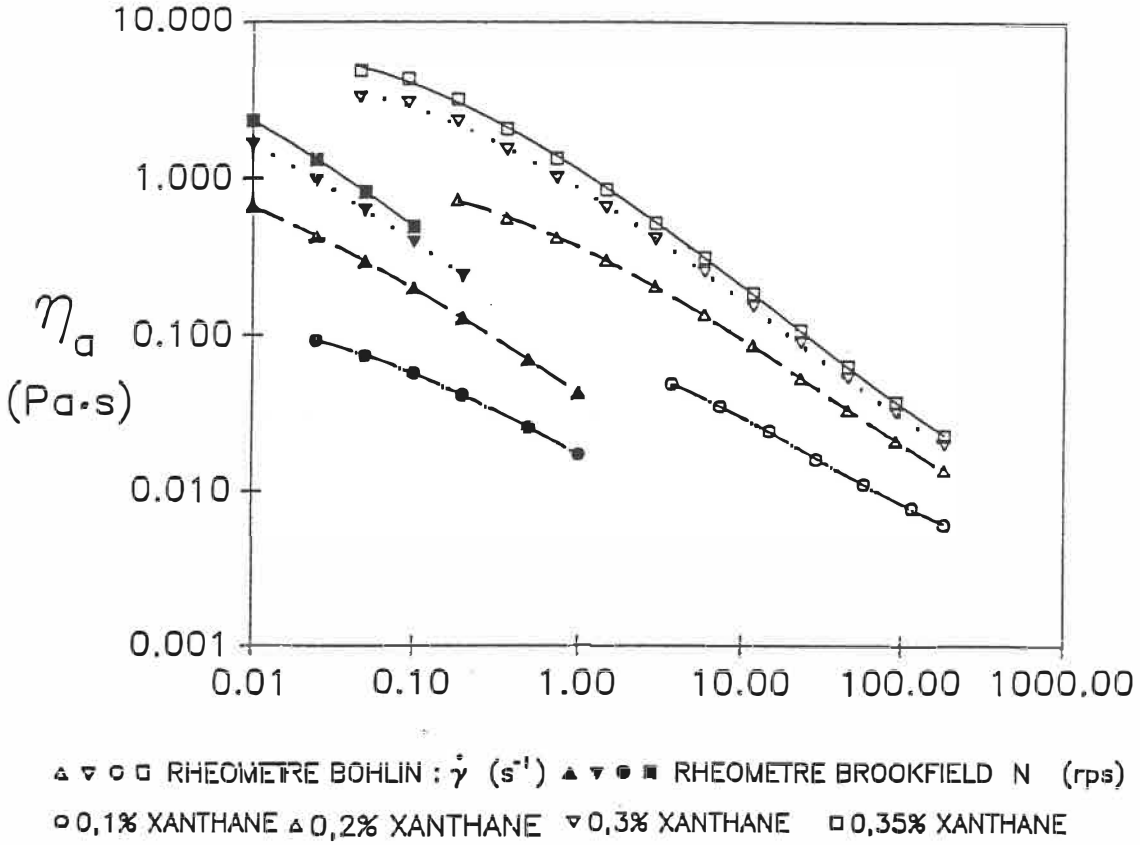


Figure F2 : Courbes de viscosité de solutions de xanthane: rhéomètres Brookfield et Bohlin

détermination du facteur de proportionnalité k_s entre le taux de cisaillement et la vitesse d'agitation.

F.2.3. Détermination du couple appliqué face à la lecture

La géométrie du ruban hélicoïdal ne permettant pas une modélisation simple de la lecture face au couple appliqué, l'utilisation d'une géométrie facilement modélisable comme élément de mesure fut nécessaire. Des cylindres pleins ont été utilisés. En rotation libre dans le liquide des cylindres de trois diamètres ont été employés, soit 3/8", 3/4" et 1".

La hauteur d'insertion a été fixée à $5,1x10^{-2}$ m car on a déterminé qu'à cette hauteur les effets de bouts sont négligeables.

F.3. Caractérisation du système Brookfield-agitateur: résultats

F.3.1. Ratio couple/lecture

Le lien entre le couple et la lecture est direct.

La lecture vient de la déformation du ressort ou de la barre de torsion de l'appareil de mesure dûe à la résistance du fluide à s'écouler. Dans la majorité des cas (dont le Brookfield) la plage opérationnelle des appareils est limitée à la zone de réponse linéaire du ressort ou de la barre de torsion. Lorsque l'élément de torsion dépasse cette limite il risque de subir une déformation permanente faussant les lectures subséquentes.

Pour un cylindre en rotation libre, le couple s'écrit:

$$\Im|_{r=R} = A_c \cdot (-\tau_{r\theta})|_{r=R} \cdot R_b \qquad (F1)$$

où $A_c = 2\pi R_c L$ (surface de contact)

R_b = bras de levier

et $\tau_{r\theta}|_{r=R} = -2\mu\Omega_o$

est obtenue en effectuant un bilan sur le fluide en rotation autour du cylindre en négligeant les effets de bouts ainsi que les composantes de vitesses axiales et radiales. L'expression du couple est alors fonction de valeurs connues et peut donc être évalué:

$$\mathcal{T}\,|_{r=R} = 4\pi R_c^{\,2} L \mu \Omega_o \qquad \text{(F2)}$$

Les résultats recueillis pour l'ensemble des cylindres utilisés ont convergé vers une valeur unique pour le ratio couple/lecture de $6{,}56 \times 10^{-7}$ (N•m)/(% échelle) tel qu'illustré en figure F3.

F.3.2. Détermination d'une corrélation explicite de la viscosité apparente

Le patron d'écoulement généré par l'action d'un ruban hélicoïdal est complexe. Pour ce type de géométrie comme il y a une distribution de contraintes de cisaillement au ruban; les valeurs mesurées et calculées de la viscosité ainsi que de taux de cisaillement doivent donc être considérés comme apparents.

L'expression générale de la contrainte de cisaillement appliquée s'écrit:

$$\tau = -\eta_a \cdot \dot{\gamma}_a \qquad \text{(F3)}$$

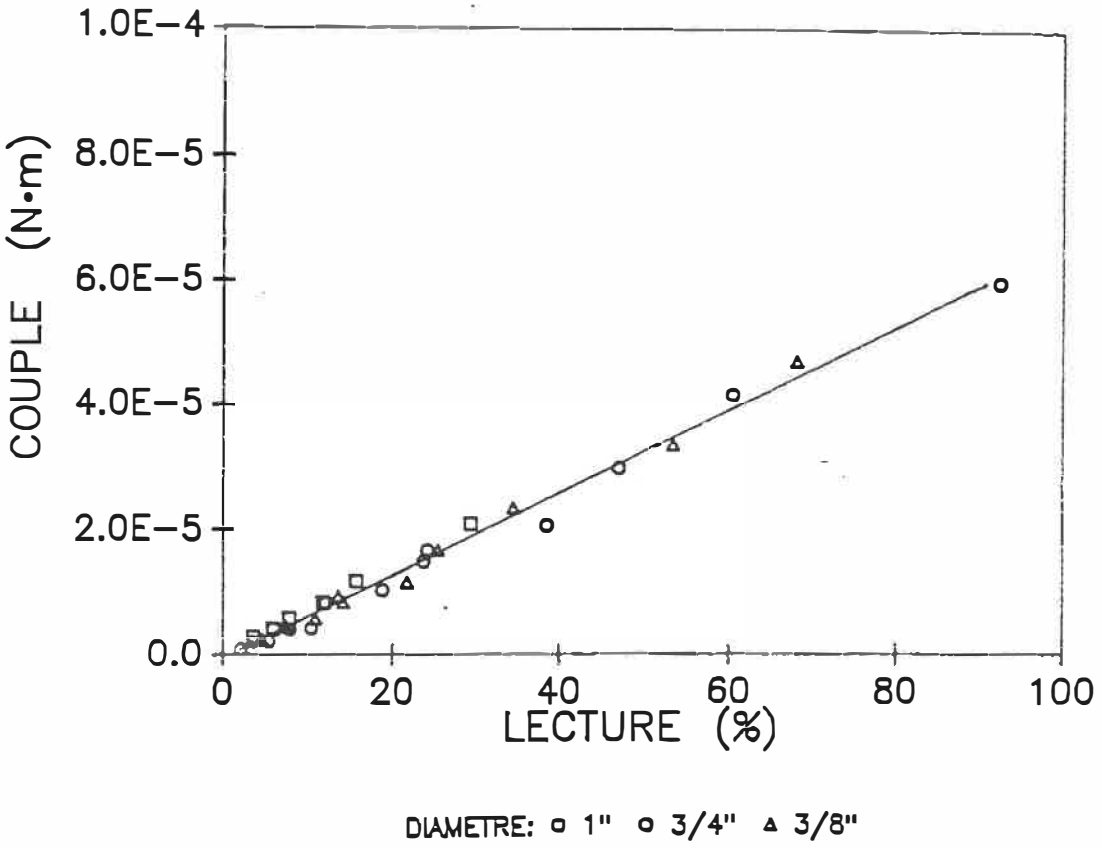


Figure F3 : Ratio couple/Lecture au rhéomètre Brookfield

Dans la section précédente une relation de proportionnalité directe a été établie entre la lecture au rhéomètre Brookfield et le couple. Comme la surface de contact ainsi que le bras de levier sont des valeurs constantes, on peut réécrire l'expression (F1):

$$\mathcal{T} = c_3 \cdot \tau \qquad \text{(F4)}$$

où c_3 est une constante. De cette dernière expression couplée à la précédente en remplaçant le couple par la relation avec la lecture on obtient:

$$L = c_4 \cdot \eta_a \cdot \dot{\gamma}_a \qquad \text{(F5)}$$

où c_4 est une constante englobant c_1 et égale à:

$$c_4 = (A_{RH} \cdot R_b)/6{,}56\text{x}10^{-7}$$

Quant au taux de cisaillement apparent Metzner et Otto (61), suivant une idée de Magnusson (62), ont proposé de le relier à la vitesse d'agitation selon l'expression suivante:

$$\dot{\gamma}_a = k_s \cdot N \qquad \text{(F6)}$$

avec k_s une constante de proportionnalité. En combinant ces deux dernières expressions, on obtient une équation permettant d'évaluer la viscosité apparente:

$$\eta_a = \frac{(L/N) \cdot (A_{RH} \cdot R_b)/6,56x10^{-7}}{k_s} \qquad (F7)$$

Expérimentalement à l'aide d'huiles de viscosité donnée il a été possible d'évaluer le facteur de proportionnalité défini à l'équation (F6). Par régression non-linéaire sur les données illustrées en figure F4 l'expression suivante a été trouvé.

$$\eta_a = 4,68x10^{-4} \cdot (L/N)^{1,01} \qquad (F8)$$

avec un pourcentage de déviation moyen de 6,64% et de déviation maximum de 16,19%. L'obtention d'un exposant différent de 1 semble provenir des effets de bouts.

Les données avec différentes concentrations de xanthane illustrées à la figure F2 ont été utilisés afin de déterminer une relation entre le taux de cisaillement et la vitesse d'agitation du ruban

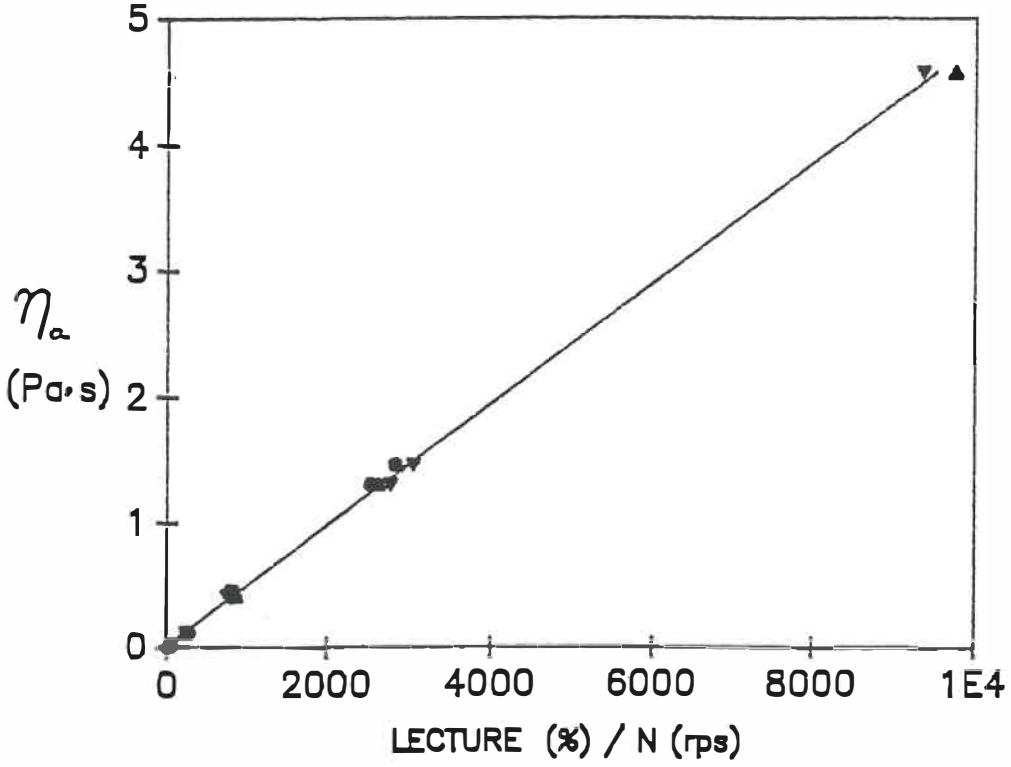


Figure F4 : Relation viscosité/Lecture au rhéomètre Brookfield muni d'un ruban hélicoïdal simple

hélicoïdal simple. Les résultats comparés (à viscosité donnée) ont montré l'existance d'une valeur unique de k_s égale à 33 (figure F5).

L'expression obtenue expérimentalement confrontée au modèle développé (équation F6) implique un bras de levier de $1,11 \times 10^{-2}$ m. Cette valeur calculée correspond à une distance à 70% de la limite intérieure du ruban.

F.3.3. Etude de puissance et de régime d'écoulement

Tel que décrit par Ulbrecht et Carreau (63) l'étude de la puissance consommée informe sur l'hydrodynamique et les patrons d'écoulement. Par une analyse adimensionnelle le nombre de puissance (Np) peut être relié au nombre de Reynolds (Re):

$$Np = Np(Re) \qquad (F9)$$

$$\text{avec } Np = P/(D^5 N^3 \rho)$$

$$\text{et } P = 2\pi N \cdot \mathcal{T}$$

dans des conditions où le nombre de Froude peut être négligé: pas de vague et de vortex à la surface libre.

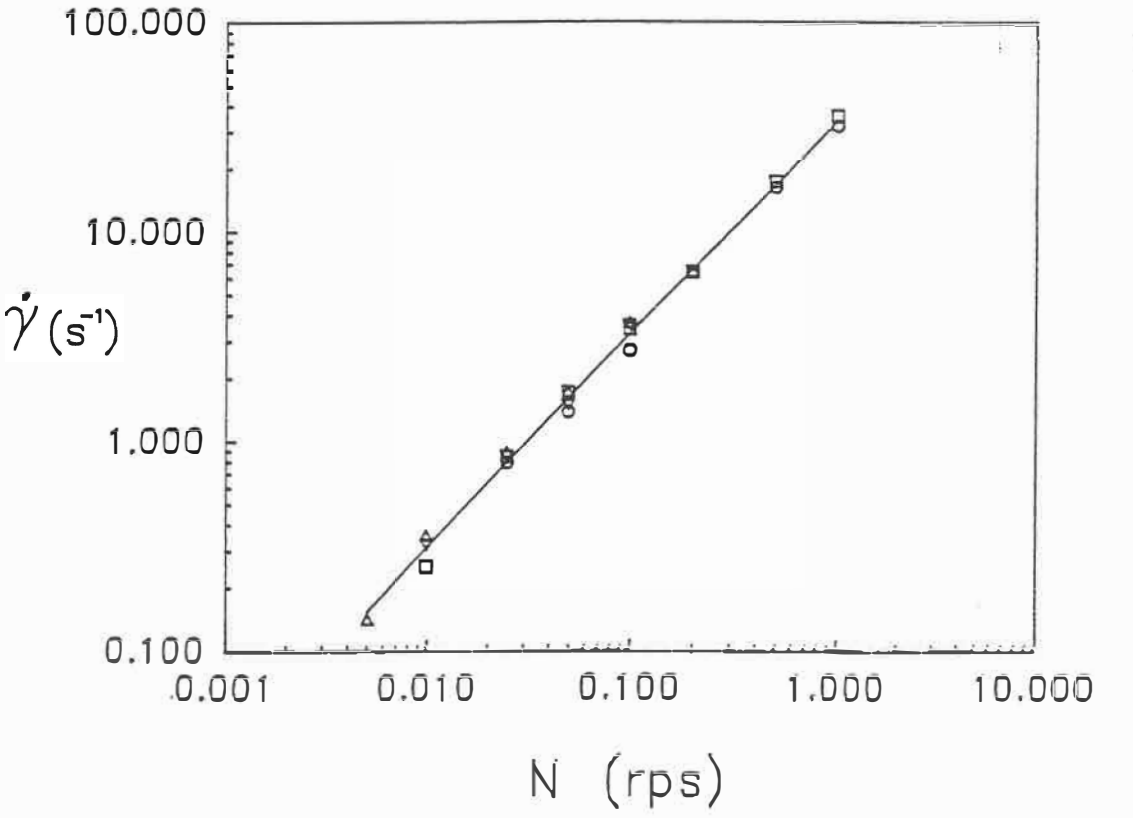


Figure F5 : Evaluation du facteur de proportionnalité K_s

Ces auteurs ainsi que Moo-Young et al. (42) font remarquer qu'il est possible d'observer trois zones particulières lorsque l'on trace Np selon Re. Pour des valeurs faibles de Re (généralement < 10) l'écoulement est laminaire et expérimentalement le nombre de puissance s'écrit:

$$Np = k_p \cdot Re^{-1} \qquad (F10)$$

Le coefficient k_p depend de la géométrie de l'agitateur. Pour Re supérieur à une valeur de 1000 à 10000, l'écoulement est turbulent et le nombre de puissance devient indépendant du nombre de Reynolds. L'écoulement est dit en transition à des valeurs intermédiaires du nombre de Reynolds.

Traçant le nombre de puissance selon le nombre de Reynolds pour les essais avec le xanthane au Brookfield monté du ruban hélicoïdal, un k_p de 388 a été obtenu pour une relation de proportionnalité inverse (figure F6):

$$N_p = 388 \cdot Re^{-1}$$

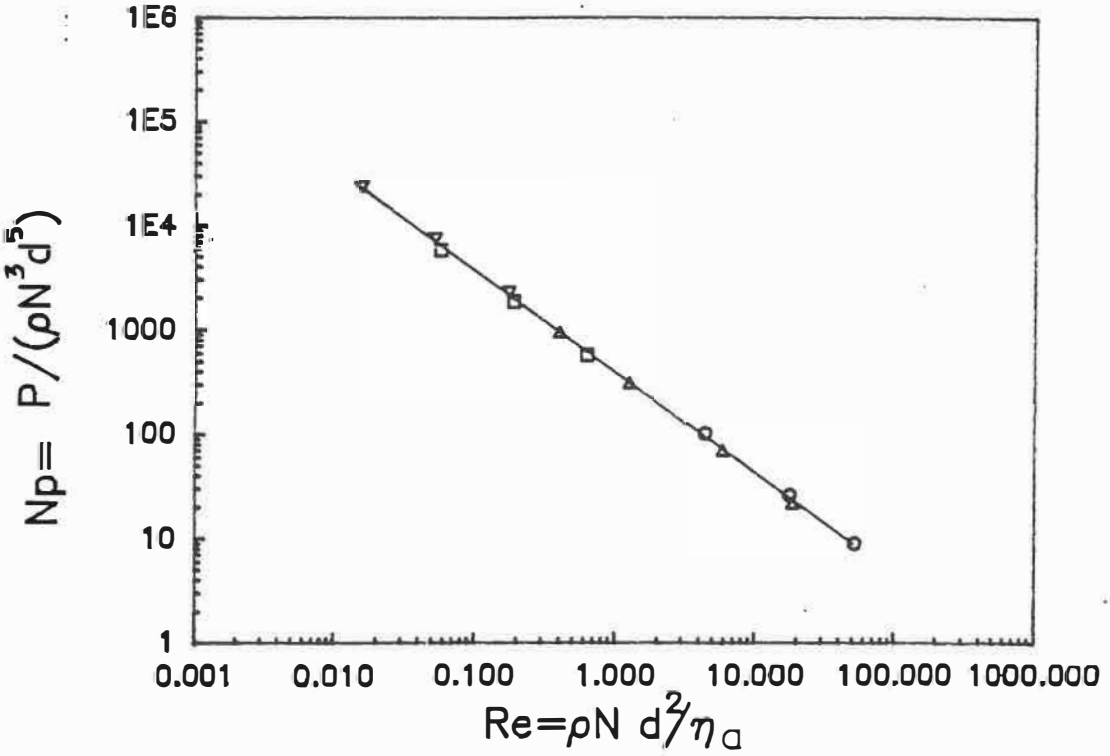


Figure F6 : Courbe de puissance: ruban hélicoïdal simple

F.5.5.2. Discussion

Lorsqu'il s'agit d'agitateurs de type "marine" ou "Rushton" les valeurs de (k_s) retrouvées dans la littérature oscillent autour de 10 sans égard des différentes configurations (47). Quant aux agitateurs à rubans hélicoïdaux l'influence de la géométrie est importante (46,62). Il est intéressant de trouver une valeur unique pour (k_s) pour la gamme de concentrations en xanthane utilisée. Nagata et al. (45) avaient aussi trouvé un (k_s) constant et égal à 30 pour un agitateur à deux rubans.

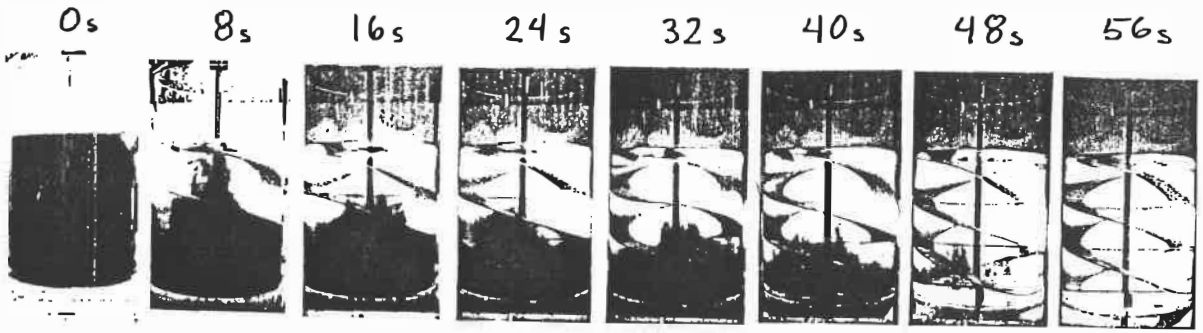
Quant au facteur de puissance (k_p) on se rend compte de la grande dépendance face à la géométrie lorsque l'on consulte le tableau comparatif présenté par Yap (47). On voit que l'influence du pas (p) ainsi que du nombre de rubans est important: pour la même géométrie, un pas deux fois plus faible entraîne un (k_p) presque deux fois plus élevé ainsi qu'à pas (p) égal un agitateur à ruban hélicoïdal simple a un (k_p) équivalent presque à la moitié du (k_p) pour un ruban double. Aussi, négligeant l'influence de la largeur des rubans, tel que proposé par Yap (47), et appliquant

les proportions déjà citées on calcule des valeurs de 372 et 390 (extrapolations des résultats de Hall et al. (64)) similaires à la valeur de 388 déterminée dans cette étude.

ANNEXE G

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES DES ESSAIS DE COLORATION/DECOLORATION

rotation anti-horaire



rotation horaire

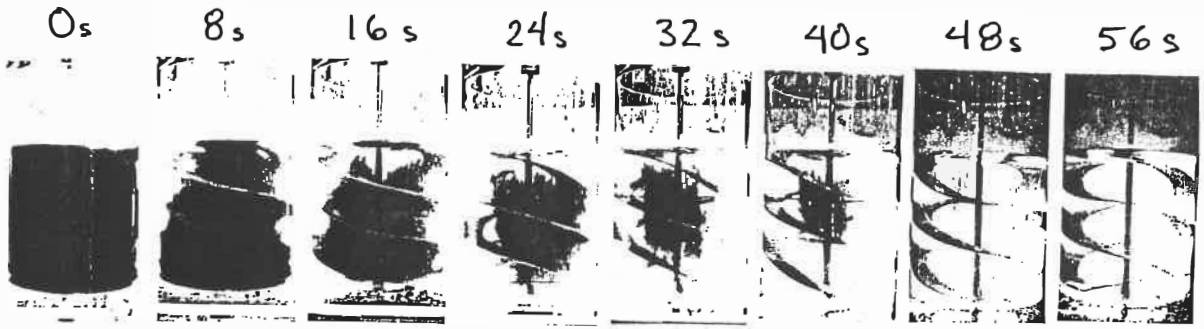
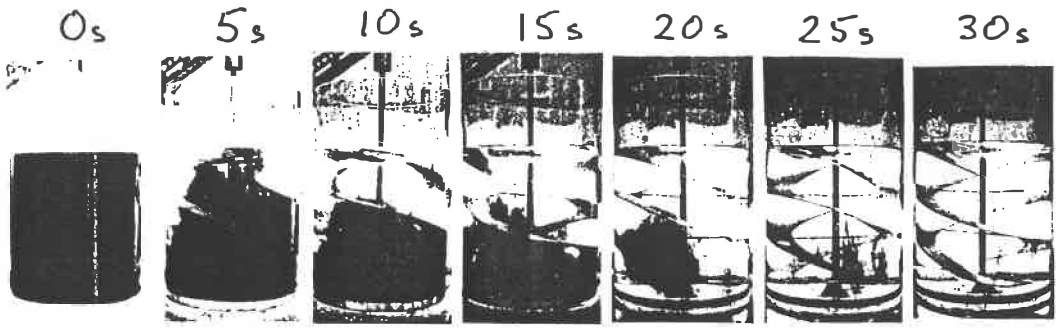


Figure G1 : Planches photographiques: essais de décoloration; 60 rpm; fond plat

rotation anti-horaire



rotation horaire

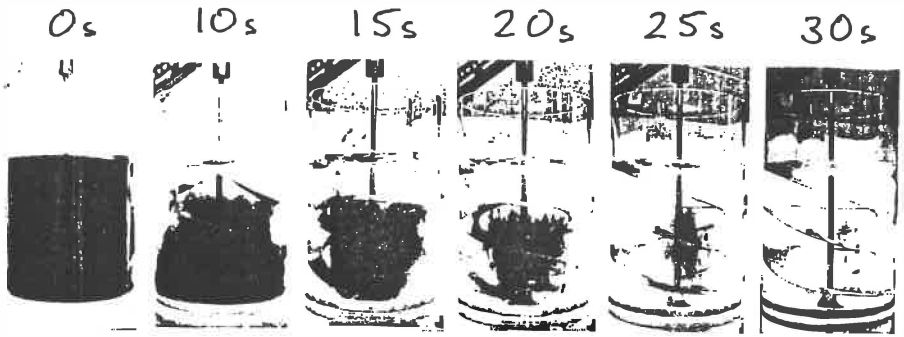
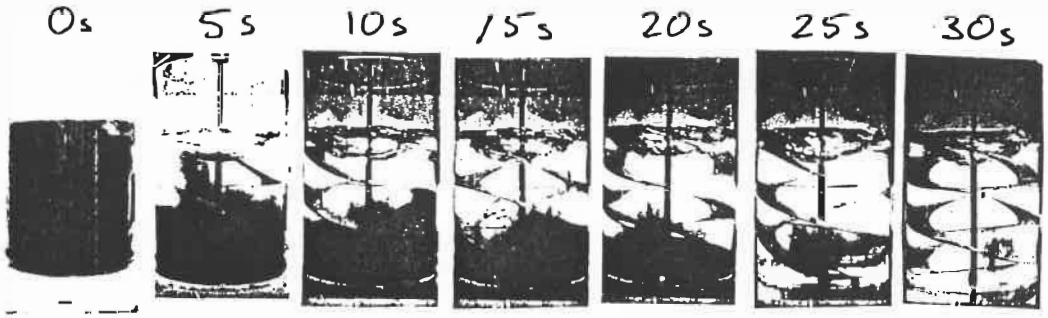


Figure G2 : Planches photographiques: essais de décoloration; 60 rpm; fond profilé

rotation anti-horaire



rotation horaire

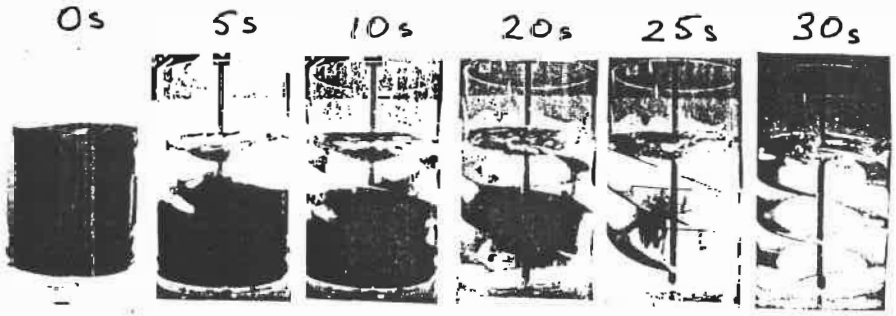
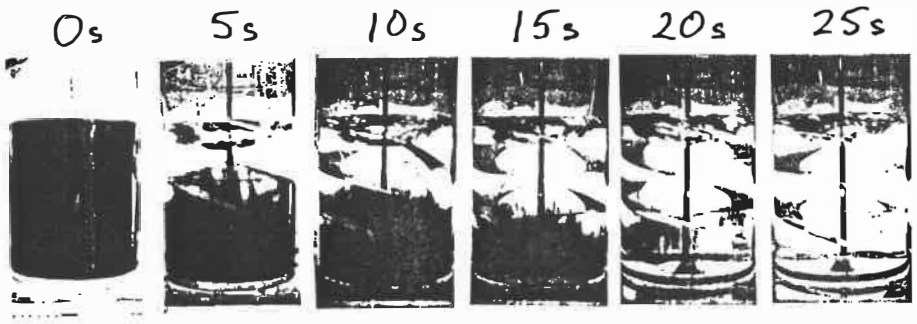


Figure G3 : Planches photographiques; essais de décoloration; 90 rpm; fond plat

rotation anti-horaire



rotation horaire

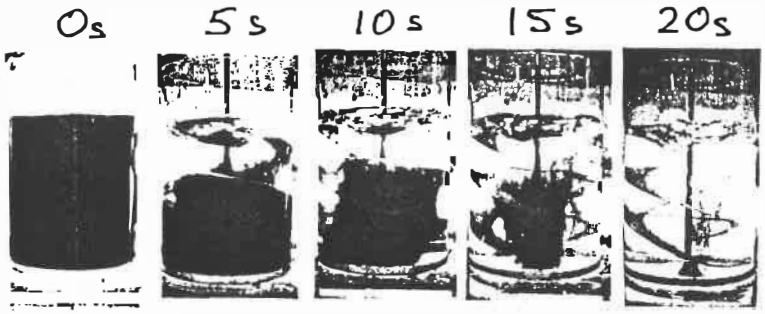
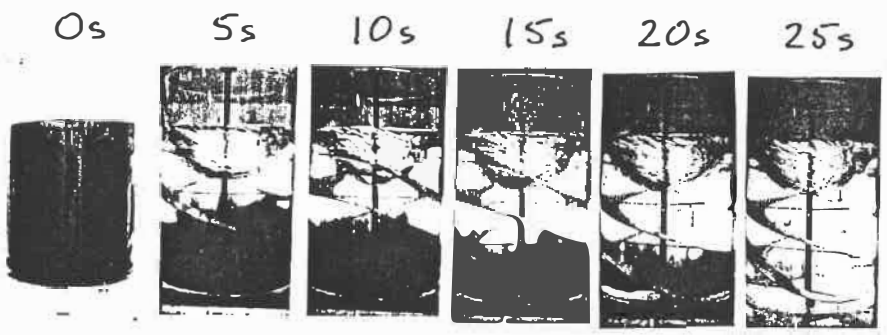


Figure G4 : Planches photographiques: essais de décoloration; 90 rpm; fond profilé

rotation anti-horaire



rotation horaire

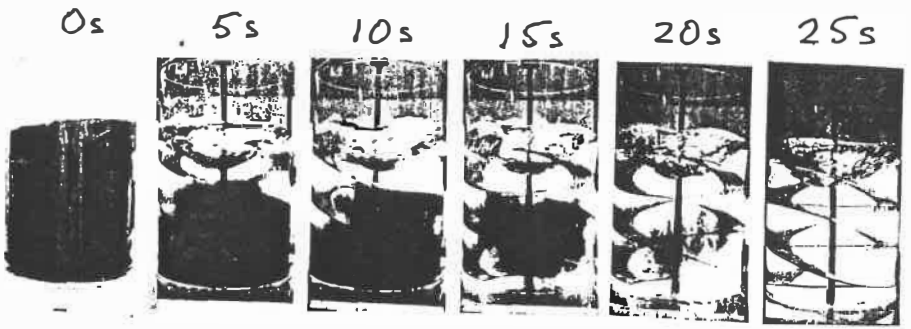
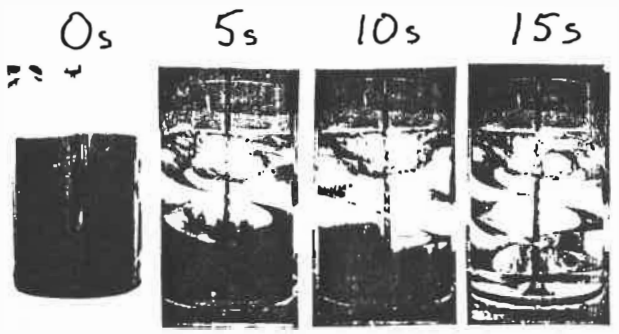


Figure G5 : Planches photographiques: essais de décoloration; 120 rpm; fond plat

rotation anti-horaire



rotation horaire

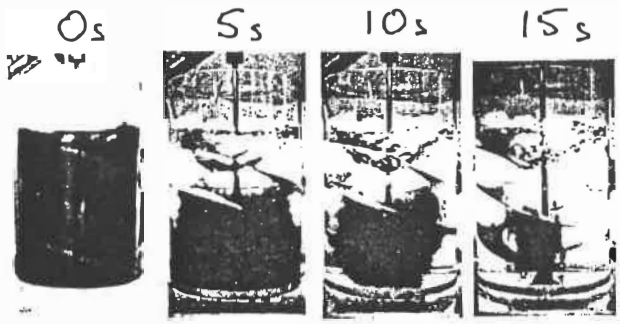
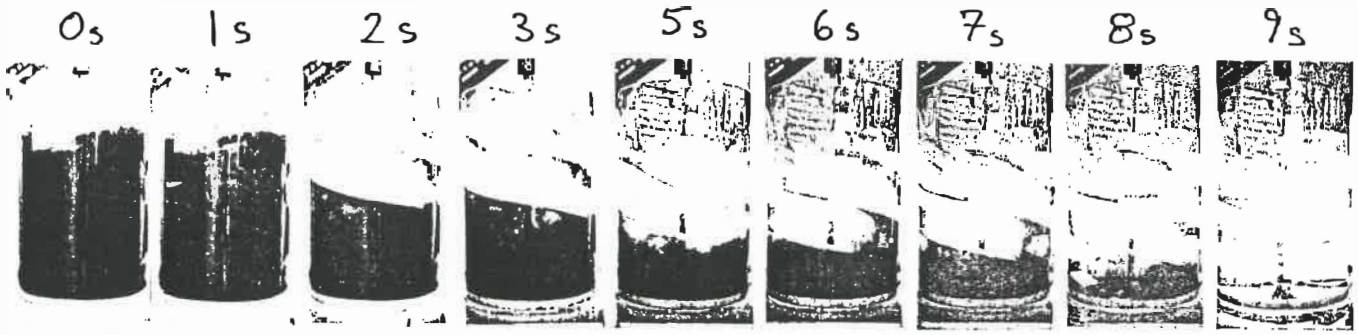


Figure G6 : Planches photographiques: essais de décoloration; 120 rpm; fond profilé

rotation anti-horaire



rotation horaire

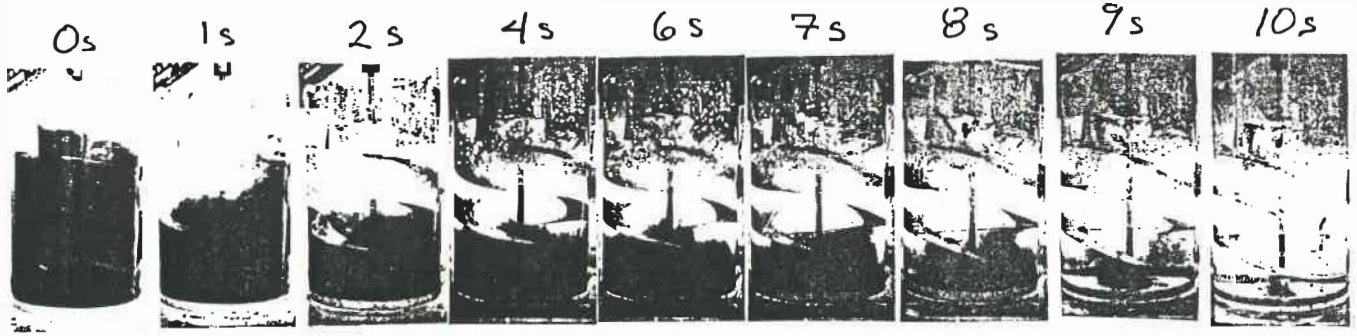
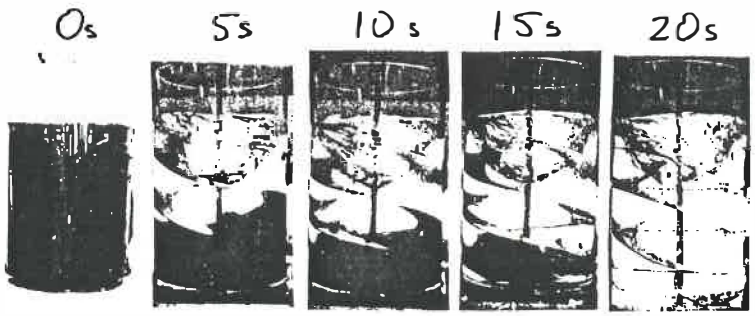


Figure G7 : Planches photographiques: essais de décoloration; 120 rpm; fond profilé; 3 chicanes de surface

rotation anti-horaire



rotation horaire

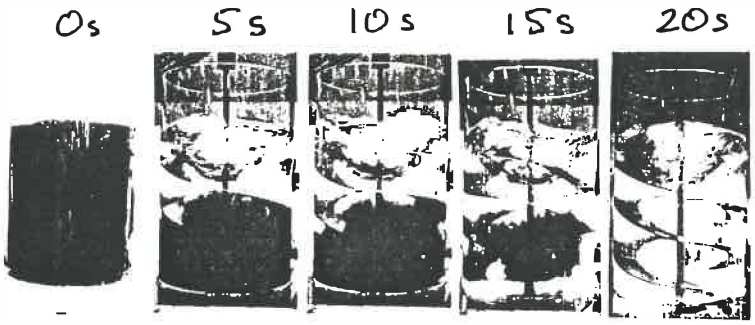
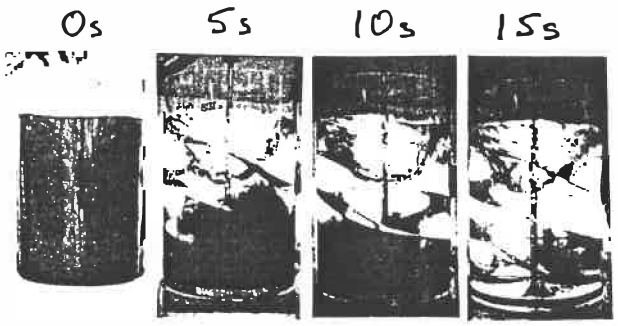


Figure G8 : Planches photographiques: essais de décoloration; 135 rpm; fond plat

rotation anti-horaire



rotation horaire

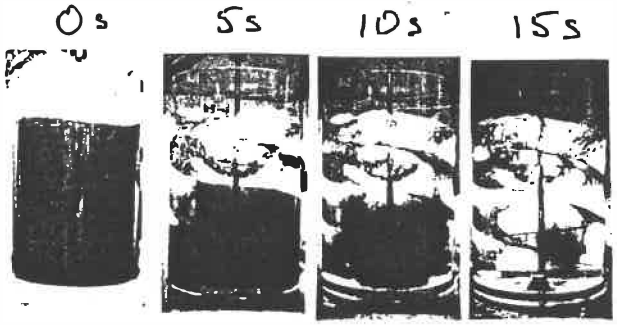
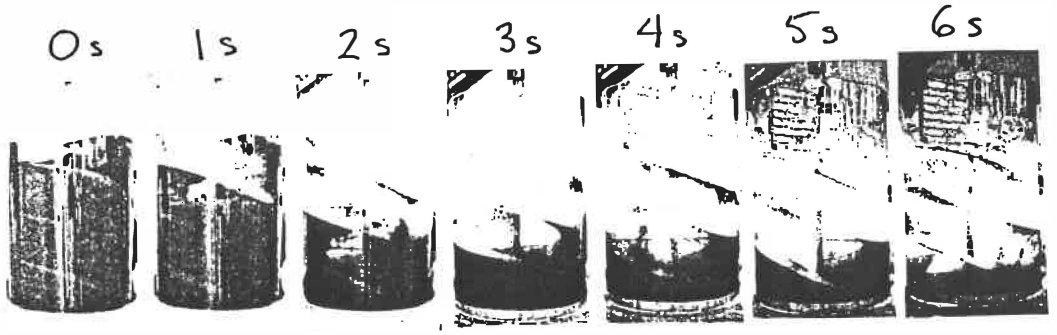


Figure G9 : Planches photographiques: essais de décoloration; 135 rpm; fond profilé

rotation anti-horaire



rotation horaire

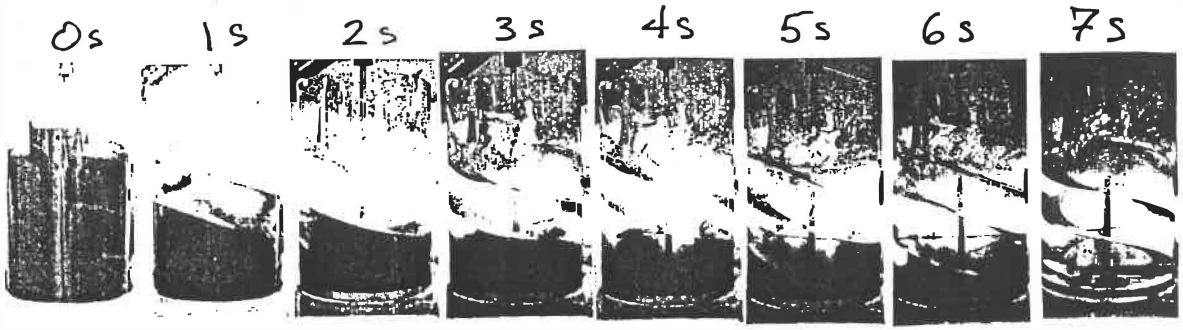
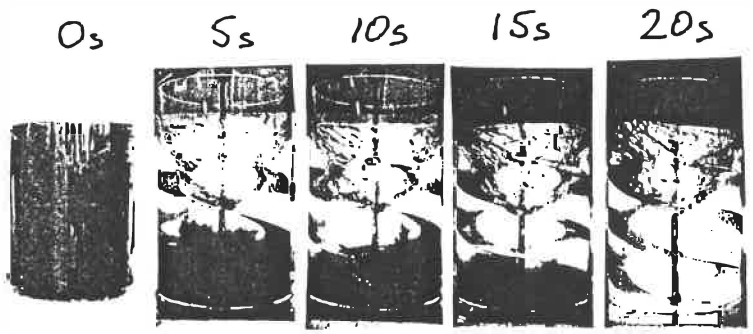


Figure G10: Planches photographiques: essais de décoloration; 135 rpm; fond profilé; 3 chicanes de surface

rotation anti-horaire



rotation horaire

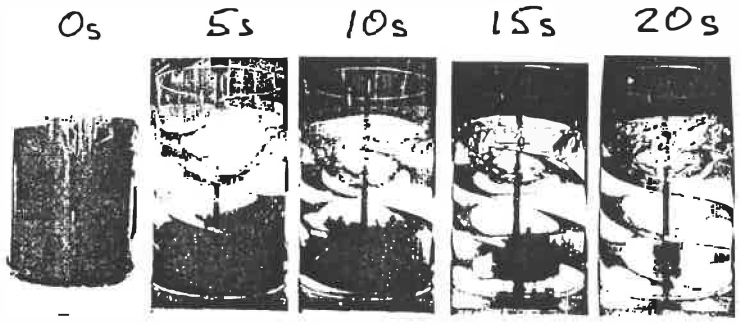
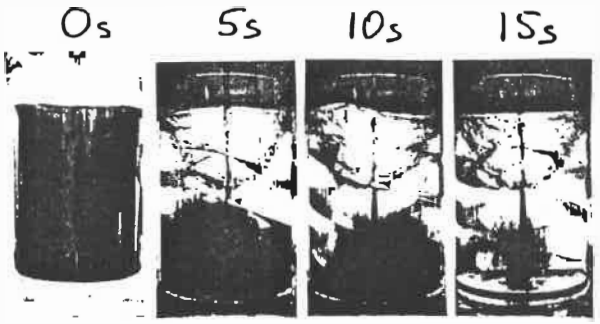


Figure G11: Planches photographiques: essais de décoloration; 150 rpm; fond plat

rotation anti-horaire



rotation horaire

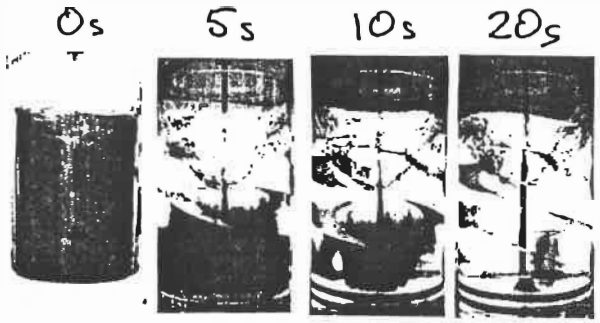
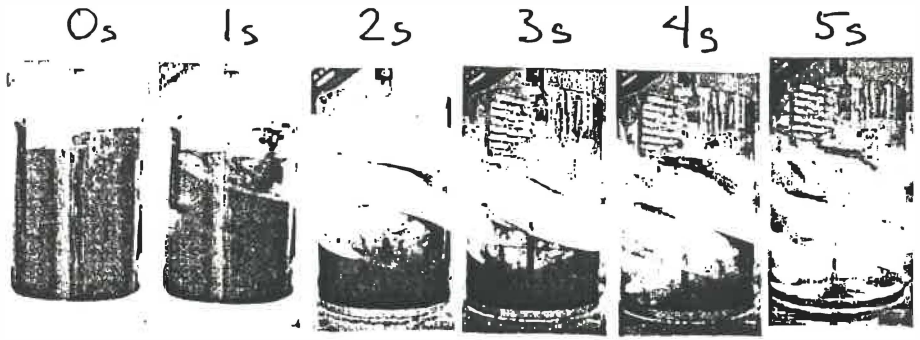


Figure G12: Planches photographiques: essais de décoloration; 150 rpm; fond profilé

rotation anti-horaire



rotation horaire

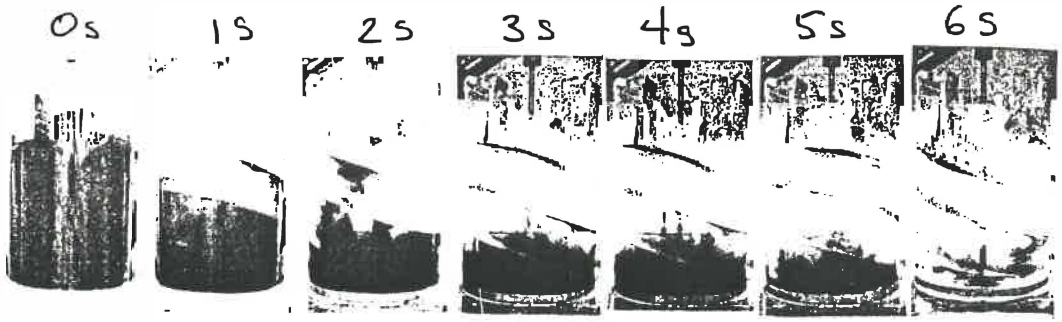


Figure G13: Planches photographiques: essais de décoloration; 150 rpm; fond profilé; 3 chicanes de surface

ANNEXE H

DONNEES EXPERIMENTALES DES CULTURES AVEC DES CELLULES DE *CATHARANTHUS roseus*

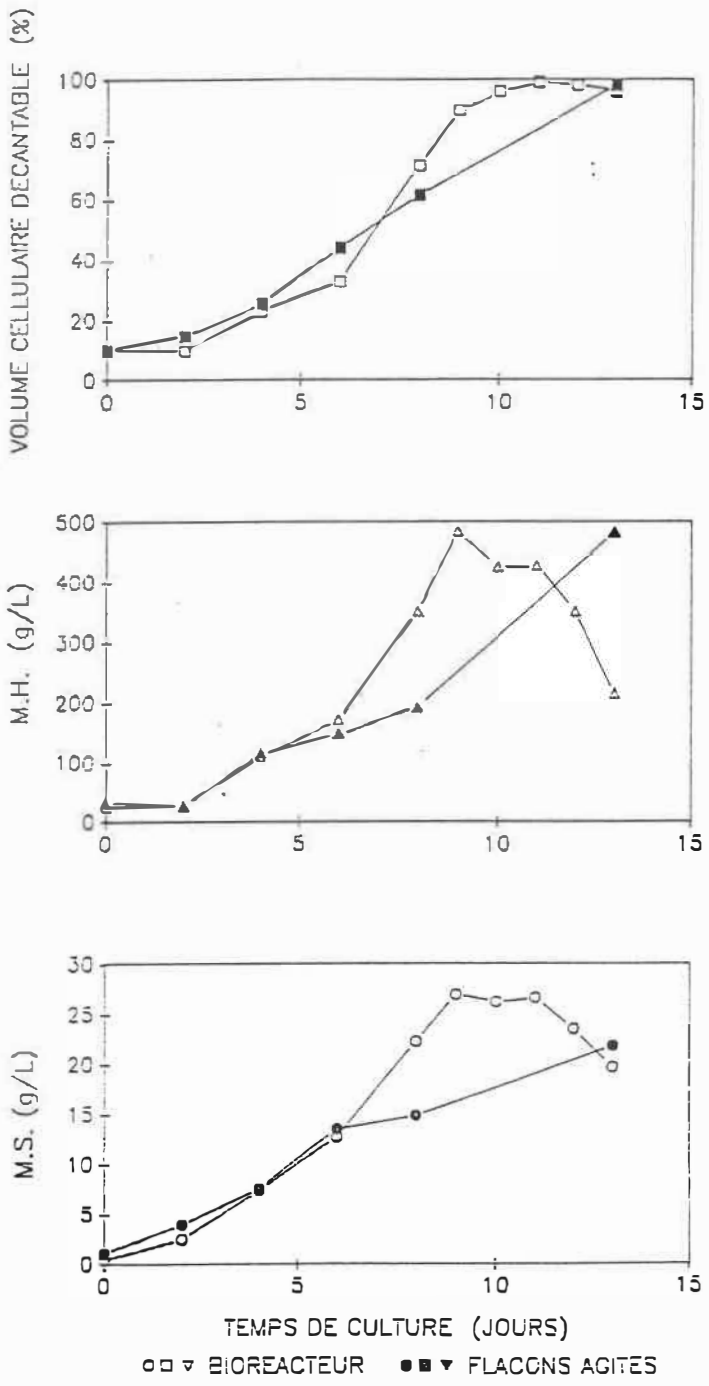


Figure H1 : Courbes de croissance: culture 3 en bioréacteur et flacons agités

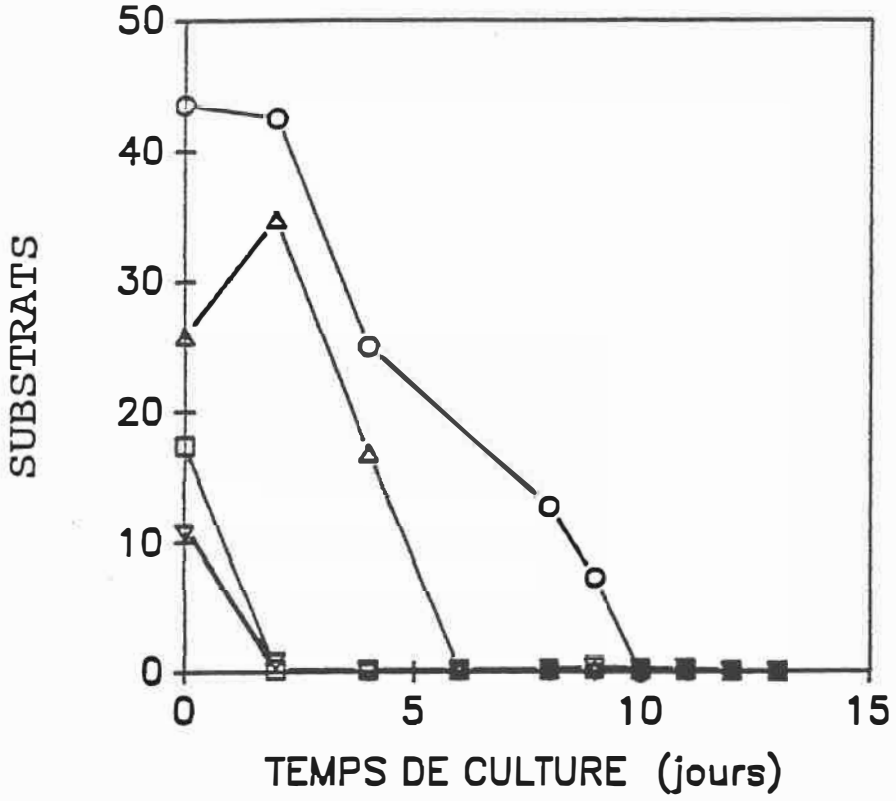


Figure H2 : Courbe de suivi des substrats: culture 3 en bioréacteur

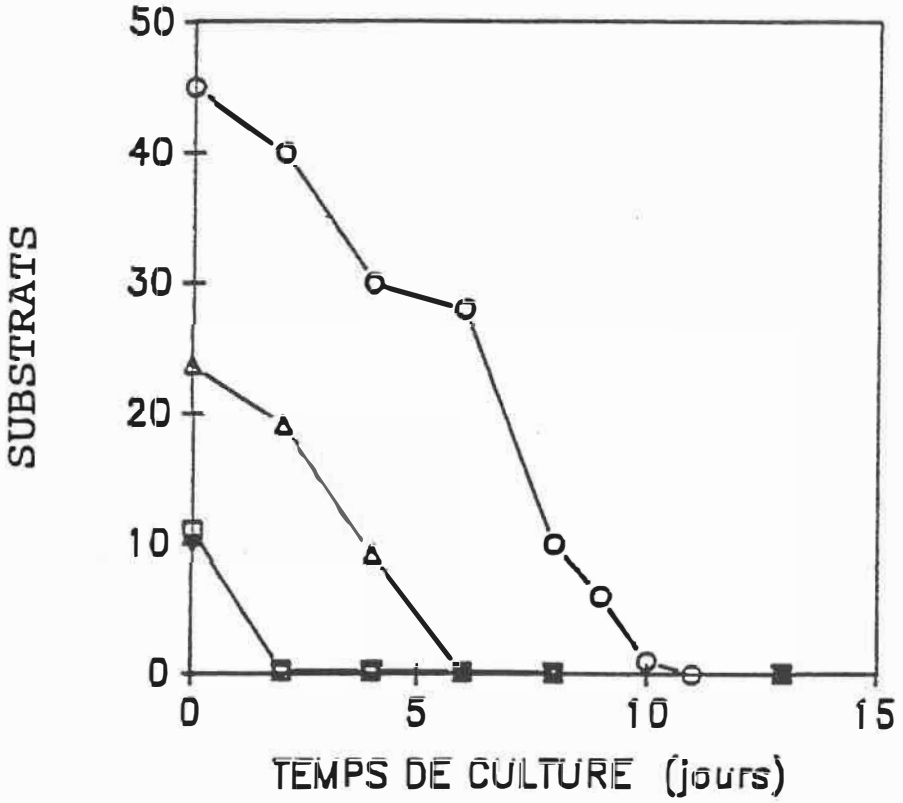


Figure H3 : Courbe de suivi des substrats: culture 3 en flacon agité

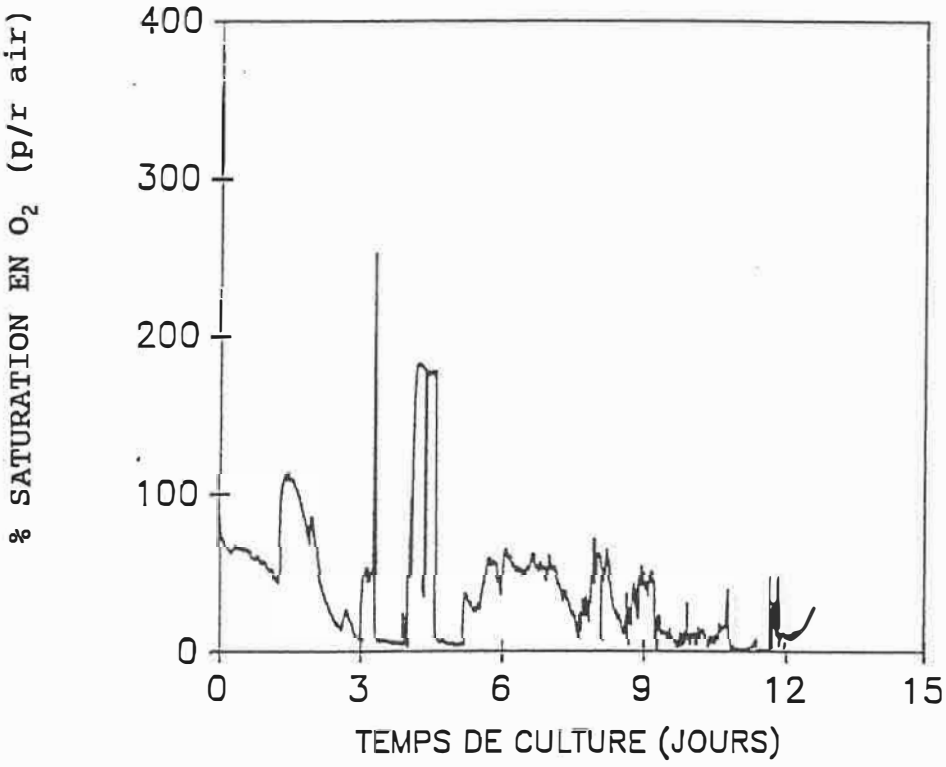


Figure H4 : Courbe de suivi de l'oxygène: culture 3 en bioréacteur

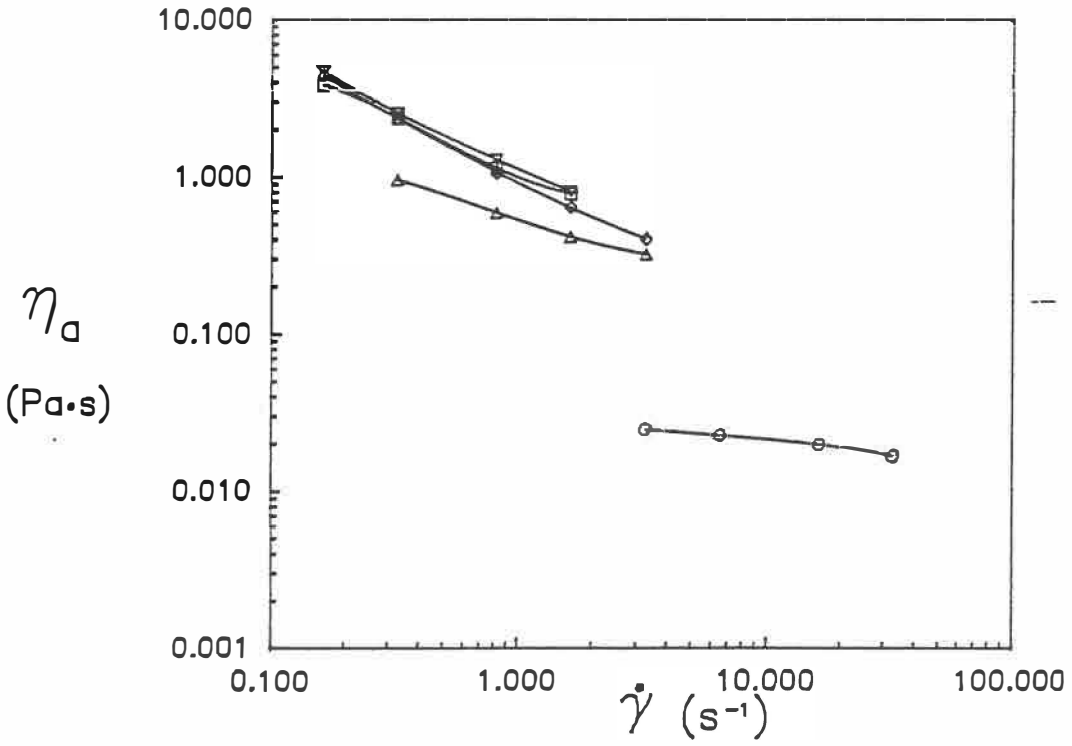


Figure H5 : Courbes de viscosité: culture 3 en bioréacteur

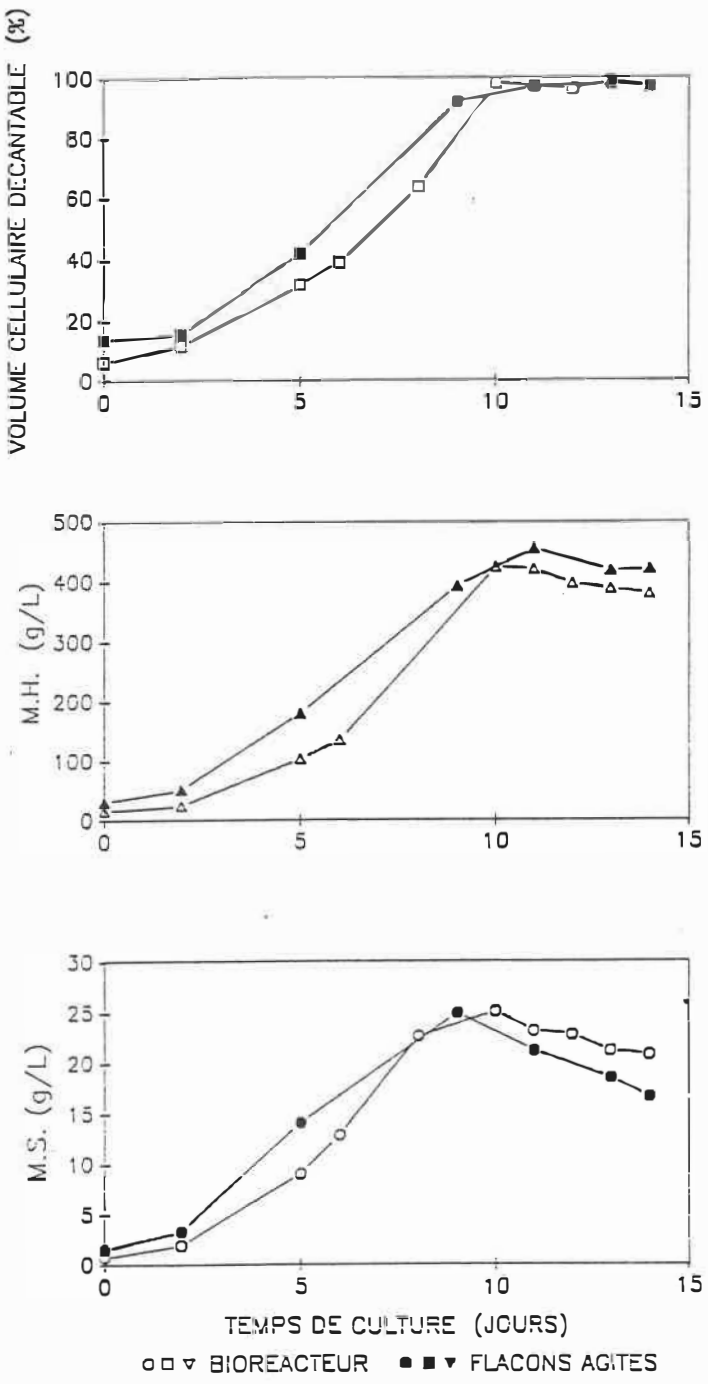
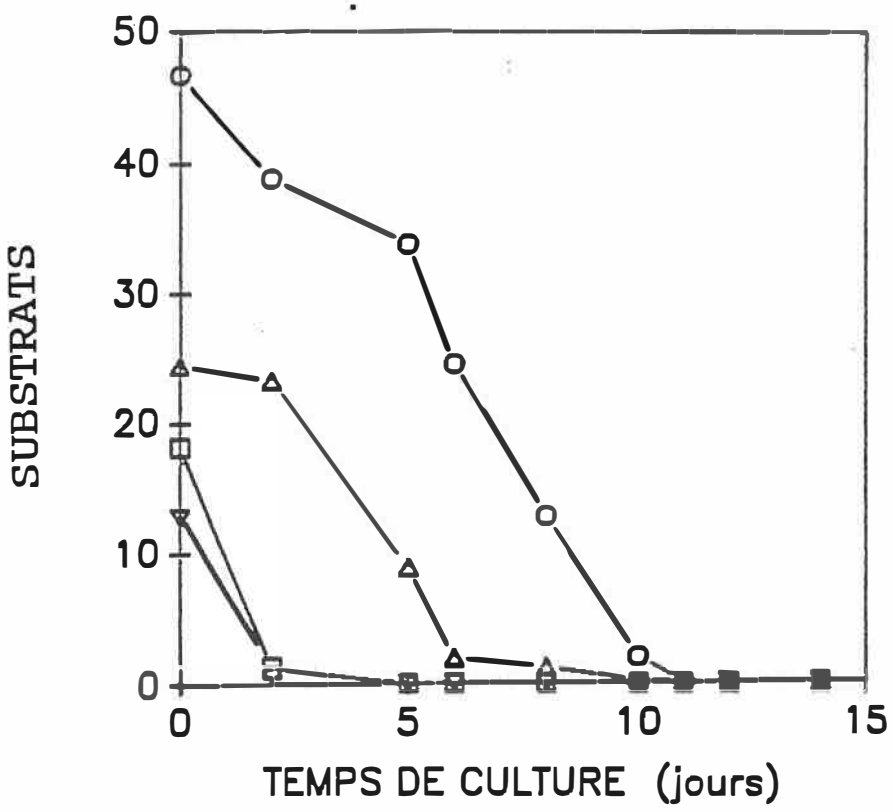


Figure H6 : Courbes de croissance: culture 4 en bioréacteur et flacons agités



○ HYDRATES DE CARBONE TOTAUX (g/L)

△ NO_3^{-2} (mmol) □ NH_4^{+} ($x10^{-1}$ mmol)

▽ PO_4^{+3} ($x10^{-1}$ mmol)

Figure H7 : Courbe de suivi des substrats: culture 4 en bioréacteur

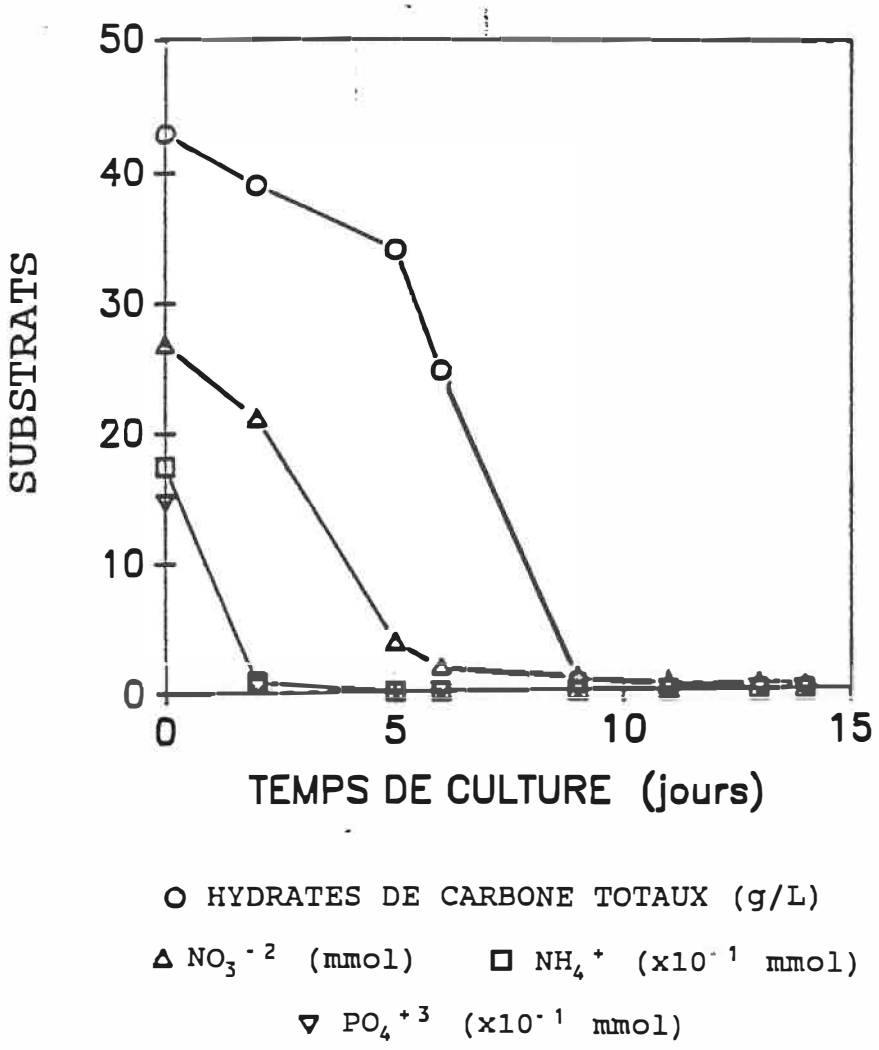


Figure H8 : Courbe de suivi des substrats: culture 4 en flacon agité

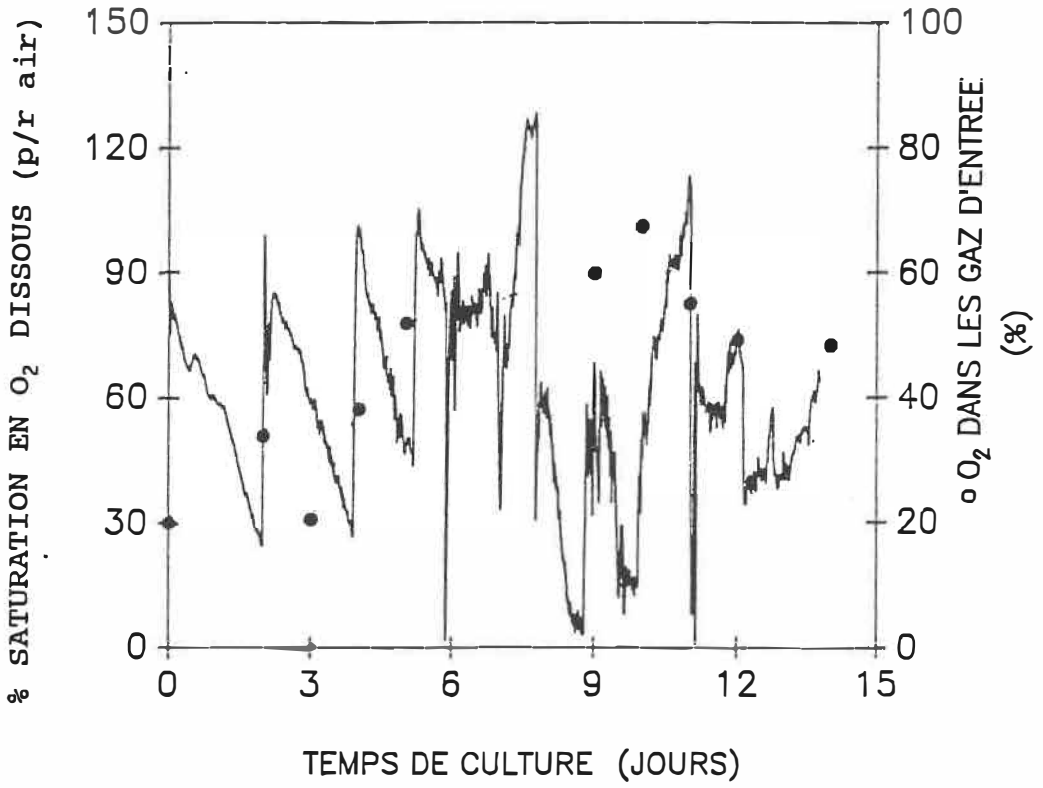
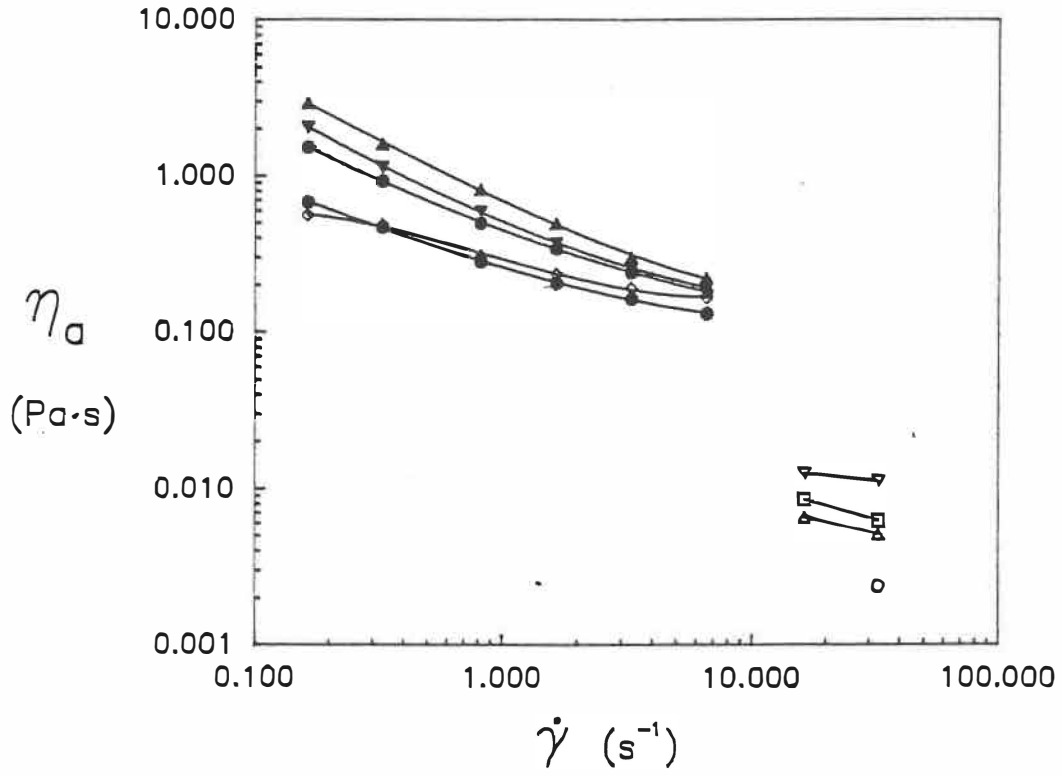
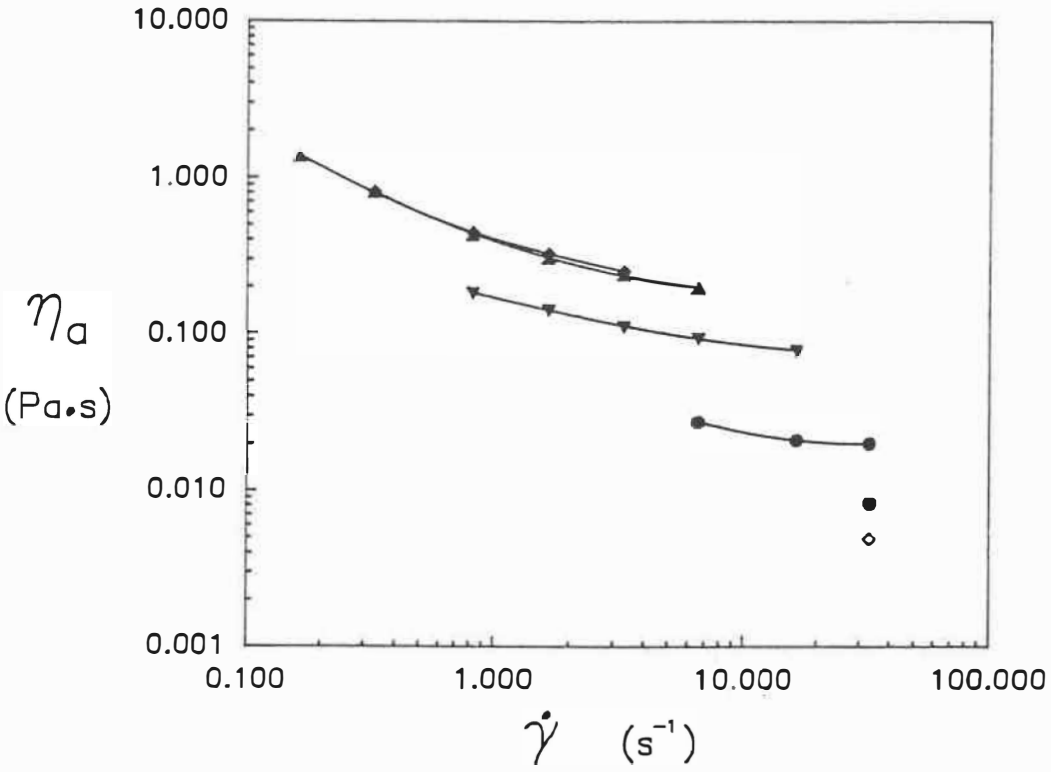


Figure H9 : Courbes de suivi de l'oxygène: culture 4 en bioréacteur



○JOUR 2 0,20% M.S.; △JOUR 5 0,80% M.S.; □JOUR 6 1,29% M.S.; ▽JOUR 8 2,27% M.S.
◇JOUR 9 2,49% M.S.; ●JOUR 10 2,51% M.S.; ▼JOUR 11 2,12% M.S.; ▲JOUR 13 2,12% M.S.

Figure H10 : Courbes de viscosité: culture 4 en bioréacteur



● JOUR 8 1,74% M.S.; ● JOUR 9 1,90% M.S.; ▼ JOUR 10 2,28% M.S.; ▲ JOUR 12 2,31% M.S

◆ JOUR 13 1,51% M.S.

Figure H11 : Courbes de viscosité: culture 4 en flacon agité

ANNEXE I

COURBES EXPERIMENTALES POUR LA MESURE DU Qo_2

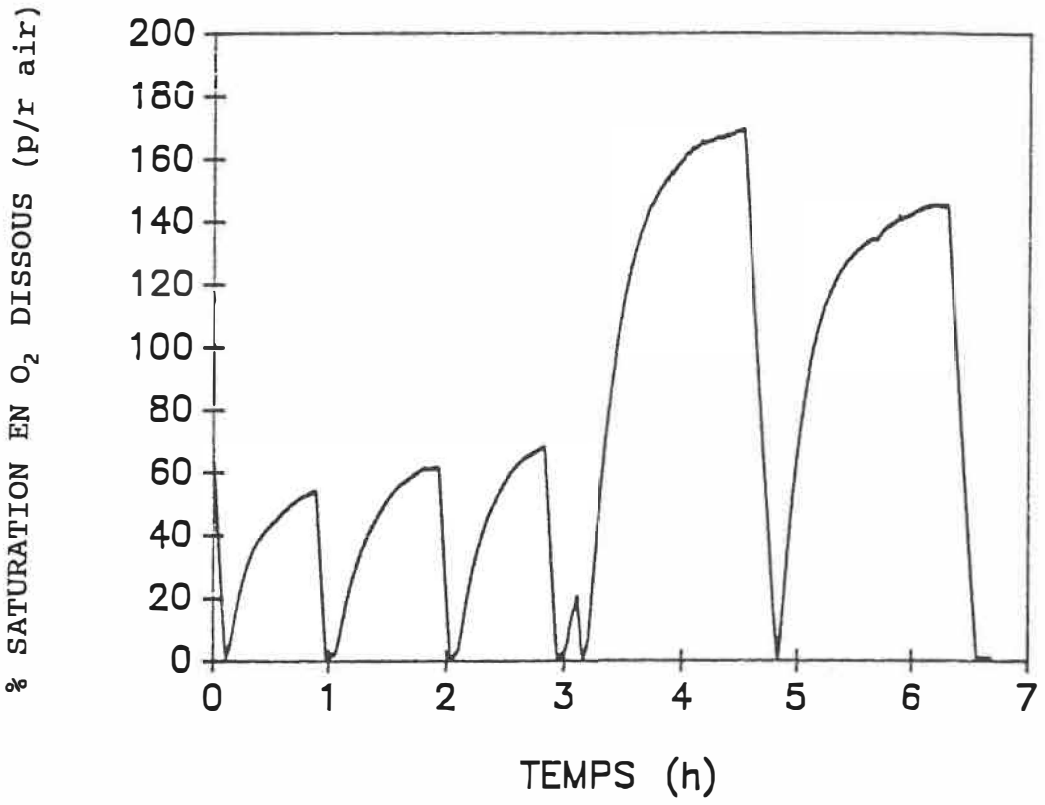


Figure I1 : Courbe d'évaluation du Qo_2 : culture 4 en bioréacteur, 14ième jour

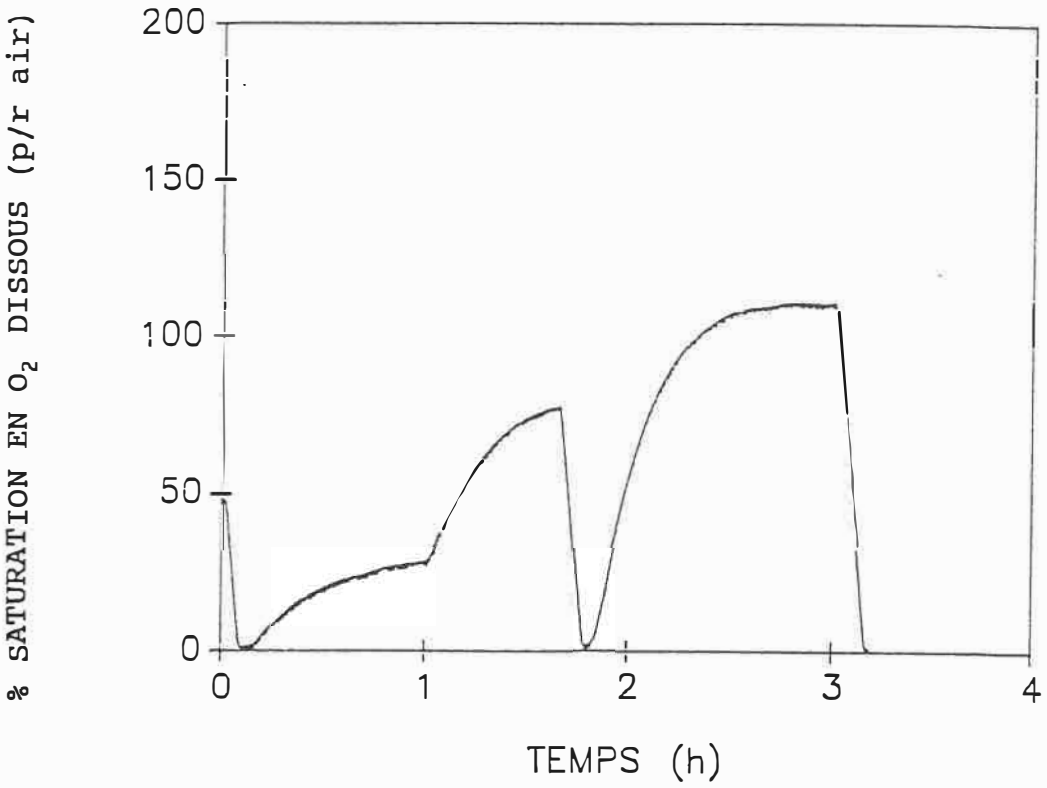


Figure I2 : Courbe d'évaluation du Qo_2 : culture 5 en bioréacteur, 14ième jour

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL
3 9334 00246327 9